

Bruno Pacola Muniz

Efeito da imunização materna com Ovalbumina  
na ativação de células dendríticas e geração de linfócitos T  
reguladores na prole de camundongos

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 Ciências.

São Paulo

2011

Bruno Pacola Muniz

Efeito da imunização materna com Ovalbumina  
na ativação de células dendríticas e geração de linfócitos T  
reguladores na prole de camundongos

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Imunologia do  
Instituto de Ciências Biomédicas da  
Universidade de São Paulo, para  
obtenção do Título de Mestre em  
Ciências.

Área de concentração: Interação  
materno-fetal e imunoregulação

Orientadora: Dra. Maria Notomi Sato

Versão corrigida. A versão original se  
encontra arquivada no Serviço de  
Comunicações do ICB

São Paulo

2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Muniz, Bruno Pacola.

Efeito da imunização materna com Ovalbumina na ativação de células dendríticas e geração de linfócitos T reguladores na prole de camundongos / Bruno Pacola Muniz. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Maria Notomi Sato.

Tese (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Interação materno-fetal.

Versão do título para o inglês: Effects of maternal immunization with Ovalbumin in activation of dendritic cells and generation of T regulatory lymphocytes in offspring mice

Descritores: 1. Células Dendríticas 2. Anticorpos 3. Imunização  
4. Camundongos 5. Leite 6. Placenta I. Sato, Maria Notomi  
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0194/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Bruno Pacola Muniz.

Título da Dissertação: Efeito da imunização materna com Ovalbumina na ativação de células dendríticas e geração de linfócitos T reguladores na prole de camundongos.

Orientador(a): Maria Notomi Sato.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome completo: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome completo: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome completo: .....  
Instituição: .....



USP

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 29.09.2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **127/10** intitulado: **"Efeito da imunização materna com ovalbumina em camundongos na ativação de células dendríticas e na geração de células T reguladoras na prole."**, apresentado pelo **Departamento de Dermatologia**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, ( Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794 -8 de outubro de 2008).

**Pesquisador (a) Responsável: Maria Notomi Sato**

**Pesquisador (a) Executante: Bruno Pacola Muniz**

**CEP-FMUSP, 29 de setembro de 2010.**

**Dr. Eduardo Pompeu**  
**Coordenador**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**

**Prof. Dr. Eduardo Massad**  
**Coordenador**  
**Comitê de Ética em Pesquisa**



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438  
e-mail: cep@icb.usp.br

## **CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **126** nas fls. **76** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Maria Natomi Sato, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Efeito da imunização materna com ovalbumina na ativação de células dendríticas e na geração de células T reguladoras na prole** do qual participou(aram) o(s) alunos **Bruno Pacola Muniz**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **17.11.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 18 de novembro de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador  
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA  
Secretária  
CEEA - ICB/USP

Dedico este trabalho as pessoas que acreditaram em mim e estiveram ao meu lado durante todos esses anos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus acima de tudo.

Agradeço aos meus pais, amo muito vocês. A minha mãe Rosângela, por ser uma mãe paciente que sempre me apoiou em todas as minhas decisões, fáceis ou difíceis, me deu carinho, amor e sempre lutou pela família me ensinando a ser uma pessoa melhor.

Meu pai, Benedito, que também me apoiou durante todos esses anos de formação acadêmica.

Agradeço a minha namorada Fernanda Signore, pelo carinho, paciência e amor. Após 6 anos na área da pesquisa, ela sempre esteve ao meu lado me dando suporte e me ajudando a escrever relatórios e mais relatórios, sempre inteligente, me guiou e me fez crescer profissionalmente. Eu te amo, obrigado por ser um anjo em minha vida.

Agradeço aos meus amigos, em especial ao Jefferson Russo Victor que era o estagiário da professora de biologia, se tornou meu professor de imunologia, meu colega de trabalho e hoje é um dos meus melhores amigos. Obrigado por toda a confiança, esforço e amizade depositados ao longo dessa jornada.

Ao Cyro e a Noemia, que colaboram ativamente para a realização desse trabalho me ajudando em várias etapas.

Agradeço a minha orientadora Dr<sup>a</sup> Maria Notomi Sato. Muito obrigado por toda paciência, dedicação, puxões de orelha e infinita bondade, você me ensina muitas coisas como, seguir em frente e sempre manter a cabeça erguida, criticar o trabalho, discuti-lo e o mais importante, não desistir quando tudo parece perdido. Sem a sua ajuda, nada disso seria possível.

A todos os colegas do LIM-56 que tornam o ambiente de trabalho muito mais prazeroso e divertido, obrigado por todas as risadas.

Ao Professor Dr. Alberto José da Silva Duarte, diretor do LIM-56, por ceder o espaço de trabalho, participar das discussões científicas e acreditar na pesquisa no Brasil.

Agradeço a CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro e ao Departamento de Imunologia do ICB-USP, em especial a Eni por resolver meus problemas e ao Amarildo que tive o privilégio de conhecer, mesmo que por pouco tempo, mas que com certeza faz muita falta ao Departamento e a sua família, fique com Deus.



“A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original”  
Albert Einstein

## RESUMO

MUNIZ, B. P. **Efeito da imunização materna com Ovalbumina na ativação de células dendríticas e geração de linfócitos T reguladores da prole de camundongos.** 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A predisposição genética associada à característica dos neonatos em gerar uma resposta do tipo Th2 ao alérgeno pode favorecer o desenvolvimento de alergia no período neonatal. Nosso grupo vem estudando estratégias de controle da resposta alérgica da prole no período neonatal seja mediado pela imunização materna ou por adjuvantes indutores de resposta Th1. O presente projeto tem como proposta investigar os mecanismos regulatórios decorrentes da imunização com ovalbumina pré-concepção na resposta IgE da prole ao mesmo antígeno. Considerando a influência das DCs na geração de linfócitos T reguladores, ambas as populações foram estudadas nesta condição experimental. A imunização de camundongos BALB/c fêmeas com OVA antes da concepção foi capaz de alterar o microambiente imunológico de ambos, da mãe e da prole. No 21º dia de gestação das mães imunizadas foi detectado no líquido amniótico aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12p70 e IL-10 em relação ao grupo de mães controle não imunizadas. No período de amamentação as mães imunizadas com OVA mostraram uma percentagem equilibrada de células T CD4+CD25+FoxP3+ no baço e elevado nível de TGF- $\beta$ 1 e de anticorpos IgG e IgA anti-OVA em relação às mães controles. A cinética de anticorpos IgG maternos na prole mostra já aos 2 dias de idade (di) presença majoritária de anticorpos IgG1, com pico aos 20 di e diminuição gradual aos 50-80 di. Ambas as vias transplacentária e leite contribuíram na transferência passiva ao feto e neonato, respectivamente, anticorpos IgG1 anafiláticos. A imunização com OVA aos 3 di da prole é capaz de sensibilizar a prole, induzindo a produção de anticorpos IgE e IgG1 anti-OVA, sem alterar a porcentagem de células T CD4+CD25+FoxP3+ esplênicas da prole aos 25 di. A estratégia de imunização das mães com OVA antes da concepção é capaz de inibir a produção dos anticorpos IgE da prole imunizada. Além disto, quando a prole da mãe imunizada com OVA foi amamentada por mães não imunes houve transferência de elevados níveis de anticorpos IgG à prole, similarmente quando as proles de mães controles foram amamentadas por mães imunes.

A estratégia de imunização das mães com OVA antes da concepção é capaz de inibir a produção dos anticorpos IgE da prole imunizada. Quando a prole da mãe imunizada com OVA foi amamentada por mães não imunes houve transferência de elevados níveis de anticorpos IgG à prole, similarmente quando as proles de mães controles foram amamentadas por mães imunes. Este achado mostra que a transferência transplacentária de anticorpos ao feto e pela amamentação ao neonato contribuem ativamente na transmissão dos anticorpos IgG à prole. A imunização das proles aos 25 dias, induz intensa inibição da resposta IgE. A imunização materna também é capaz de aumentar o percentual e a intensidade de expressão da molécula CD80 nas DCs das proles. Entretanto, *in vitro* as DCs de proles de mães imunizadas co-cultivadas com células esplênicas de camundongos DO11.10, não induziram células T CD4+CD25+FoxP3+. Em conjunto, os dados mostram que a imunização materna pré-concepção transfere elevados níveis de anticorpos pelas vias placentária e pelo leite, que podem interferir na ativação das DCs, mas não interfere na geração das células T reguladoras. A vacinação materna pode ser uma estratégia essencial ao controle de desenvolvimento de alergia em fase precoce de vida.

**Palavras-chave:** Materno-fetal. Células Dendríticas. Linfócitos T reguladores. Anticorpos IgG. Ovalbumina.

## ABSTRACT

MUNIZ, B. P. **Effects of maternal immunization with Ovalbumin in activation of dendritic cells and generation of T regulatory lymphocytes in mice offspring.** 2011. 85 p. Master Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Genetic predisposition associated with neonatal feature to generate Th2 response to allergen would favor allergy development at neonatal period. Our group has been studying strategies to control offspring allergen response at neonatal phase through maternal vaccination or by Th1 inducing adjuvants. The present project has the purpose to investigate the regulatory mechanisms in the preconception immunization with ovalbumin on offspring IgE response to the same antigen. Considering the influence of DCs in the generation of T regulatory cells, both populations have been studied in this experimental condition. The immunization of females BALB/c mice with OVA before conception was able to alter the immunologic microenvironmental of both, mother and offspring. At full term pregnancy (21<sup>o</sup> days of gestation) of immunized mothers was detected in amniotic fluid increase levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12p70 and IL-10 compared to the group of non-immunized mothers. Immunized mothers with OVA at breastfeeding period showed a balanced percentage of splenic T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells and increased levels of TGF- $\beta$ 1 and anti-OVA IgG and IgA antibodies in milk samples compared to control mothers.

The kinetic of maternal IgG Ab in offspring show that at 2 days old (d-o) mainly presence of IgG1 Ab, with peaked on 20 d-o and gradually decreased at 50-80 d-o. Both pathway, transplacental and breastfeeding, contributes to transfer Ab passively to fetus and neonate, respectively, anaphylactic IgG1 Ab. Neonatal immunization with OVA at 3 d-o are able to sensitize the offspring, inducing anti-OVA IgE and IgG1 Ab production, no altering the percentage of splenic T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells of 25 d-o-offspring. Strategy of maternal immunization with OVA before conception is able to inhibit IgE Ab production of immunized offspring. Moreover, when offspring from immunized mothers was nursed by non-immunized mothers transferred high IgG Ab levels to offspring, similarly when offspring from control mothers were breastfed by immune mothers. The finding show that transplacental Ab transference to fetus and by breastfeeding to neonate contributes actively on IgG Ab transmission to offspring. The immunization of offspring with OVA at 25 do,

induced intense inhibition of IgE response. Maternal immunization was capable to increase the percentage and CD80 expression on DC from offspring. However, in vitro DCs from offspring of immunized mothers co-cultured with spleen cells from DO11.10 mice, did not induced T CD4+CD25+FoxP3+ cells. Together, the data shows that maternal immunization preconception transfer high levels of Ab by both placental and milk, interfering on DCs activation, but not altering the T reg cells generation. The maternal vaccination can be an essential strategy to control the allergen development in early phase of life.

**Key words:** Materno-fetal. Dendritic cells. T regulatory cells. IgG antibodies. Ovalbumin.

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
	<i>1.1 Desenvolvimento da resposta alérgica</i> .....	<i>15</i>
	<i>1.2 Predisposição à resposta Th2 na fase neonatal</i> .....	<i>17</i>
	<i>1.3 Imunização materna no controle da resposta alérgica</i> .....	<i>22</i>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
	<b>3.1 Animais</b> .....	<b>26</b>
	<b>3.2 Antígeno</b> .....	<b>26</b>
	<b>3.3 Protocolo de imunização materna com OVA</b> .....	<b>26</b>
	<b>3.4 Protocolo de imunização de neonatos e de jovens com OVA</b> .....	<b>27</b>
	<b>3.5 Protocolo de troca de proles em período neonatal</b> .....	<b>27</b>
	<b>3.6 Protocolo para coleta de líquido amniótico e do leite</b> .....	<b>28</b>
	<b>3.7 Análise de anticorpos IgE e IgG1 anti-OVA por reação de Anafilaxia Cutânea Passiva (ACP)</b> .....	<b>28</b>
	<b>3.8 Obtenção de células esplênicas e purificação de DCs</b> .....	<b>29</b>
	<b>3.9 Co-cultura de DCs CD11c+ com células T CD4+ de camundongos DO11.10</b> ...	<b>29</b>
	<b>3.10 Avaliação da função supressora dos linfócitos T CD4+CD25+FoxP3+ gerados em co-cultura com DCs purificadas</b> .....	<b>30</b>
	<b>3.11 Citometria de fluxo</b> .....	<b>30</b>
	<b>3.12 Determinação da concentração de citocinas pró-inflamatórias por citometria de fluxo</b> .....	<b>31</b>
	<b>3.13 ELISA para determinação de anticorpos IgA, IgM e subclasses de IgG anti-OVA</b> .....	<b>31</b>
	<b>3.14 Avaliação da citocina TGF-<math>\beta</math>1</b> .....	<b>32</b>
	<b>3.15 Análise estatística</b> .....	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
	<b>4.1 Determinação de citocinas no líquido amniótico e no leite de mães imunizadas com OVA</b> .....	<b>33</b>
	<b>4.2 Determinação de TGF-<math>\beta</math>1 e anticorpos anti-OVA no leite de mães imunizadas com OVA</b> .....	<b>35</b>
	<b>4.3 Transferência de anticorpos maternos IgG anti-OVA e a sua permanência na circulação da prole</b> .....	<b>37</b>

4.4	Transferência de anticorpos maternos IgG1 anafiláticos para a prole.....	39
4.5	Efeito da imunização materna com OVA nas células T CD4+CD25+FoxP3+ esplênicas.....	41
4.6	Resposta humoral na imunização neonatal com OVA .....	43
4.7	Efeito da imunização materna na produção de anticorpos IgE e IgG1 anafiláticos da prole imunizada em período neonatal .....	46
4.8	Efeito da imunização materna na produção de anticorpos IgM e IgA anti-OVA das proles imunizadas .....	48
4.9	Análise das vias de transferência de anticorpos IgG maternos à prole.....	49
4.10	Resposta IgE da prole submetida ao protocolo de troca de mães na amamentação .....	51
4.11	Efeito da imunização materna na população de células DCs da prole não imunizada.....	53
4.12	Efeito da imunização materna com OVA nas células T CD4+CD25+FoxP3+ esplênicas da prole imunizada no período neonatal.....	55
4.13	Efeito das DCs das proles na capacidade de gerar células T reguladoras in vitro.....	57
4.14	Análise da capacidade supressora dos linfócitos T CD4+ co-cultivados com as DCs.....	60
5	DISCUSSÃO .....	64
6	CONCLUSÃO .....	72
7	REFERÊNCIAS .....	73

# 1 INTRODUÇÃO

## *1.1 Desenvolvimento da resposta alérgica*

A prevalência de doenças atópicas como dermatite atópica, asma e alergias alimentares tem aumentado nos últimos anos (PAWANKAR et al., 2008) e o seu desenvolvimento pode estar relacionado com o tempo de aleitamento, intensidade de exposição aos alérgenos e estilo de vida (WARNER, 2004; BRUSSEE et al., 2005). Além dos fatores genéticos que predispõe ao desenvolvimento das doenças alérgicas, os fatores ambientais têm significativa influência na ocorrência e progressão da doença. Estes fatores incluem a poluição atmosférica e a contaminação do ambiente doméstico. A sensibilização aos alérgenos alimentares e aeroalérgenos durante o primeiro ano de vida pode ser um fator preditivo para o desenvolvimento de doença atópica em crianças de 6 anos de idade com história familiar de atopia (BROCKOW et al., 2009).

A alergia é uma reação de hipersensibilidade imediata do tipo I caracterizada como um desequilíbrio da resposta imune humoral e capaz de promover danos ao organismo sendo mediada por anticorpos da classe IgE (COOMBS, GELL, 1975) e de desenvolver predominante resposta imune celular do padrão Th2 a estes antígenos em indivíduos geneticamente predispostos.

A resposta imune inicia-se com o processamento e apresentação do antígeno pelas células dendríticas (DCs) para os linfócitos T cuja cooperação com os linfócitos B leva a sua maturação com troca do isótipo com os diversos isótipos de anticorpos IgG, IgA e IgE. Células como os mastócitos, basófilos e eosinófilos teciduais expressam na superfície receptores de alta afinidade para a porção Fc da IgE (FcεRI), na qual as moléculas IgE se fixam. Em um contato subsequente com o alérgeno, ao menos duas moléculas de anticorpos IgE específicos a um mesmo alérgeno que ocupam estes receptores em uma mesma célula ligam-se simultaneamente, iniciando uma sinalização intracelular em cascata que leva a desgranulação celular. Os grânulos citoplasmáticos liberados possuem grande quantidade de fatores pró-inflamatórios pré-formados, como a histamina. Além disso, o mastócito passa a produzir mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico, quimiocinas e



citocinas responsáveis pela inflamação e pelos sintomas das alergias (BINGHAN; AUSTEN, 2000).

A síntese de anticorpos IgE é dependente da ação de linfócitos T CD4, e especialmente das citocinas. Os linfócitos T CD4 são capazes de manifestar diferentes padrões de secreção de citocinas, entre eles, Th1, Th2 e Th17 (MOSMANN; COFFMAN, 1989, HARRINGTON et al., 2005). Esta diferenciação aparentemente depende de diferentes fatores incluindo o microambiente da resposta inflamatória inicial, ou seja, da presença de citocinas, que é induzida pelo tipo de antígeno e pelas populações de células ativadas inicialmente. Entre as citocinas envolvidas neste processo, a IL-12 é secretada principalmente por APCs e favorece a diferenciação do padrão Th1 (COFFMAN et al., 1991), que secretam IL-2 e IFN- $\gamma$  e favorecem a imunidade mediada por células como macrófagos e linfócitos T CD8, além de favorecerem a troca de isótipos de anticorpos para a subclasse IgG2a em camundongos. O IFN- $\gamma$  colabora com o padrão Th1 através do aumento da expressão do gene *T-bet* via fator transdutor e ativador de transcrição 1 (*STAT1*) (MURPHY; REINER, 2002). Já a IL-4, secretada principalmente por linfócitos T NK1.1 e mastócitos contribui para a diferenciação do padrão Th2 (COFFMAN et al., 1991). Este padrão é caracterizado pela expressão do fator de transcrição GATA3 e da secreção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e está relacionado a altas e persistentes respostas de anticorpos e favorecem a produção de anticorpos IgE em humanos e de anticorpos IgE e IgG1 em camundongos. Nas doenças alérgicas, observa-se predominância do padrão Th2, em decorrência da elevada produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 e dos anticorpos IgE a determinados antígenos. Durante a gestação (WEGMANN et al., 1993), período onde ocorrem efetivas interações entre os sistemas imune, reprodutivo e hormonal maternos, existe a tendência ao desenvolvimento de respostas do tipo Th2 na gestante, contudo as citocinas do tipo Th1 são importantes no processo de implantação do embrião e na expulsão do feto do útero.

O terceiro tipo de células Th foi denominado como Th17, subgrupo celular que expressa o fator de transcrição ROR $\gamma$ t e secreta IL-17A, citocina pró-inflamatória. Essas células são importantes na proteção contra fungos e várias bactérias extracelulares mas também favorecem o desenvolvimento de doenças autoimunes e autoinflamatórias (IVANOV et al., 2006).

Várias evidências indicam a existência de plasticidade e reciprocidade das células T CD4<sup>+</sup> naive com as subpopulações Th1, Th2 e Th17 com sobreposição dos perfis funcionais e na mudança de uma linhagem para outra. Além disto, o TGF- $\beta$  também induz a diferenciação de células T naive em células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Tregs) como também participa em associação com a IL-6 na diferenciação das células Th17, evidenciando a íntima relação entre as células Th17 e as células T regs FoxP3<sup>+</sup> (BETTELI et al., 2008).

As células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> são essenciais para limitar o excesso das respostas efectoras e de memória de células T CD4<sup>+</sup> antígeno-específicas (HAYASHI et al., 2004; SAKAGUCHI, 2004). As deficiências genéticas no gene FoxP3 causam uma condição auto-imune aguda, chamada de síndrome da poliendocrinopatia, enteropatia, ligada ao X (IPEX) em humanos e manifestações auto-imunes fatais em camundongos (SAKAGUCHI et al., 2001, BANHAM et al., 2006; BACCHETTA et al., 2007). As células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> atuam por contato célula-célula e quando ativadas podem gerar um fenótipo regulador em células T naive num processo dependente de TGF- $\beta$ . Além disso, células Tregs geradas são capazes de gerar outras células reguladoras, sugerindo um mecanismo de feedback positivo (ANDERSSON et al., 2008). As células T regs são importantes na tolerância do feto e a expansão das T regs pela via Ag-específica ou não específica favorece sua ação supressora na fase crítica de peri-implantação do feto na gestação (ALUVIHARE et al., 2004). Em humanos, as T regs são capazes de suprimir a imunidade Th1 e Th2 aos aloantígenos fetais paternos (MJÖSBORG et al., 2007).

Além disso, um grande número de estudos vem abordando o papel das células T reg TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>+FoxP3<sup>+</sup> na supressão de doenças alérgicas experimentais, pela inibição da hiperreatividade pulmonar (KEARLEY et al., 2005, JOETHAM et al., 2007) e/ou diminuição de IL-4, IL-5 e IL-13 nas vias aéreas em modelos experimentais de alergia (BURCHELL et al., 2009).

### ***1.2 Predisposição à resposta Th2 na fase neonatal***

No período neonatal, vários fatores ou parâmetros da resposta celular e humoral estão qualitativamente ou quantitativamente alterados, que direcionam a resposta ao

antígeno ao padrão Th2. Além disto, no período pós-natal há uma predisposição ao desenvolvimento de resposta alérgica. Estas características salientam a necessidade de busca de estratégias para o controle de sensibilização aos alérgenos em período precoce de vida.

Nos neonatos algumas peculiaridades são encontradas, como a tardia produção de anticorpos a antígenos T dependentes de curta duração e de menor afinidade do que os adultos (ADKINS et al., 2004). A baixa produção de anticorpos nesta fase de vida pode ser atribuída às diferenças fenotípicas e funcionais das células B ou pela falta de um microambiente anatômico apropriado para a interação entre as células T e B. A distribuição dos isótipos de anticorpos dos neonatos também difere dos adultos, observando-se uma deficiente produção de anticorpos IgG3 em camundongos (que corresponde à IgG2 em humanos) e está relacionado com a resposta aos antígenos T independentes, como os polissacárides da parede bacteriana, podendo resultar em infecções persistentes e recorrentes em infantis (KOURTIS; NAHMIAS, 1997).

As células B imaturas (IgM+IgD<sup>low/-</sup>) constituem a principal população de células B no baço do neonato. Após ligação do antígeno via BCR das células B há uma sinalização negativa em consequência da baixa expressão de moléculas essenciais para a interação com as células T, como as moléculas co-estimulatórias e as moléculas de classe II do MHC (MARSHALL-CLARKE et al., 2000). As células B maduras estão praticamente ausentes até a primeira semana de vida do camundongo, onde podem ser encontradas em discretos aglomerados perto das arteríolas centrais do baço neonatal.

Os folículos linfóides, as DCs foliculares (FDC) e os centros germinativos estão ausentes no nascimento e são vitais para se obter uma adequada produção de anticorpos aos antígenos T dependentes. O desenvolvimento destas estruturas nas primeiras semanas de vida é regulado pelas interações das células B com o estroma do órgão linfóide e requer a participação de quimiocinas (ANSEL et al., 2000). Nos folículos de células B, as FDC expõem o antígeno para as células B, que por sua vez tornam-se ativadas e entram no processo de diferenciação. Esta ativação celular promove a formação do centro germinativo e após a colaboração com os linfócitos T, a troca de classe de imunoglobulinas e a diferenciação em plasmócitos ou em células B de memória. Os centros germinativos estão ausentes até três semanas de idade em camundongos, e o seu aparecimento coincide com a

capacidade dos animais em estabelecer resposta semelhante aos adultos (PIHLGREN et al., 2003).

As escassas células B maduras encontradas em neonatos humanos ou murinos expressam baixos níveis da molécula CD40, que em associação a baixa expressão do seu ligante (CD40L) em células T culmina na produção de baixos níveis de anticorpos IgG, IgA e IgE (DURANDY et al., 1995; MIN et al., 2001). A deficiente expressão da molécula TACI (*transmembrane activator and calcium modulator and cytophilin ligand interactor*) da superfamília do receptor de TNF, receptor de BAFF (*B-cell-activating factor*) em células B e co-estimulador de respostas de anticorpo T-independente (TI-2), deve contribuir para a baixa resposta de anticorpos, sobretudo aos antígenos polissacarídeos (KANSWAL et al., 2008).

A imunização de crianças até os seis meses de idade contra o tétano e a difteria é capaz de induzir a formação de linfócitos de memória, porém a atividade efetora *in vitro* destas células só é observada após a adição de DCs autólogas maduras na cultura (UPHAM et al., 2006). Estes dados sugerem que a deficiência de respostas celulares de memória observadas *in vivo* se deve ao reduzido número de DCs bem como a sua imaturidade.

As células B de memória migram dos órgãos secundários para a medula óssea, ambiente importante para longevidade e contínua função das células B. No neonato este processo de colonização de plasmócitos na medula óssea está comprometido provavelmente devido à baixa ou ausente expressão de moléculas de *homing* (PIHLGREN et al., 2001) e à baixa expressão de moléculas sinalizadoras na medula óssea (PIHLGREN et al., 2006).

As DCs são as APCs mais importantes na ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> *naive* (DADAGLIO et al., 2002). As DCs imaturas, após a estimulação com lipopolissacarídeos, citocinas ou outros estímulos, aumentam a expressão de moléculas de classe II do MHC e de moléculas co-estimulatórias, tornam-se células maduras capazes de apresentar antígenos e ativar os linfócitos T com extraordinária eficiência (ADKINS et al., 2004). As APCs de neonatos são imaturas quanto à função e estão em número reduzido em relação aos adultos, mas atingem valores similares quando as áreas esplênicas tornam-se organizadas (ADKINS et al., 2004). Quando estão em baixos números, as DCs não são capazes de ativar completamente a resposta imune adaptativa para uma efetiva resposta de células T e B antígeno específicas (RIDGE et al., 1996; SIEGRIST, 2007; WU et al., 2007),

ou podem direcionar ao desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th2 contra vários estímulos antigênicos (LAMBERT et al., 2005). Além disto, as DCs podem influenciar na regulação da resposta imune, como as DCs CD103<sup>+</sup> presentes nos linfonodos mesentéricos de camundongos são capazes de induzir a expressão de FoxP3 em células T naive, de maneira dependente de TGF- $\beta$  e de ácido retinóico (COOMBES et al., 2007).

Uma das características das células do neonato murino, seja dos linfócitos B e das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> é a rápida entrada em ciclo celular após estímulos policlonais e antígeno-específicos (ADKINS et al., 2003). Este fenômeno poderia agilizar as células *naive* na resposta aos patógenos, entretanto, sua eficácia é restrita pelo limitado número de células T dos neonatos. Apesar da diferença quantitativa das células T do neonato em relação aos adultos, este compartimento não é completamente deficiente nos camundongos. (ADKINS et al., 2004). A incapacidade de secreção de IFN- $\gamma$  provavelmente pode estar envolvida na diferenciação para o padrão do tipo Th2. Baixos níveis de IFN- $\gamma$  são detectados em co-culturas de células esplênicas de camundongos neonatos, na presença ou não de células de adultos (ADKINS et al., 2001), seja em linhagens de camundongos, que na fase adulta, são suscetíveis a desenvolver uma resposta do padrão Th2 (BALB/c) quanto para Th1 (C57BL/6). Contudo, a produção de IFN- $\gamma$  de neonatos murinos pode depender do sítio imunológico estimulado, tais como as células de linfonodos que apresentam capacidade preservada de secreção de citocinas Th1 (ADKINS et al., 2000). Este claro predomínio de resposta Th2 em neonatos murinos não é evidente em humanos (LAMBERT et al., 2005).

Um dos mecanismos para explicar a ineficiência das células Th1 e conseqüente propensão de desvio para a resposta Th2 dos neonatos murinos após re-exposição antigênica, pode ser devido a apoptose das células Th1. Li et al. (2004) utilizando um sistema de transferência adotiva de células T de camundongos transgênicos com TCR específico para OVA em neonatos de um dia de idade mostraram o desenvolvimento de respostas Th1 e Th2 na resposta primária. No entanto, na re-exposição antigênica ocasiona um predomínio de resposta Th2 e apoptose das células produtoras de citocinas Th1. Além disto, o desvio para a resposta Th2 na imunidade neonatal tem sido relacionada com a maturação tardia de uma subpopulação de células DC capaz de produzir rapidamente IL-12,

o que acabaria permitindo o aumento da expressão de IL-13R $\alpha$ 1 e de IL-4R $\alpha$ 1 (LEE et al., 2009).

Uma população de células vem sendo descrita nos neonatos murinos e humanos que não expressam marcadores de linhagem (Lin) mas c-Kit, Sca-1, IL-7R e IL-33R, chamadas de *fat-associated lymphoid cluster* (FALC) (MORO et al., 2010). Essas células proliferam em resposta a IL-2 e produzem grandes quantidades de citocinas Th2 como IL-5, IL-6 e IL-13 contribuindo na predisposição do neonato para o desvio da resposta Th2.

Os neonatos são capazes de gerar resposta Th1 no sexto dia após o nascimento, em paralelo, as DC CD8 $\alpha$ +CD4- acumulam-se no baço e produzem IL-12, regulando negativamente a expressão de IL-13R $\alpha$ 1 nas células Th1 diminuindo a apoptose de células Th1, bem como restaurando a produção de IFN- $\gamma$  na resposta secundária (LEE et al., 2009).

A tendência ao desenvolvimento de resposta Th2 dos neonatos murinos pode ser inibida pela injeção de IFN- $\gamma$  recombinante durante a gestação (LIMA et al., 2005). O tratamento é capaz de inibir a produção de IL-4 da prole após o desmame, além de diminuir a inflamação pulmonar e a produção de anticorpos IgE e IgG1 anafiláticos das proles imunizadas com OVA em idade adulta.

Além disto, o controle da resposta alérgica é mediado pelas células T reguladoras. Visto que a depleção de células T reg com anticorpos anti-CD25 aumenta a hiperreatividade pulmonar, o número de eosinófilos, citocinas Th2 e anticorpos IgE em camundongos C3H imunizados com ácaros de poeira doméstica (LEWKOWICH et al., 2005). Entretanto, não está claro se a integridade da função reguladora no período neonatal pode ser mais um fator que contribui para o desvio da resposta Th2.

Apesar das peculiaridades encontradas na fase neonatal, que refletem nas diferenças imunológicas qualitativas e quantitativas em relação ao adulto, há importante flexibilidade das células dos neonatos que, em associação com adjuvantes indutores de resposta Th1, podem potencializar a resposta imune e controlar o desvio da resposta Th2.

O estudo da imunização materna pré-concepcional e o reflexo na resposta alérgica da prole, bem como o efeito nas populações de DCs e em linfócitos T das proles pode contribuir para o aperfeiçoamento de futuras medidas profiláticas no controle da resposta alérgica.

### ***1.3 Imunização materna no controle da resposta alérgica***

A interrelação entre as citocinas, hormônios e células, são elementos vitais na gestação e na amamentação que influenciam o sistema imunológico da prole. Além disto, as fases gestacional e pós-natal podem influenciar na predisposição às doenças alérgicas (PEDEN, 2000; VON MUTIUS, 2002). A interação materno-fetal durante o período gestacional pode expor o feto a macromoléculas presentes no fluido amniótico que serão absorvidas pela pele, trato respiratório ou trato gastrointestinal, que pode levar à sensibilização ou tolerância do sistema imune do feto ao alérgeno (WARNER, 2004).

Em camundongos, os anticorpos IgG são transferidos pela placenta no período pré e pós-natal pela amamentação (KOCH et al., 1967). A transmissão placentária de IgG e a amamentação prolongada têm função protetora nas infecções em neonatos até o desenvolvimento do sistema imune (RICHTER et al., 2004; RIGATO et al., 2009). O receptor neonatal (FcRn) responsável por esse fenômeno liga-se à porção Fc da molécula de IgG inibindo sua degradação pelo baixo pH (RAGHAVAN et al., 1995). O FcRn humano participa do transporte não somente da IgG, mas também, de complexos antígeno/anticorpo para o interior da lâmina própria do intestino. Este transporte estimula a migração de DCs para o tecido linfóide permitindo a interação com células T CD4+ antígeno específica (YOSHIDA et al., 2004). Portanto, o transporte ativo de IgG materna oferece um veículo ideal para carrear o alérgeno ao feto.

Além disto, o alérgeno de gato, Fel d 1, é detectado em complexo com a IgG materna em mais de 40% das amostras de cordão umbilical (CASAS; BJÖRKSTÉN, 2001; CASAS et al., 2004). Várias rotas para esta transferência são sugeridas, com especial destaque para os fibrinóides placentários, que estão presentes na placenta durante todos os estágios de desenvolvimento fetal.

Como estratégia de controle de prevenção da resposta alérgica, protocolos experimentais com alérgenos têm sido avaliados. Neste contexto, o protocolo de imunização materna com um alérgeno alimentar como a OVA induz a produção de anticorpos IgG e é capaz de suprimir a resposta IgE dos filhotes (JARRETT; HALL ,

1983). Além disso, a transferência de anticorpos maternos IgG específicos é capaz de prevenir a sensibilização alérgica da prole de ratos (JARRETT; HALL, 1979).

Previamente, foi demonstrado em nosso Laboratório que a imunização de camundongos fêmea A/Sn com ácaros *Dermathophagoides pteronyssinus* (Der p) antes da concepção inibe a resposta de hipersensibilidade tipo I e a produção de anticorpos IgG1 das proles imunizadas (FUSARO et al., 2002; VICTOR et al., 2003). Esta inibição está relacionada à transferência de elevados níveis de anticorpos IgG maternos para as proles, além de elevados níveis de TGF- $\beta$ 1 no leite materno (FUSARO et al., 2002). A imunização materna com Der p eleva a produção de IFN- $\gamma$  da prole não imunizada, contudo, quando os neonatos são imunizados há uma redução dos níveis de IFN- $\gamma$ , e não exacerbação da produção de citocinas Th2 (VICTOR et al., 2003). A exposição dos neonatos com altas doses de OVA durante a fase de amamentação é capaz de exacerbar a produção de anticorpos IgE enquanto que a exposição com baixas doses durante a gestação inibe a produção de IgE na prole de camundongos (FUSARO et al., 2009). Estrategicamente, a imunização materna pré-concepção diminui a quantidade de OVA presentes no leite mesmo quando estas mães sofrem intensa exposição à OVA durante a amamentação (FUSARO et al., 2009). De fato, altos níveis de complexos imunes formados por anticorpos materno/antígeno foram detectados no leite da mãe imunizada com OVA, que pode ser um mecanismo protetor para evitar antígenos livres na circulação da prole (FUSARO et al., 2007).

Além disto, a imunização materna pré-concepção com OVA é capaz de inibir a resposta IgE e a produção de citocinas Th2 e simultaneamente de aumentar a expressão do receptor inibidor Fc $\gamma$ RIIB em células das proles (VICTOR et al., 2010). É possível que a interação via imunocomplexo com Fc $\gamma$ RIIB possa gerar um sinal inibitório que previne a proliferação dos linfócitos B e conseqüentemente a secreção de anticorpos.

Outros grupos vêm demonstrando que a imunização de camundongos fêmeas durante a gestação com OVA é capaz inibir a produção de anticorpos IgE, controlar os níveis de IgG1 e aumentar os níveis de IgG2a anti-OVA (MELKILD et al., 2002). Além disto, foi mostrado que o aleitamento pode transferir o alérgeno (OVA) para o neonato e resultar em tolerância oral em camundongos, protegendo o desenvolvimento de doença



alérgica pulmonar na prole por um processo possivelmente mediado por células T reguladoras dependentes de TGF- $\beta$  (VERHASSELT et al., 2008).

Este fato salienta que a imunização prévia das mães é um procedimento profilático para evitar a sensibilização precoce das proles (FUSARO et al., 2007).

Algumas hipóteses sobre os mecanismos pelos quais os anticorpos derivados da imunização materna podem influenciar o sistema imune do feto têm sido propostas (RIGATO et al., 2009) tais como: formação de imunocomplexos dos anticorpos com antígenos livres na placenta que podem prevenir a sensibilização; interação do imunocomplexo com receptores inibidores Fc $\gamma$ RIIB presentes nos linfócitos B ou DCs regulando negativamente a função dos linfócitos B; anticorpos anti-idiotípicos que interagem com BCR ou TCR de linfócitos imaturos nos órgãos linfóides primários que podem selecionar negativamente os clones; anticorpos anti-idiotípicos que interagem com o BCR de células B maduras e regulam a diferenciação em plasmócitos ou que interagem com TCR de células T maduras e interferem na proliferação dos linfócitos ao antígeno. Além disto, a interação das citocinas provenientes da mãe com as células do feto pode induzir uma baixa expressão de moléculas co-estimulatórias nas DCs, e nos linfócitos T e B, como também, influenciar na geração de células T reguladoras (RIGATO et al., 2009).

## 2 OBJETIVOS

A dissertação teve como proposta investigar os mecanismos envolvidos na regulação da resposta alérgica da prole de camundongos mediado pela imunização materna com ovalbumina. O enfoque foi avaliar as vias de transferência de anticorpos e o impacto da imunização materna na ativação das DCs e no potencial em induzir células T reguladoras antígeno-específicas.

Para tal, os seguintes objetivos específicos foram desenvolvidos:

- Análise em mães imunizadas com OVA, presença de citocinas no líquido amniótico e anticorpos IgG anafiláticos e não anafiláticos, no leite presença de IgA e TGF- $\beta$ 1 e frequência de células T reguladoras no baço;
- Contribuição das vias placentária e da amamentação na transferência de anticorpos maternos e na regulação da resposta IgE da prole, avaliado pela troca de mães e proles durante a amamentação;
- Efeito da imunização materna com OVA no perfil de DCs CD11c<sup>+</sup> da prole não imunizada e na frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>;
- Avaliar a capacidade *in vitro* de DCs em gerar células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> em co-cultura com células de camundongos DO11.10 e na capacidade de supressão na resposta proliferativa antígeno-específica das células T CD4<sup>+</sup> de camundongos;

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Camundongos isogênicos BALB/c de ambos os sexos foram utilizados com seis a oito semanas de idade. As proles foram utilizadas aos 20 e 25 dias de idade (di). Camundongos BALB/c transgênicos com TCR específico para ovalbumina (DO11.10) adquiridos do Biotério Central – ICB/USP foram utilizados com oito semanas de idade em ensaios de co-cultura antígeno-específico. Ratos Wistar Furth (WF) isogênicos foram utilizados para reações de anafilaxia cutânea passiva (ACP).

Todos os experimentos em animais estão de acordo com os Princípios Éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (n°126 nas fls. 76 do livro 02) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n° 127/10).

#### **3.2 Antígeno**

Foi utilizado a ovalbumina (OVA, Grau V-Sigma, St. Louis, MO, EUA) para imunização de camundongos.

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

Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados por via subcutânea (sc) com 150 µg de OVA em 60 mg de Al (OH)<sub>3</sub> (Hidróxido de alumínio – FURP, São Paulo) e 85µL de salina. Um reforço intraperitoneal (ip) com 100 µg de OVA em 190 µL de salina foi realizado no 10° dia pós-imunização (dpi) e no 20° dpi, um dia após, as fêmeas foram acasaladas com machos BALB/c não imunizados. As proles foram utilizadas em variados períodos.

### 3.4 Protocolo de imunização de neonatos e de jovens com OVA

Os filhotes de ambos os sexos foram imunizados aos 3 di com 10 $\mu$ g de OVA em 6 mg de Al (OH)<sub>3</sub> e 9  $\mu$ l de salina pela via ip e reforçados no 10° dpi pela via ip com 10  $\mu$ g de OVA em 199,0  $\mu$ l de salina e sangradas pelo plexo-retroorbital em idades variadas (2, 20, 50 e 80 di) os soros foram estocados a -20 °C. A imunização de camundongos jovens foi realizada nas proles aos 25 di com 150  $\mu$ g de OVA em 60 mg de Al (OH)<sub>3</sub> em 85 $\mu$ L de salina ip, no 10° dpi foi realizado um reforço ip e no 17° dpi os camundongos foram sangrados e os soros estocados a -20 °C.

### 3.5 Protocolo de troca de proles em período neonatal

Para avaliar o efeito da transferência de fatores da mãe para a prole via placenta ou via leite materno, foi realizado um protocolo de troca de proles entre as mães submetidas ou não ao protocolo de imunização. As proles com 0 ou 1 di foram retiradas das mães imunizadas ou não antes da gestação para serem amamentadas por mães imunizadas ou não. Posteriormente, as proles foram imunizadas aos 25 di e avaliadas quanto à produção de anticorpos IgE anti-OVA.

Os seguintes grupos foram realizados:

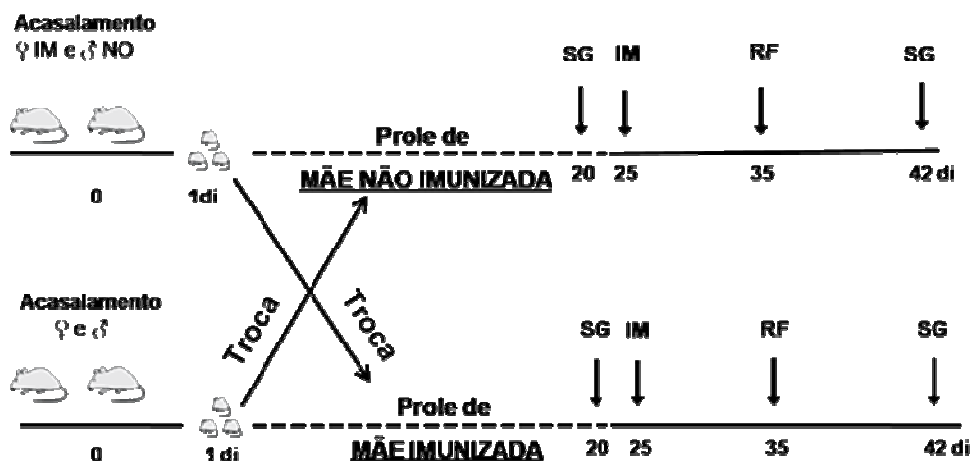
Prole de mães não imunizadas, amamentadas por mães não imunizadas (Prole de mãe NIM / Am NIM).

Prole de mães imunizadas e amamentadas por mães imunizadas (Prole de mãe IM / Am IM).

Prole de mães imunizadas e amamentadas por mães não imunizadas (Prole de mãe IM / Am NIM).

Prole de mães não imunizadas e amamentadas por mães imunizadas (Prole de mãe NIM / Am IM).

Esquema de troca de proles:



### **3.6 Protocolo para coleta de líquido amniótico e do leite**

As amostras de líquido amniótico foram coletadas por cesárea no período correspondente ao 21º dia de gestação. Após a coleta em pool foi centrifugada e armazenada a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso.

Amostras de leite foram obtidas diretamente do estômago dos filhotes provenientes das mães imunizadas ou não com OVA como descrito por Fusaro et al. (2007). Resumidamente, os filhotes com 10 dias de idade logo após a amamentação foram anestesiados, sacrificados e o leite foi obtido através de uma incisão cirúrgica no estômago. As amostras de leite foram diluídas 1:1 em solução fisiológica e centrifugadas por 10 minutos a 6000 rpm.

### **3.7 Análise de anticorpos IgE e IgG1 anti-OVA por reação de Anafilaxia Cutânea Passiva (ACP)**

A análise dos anticorpos IgE anti-OVA nos soros das proles foi realizado por ACP em ratos WF de acordo com o método descrito por Mota e Wong (1969). As diluições das amostras de soros individuais foram inoculadas intradermicamente no dorso de ratos tricotomizados (50  $\mu\text{L}$ ). Após 18 horas, os ratos foram desafiados pela via intravenosa com 0,5 mg de OVA em 1 mL de azul de Evans. Após uma hora os ratos foram sacrificados por eutanásia em câmara de  $\text{CO}_2$  e o título do soro foi considerado como a recíproca da maior diluição que apresentasse reação acima de 5 mm de diâmetro.

A determinação do título de anticorpos IgG1 por ACP foi feita segundo a técnica descrita por Ovary (OVARY, 1958). Os soros dos camundongos imunizados foram previamente inativados por 1h a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  para eliminar a atividade dos anticorpos da classe IgE. O dorso de camundongos BALB/c foi tricotomizado 24 h antes da realização da ACP e foram injetadas por via intradérmica diluições seriadas de pool de soro (50  $\mu\text{L}$ ) dos animais imunizados ou não. Após duas horas de sensibilização, os camundongos foram desafiados por via retroorbital com a injeção de 500  $\mu\text{L}$  de solução contendo azul de Evans a 0,25% e 0,25 mg de OVA. O teste foi realizado em triplicata, e o título do soro considerado como a recíproca da maior diluição com reação acima de 5 mm de diâmetro.

### **3.8 Obtenção de células esplênicas e purificação de DCs**

Os animais foram anestesiados e o baço foi removido de forma asséptica e depositado em placas de petri contendo meio de cultura RPMI 1640 (Sigma). O baço foi fragmentado com peneiras de nylon para cultura celular (*Cell Strainer* – BD Biosciences, MA, EUA) e a suspensão celular obtida foi centrifugada por 20 minutos à 2000 rpm e separada através do gradiente de Ficoll Hypaque (densidade - 1095). A seguir, a suspensão celular foi lavada por centrifugação por 10 minutos a 200g em meio RPMI por 2 vezes. Posteriormente, as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura RPMI com 10% de soro fetal bovino (SFB – HyClone III, Logan, EUA). As células foram quantificadas em contador automático (Cell Dyn 1400, Abbott) e a viabilidade observada com azul de tripan 0,5% em câmara de Neubauer.

As DCs do baço foram purificadas utilizando o Kit de microesferas para purificação de células CD11c<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). As células esplênicas foram centrifugadas e incubadas com anticorpo monoclonal anti-CD16/32 para bloqueio do receptor Fc (PharMingen). Uma solução de microesferas CD11c (N418) por 10<sup>8</sup> células foi incubada por 15 minutos a 4 °C, em seguida após lavagens as células foram submetidas à seleção positiva no separador magnético MACS. Em seguida, a coluna foi lavada e as células retidas na coluna foram removidas pela adição de 1 mL de tampão. O grau de pureza da população que foi utilizada nos experimentos foi maior que 90% por citometria de fluxo.

### **3.9 Co-cultura de DCs CD11c<sup>+</sup> com células T CD4<sup>+</sup> de camundongos DO11.10**

Os ensaios foram realizados com DCs esplênicas purificadas de proles de mães imunizadas ou não e co-cultivadas com células T CD4<sup>+</sup> purificadas de camundongos DO.11.10. As DCs purificadas (1 x10<sup>5</sup>/orifício) foram incubadas em microplaca de 96 orifícios (Costar) com OVA (400µg/ml) em meio RPMI enriquecido com 10% de SFB (HyClone) em 200 µL/orifício por 24 horas a 37° C a 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as DCs pulsadas com OVA foram lavadas e foram adicionados linfócitos T CD4<sup>+</sup> purificados de camundongos DO11.10 na proporção de 1:4 x10<sup>5</sup>/ orifício. Após 72 horas de cultura as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> foram analisadas por citometria de fluxo.

### 3.10 Avaliação da função supressora dos linfócitos T CD4+CD25+FoxP3+ gerados em co-cultura com DCs purificadas

As DCs purificadas ( $1 \times 10^5$ /orifício) foram incubadas em microplaca de 96 orifícios (Costar) com OVA (400 $\mu$ g/ml) em meio RPMI enriquecido com 10% de SFB (HyClone), em 200  $\mu$ L/orifício por 24 horas a 37° C a 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as DCs pulsadas com OVA foram lavadas e foram adicionados linfócitos T CD4+ purificados de camundongos DO11.10 na proporção de 1:4  $\times 10^5$ / orifício. Após 72 horas de cultura, foram adicionados esplenócitos de camundongos BALB/c *wild type* (WT)  $5 \times 10^4$ /orifício, marcados com carboxifluoresceínadiacetato succinimidil éster (CFDA,SE, Sigma) e pulsados com anti-CD3 (2 $\mu$ g/mL, PharMingem). Após 72 horas de incubação, a resposta proliferativa foi avaliada por citometria de fluxomultiparamétrica.

### 3.11 Citometria de fluxo

**Marcação extracelular:** A marcação foi realizada para avaliar a expressão de marcadores de ativação/co-estimulação (I-A<sup>d</sup>, CD80, CD86, CD40) em DCs (CD11c+) de proles de camundongos de mães imunizadas ou controles, bem como de controle de pureza de populações celulares obtidas por seleção positiva como as DCs e as células TCD4+.

Células na concentração de  $0,5 \times 10^6$  foram transferidas para tubos de ensaio, centrifugadas e lavadas em solução de PBS contendo 1% de SAB (PBS-SAB) a 4 °C por duas vezes. No botão de células foi adicionado anticorpo monoclonal para CD4, CD11c, I-A<sup>d</sup>, CD80, CD86, CD40, e CD25 marcados com complexo peridina-clorofila-proteína (PerCP), ficoeritrina (PE), ou fluoresceína (FITC) ou com respectivos anticorpos isotípicos procedentes da BD-PharMingem (CA, USA) diluídos em tampão PBS-SAB e incubados por 30 minutos a 4 °C. Após nova lavagem, as células foram ressuspensas em solução isotônica e analisadas no aparelho de citometria de fluxo da Coulter-Epics XL (Beckman Coulter, CA, EUA) com aquisição de 30.000 eventos dentro da região de DCs.

**Marcação intracelular:** Para quantificar as células TCD4+CD25+FoxP3+ das proles e mães imunizadas as células tiveram marcação extracelular para anti-CD4 e anti-CD25 e posteriormente foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos a 4° C e lavadas com tampão PBS/1%BSA. Posteriormente, as células foram incubadas com anti-FoxP3 PE (e-Bioscience, CA, EUA) em tampão PBS/0,5%/Saponina por 30 minutos a 4° C. Após nova lavagem, as células foram ressuspensas em solução isotônica e analisadas

no aparelho de citometria de fluxo da Coulter-Epics XL (Beckman Coulter, CA, EUA), com aquisição de 30.000 eventos dentro da região de linfócitos T CD4+.

**Marcação da resposta proliferativa:** Células da co-cultura marcadas com CFSE na concentração de  $5 \times 10^4$  foram transferidas para tubos de ensaio centrifugadas e lavadas em solução de PBS contendo 1% de SAB (PBS-SAB) a 4 °C por duas vezes. No botão de células foi adicionado anticorpo monoclonal para CD3(PE), CD4 (PerCP) e CD25 (APC), diluídos em tampão PBS-SAB e incubados por 30 minutos a 4 °C. Após nova lavagem, as células foram ressuspensas em solução isotônica e analisadas no aparelho de citometria de fluxo da BD LRSFortessa (BD-Pharmingem, CA, EUA), com aquisição de 30.000 eventos dentro da região de células T CD4+. Para análise das aquisições foi utilizado o programa FlowJo 7.6.5 (Treestar, Ashland, OR).

### **3.12 Determinação da concentração de citocinas pró-inflamatórias por citometria de fluxo**

A dosagem de citocinas no líquido amniótico foi realizada utilizando-se o Kit Mouse Inflammation Kit Cytometric Bead Array (CBA), (BD Pharmingen, CA, USA), no qual foram dosadas as citocinas: IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12p70. As amostras de líquido amniótico e a curva de concentração padrão foram incubadas com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após as incubações, foi acrescentado 1mL da solução de lavagem e centrifugado por 10 minutos a 1100 rpm. Retirou-se o líquido amniótico e com 300 $\mu$ L da solução de lavagem ressuspendeu-se as amostras para as aquisições no citômetro de fluxo. As aquisições das amostras foram realizadas no citômetro BD FACS Calibur (BD&Bioscience) e os resultados foram gerados em formato gráfico e tabular utilizando BD CBA Analysis Software (BD&Bioscience). O método prevê uma detecção de 0- 5000pg/mL de citocinas. A sensibilidade do kit é de 5 pg/ml para IL-6, de 17,5 pg/ml para IL-10, de 52,7 pg/ml para MCP-1, de 2,5 pg/ml para IFN-g, de 7,3 pg/ml para TNF e de 10,7 pg/ml para Il-12p70.

### **3.13 ELISA para determinação de anticorpos IgA, IgM e subclasses de IgG anti-OVA**

Para detecção de anticorpos IgA, IgM e subclasses de anticorpos IgG anti-OVA os orifícios de microplacas foram incubados com 5 $\mu$ g/mL de OVA diluído em TCB 0,1 M (pH 9,5) por 18 horas à 4 °C. Após bloqueio com solução de PBS contendo 1% SAB (Sigma),



as placas foram lavadas e incubadas com diluições seriadas das amostras ou da Ig padrão (Southern). Em seguida, incubadas com anticorpos biotinizados específicos para IgA, IgM ou as subclasses IgG (Southern). Posteriormente, após lavagens, foi adicionado estreptoavidina peroxidase (Sigma) e seguida de uma incubação de 1 hora à 37 °C. A atividade enzimática foi detectada pela adição de TMB (Calbiochem) e a reação bloqueada com ácido sulfúrico 1M. A leitura será realizada a 450nm em leitor de ELISA (Molecular Devices, CA, USA). Para determinar o log dos anticorpos anti-OVA os valores obtidos foram expressos de acordo com o Log da diluição limite de reatividade dos anticorpos, utilizando como referência soros de camundongo imunizados.

### **3.14 Avaliação da citocina TGF- $\beta$ 1**

A determinação da citocina TGF- $\beta$ 1 foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) seguindo as recomendações do fabricante (Promega Corporation, Madison, WI - EUA). Os orifícios das microplacas de 96 poços (Costar) foram sensibilizados com anticorpo monoclonal anti-TGF- $\beta$ 1 (1:100) em TCB 0,1 M (pH 9,5) a 4 °C por 20 horas. As microplacas foram bloqueadas com solução de bloqueio (Promega, Kit TGF- $\beta$ ). Após este procedimento, diluições das amostras e a respectiva citocina recombinante foram incubadas por 1 hora e 30 minutos à t.a. sob agitação constante, lavadas e incubadas com anticorpos anti-TGF- $\beta$ . Após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo anti-TGF- $\beta$ 1 conjugado à peroxidase e a reação desenvolvida com a adição de TMB (Promega, Kit TGF- $\beta$ ) e bloqueada com ácido fosfórico 1,0 M. A leitura foi realizada a 450 nm em leitor de microplaca de ELISA (Biorad, USA). As concentrações foram obtidas pela interpolação dos valores de densidade óptica (DO) das amostras na curva padrão. Os limites de detecção de TGF- $\beta$ 1 foram de 32 pg/ml.

### **3.15 Análise estatística**

Os grupos foram analisados pelo teste não paramétrico *Mann-Whitney* ou quando comparado três grupos por ANOVA (paramétrico) com pós-teste de *Dunn's*. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando o erro alfa for  $\leq 0.05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Determinação de citocinas no líquido amniótico e no leite de mães imunizadas com OVA

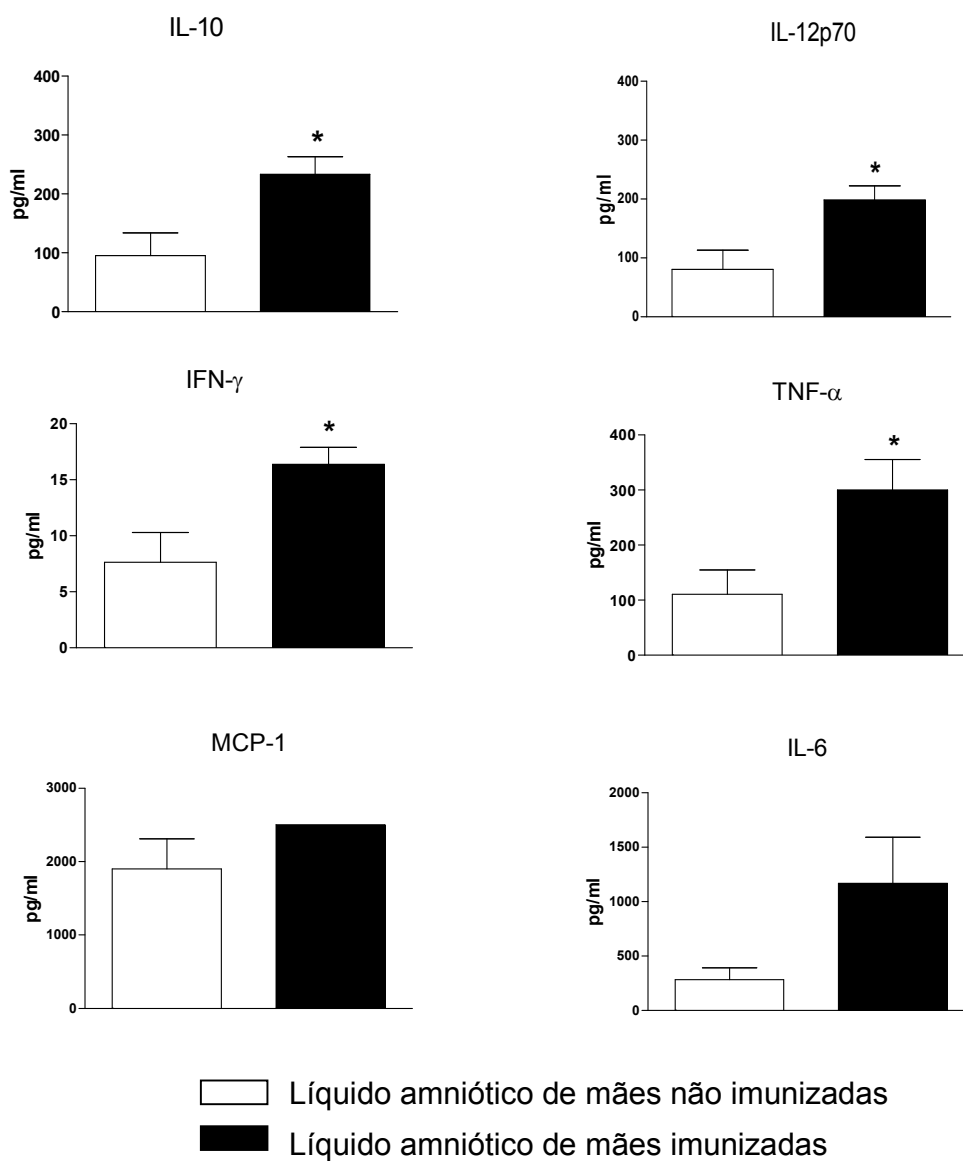
Previamente, observamos que a imunização materna pré-concepção com OVA foi capaz de inibir a resposta IgE da prole imunizada em período neonatal (FUSARO et al., 2007, 2009, VICTOR et al., 2010). Para avaliar os mecanismos envolvidos na regulação da resposta alérgica verificamos inicialmente a análise de citocinas no líquido amniótico e no leite de mães imunizadas com OVA pré-concepção. Para tal, camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados com OVA, desafiados por duas vezes e acasalados no 21º dpi. As amostras de líquido amniótico foram coletadas no 21º dia de gestação por cesárea. As amostras de leite foram obtidas diretamente do estômago do neonato com 10 di como descrito por Fusaro et al. (2002).

A presença de IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12p70 foram analisadas em amostras individuais de líquido amniótico (n=6) ou com *pool* de amostras de leite (2 *pools*/cada contendo 6 amostras) por citometria de fluxo utilizando o kit Mouse Inflammation, Cytometric Bead Array.

A Figura 1 mostra que os níveis de IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12p70 no líquido amniótico de camundongos imunizados estão significativamente elevados quando comparado ao grupo de mães controle. Já os níveis de IL-6 e da quimiocina MCP-1 das mães imunes foram similares em relação ao grupo controle.

No leite as citocinas analisadas não foram detectáveis pelo método utilizado.

Os resultados mostram que a imunização pré-concepcional com OVA, eleva significativamente algumas citocinas no líquido amniótico na gestação, seja com perfil inflamatório como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12p70 ou regulatório como a IL-10. Entretanto, não interferiu no nível das citocinas no leite das mães imunizadas.

**Figura 1** - Quantificação de citocinas no líquido amniótico de mães imunizadas com OVA.

Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados ou não com OVA, reforçados no 10° e 20° dpi e acasalados aos 21 dpi. As amostras de líquido amniótico (n=6) foram coletadas no 21° dia após o acasalamento por cesárea e analisadas por citometria de fluxo utilizando o Kit Mouse Inflammation (CBA). As barras representam média  $\pm$  desvio padrão. \* $P \leq 0,05$  em relação ao grupo de mães não imunizadas (controle).

#### **4.2 Determinação de TGF- $\beta$ 1 e anticorpos anti-OVA no leite de mães imunizadas com OVA**

Proseguimos a avaliação se a imunização materna com OVA transfere pelo leite TGF- $\beta$ 1 e anticorpos IgA e IgG anti-OVA à prole. As amostras individuais de leite foram retiradas do estômago da prole aos 10 di para análise de TFG- $\beta$ 1 e aos 10 di para avaliar os níveis dos anticorpos IgA e IgG anti-OVA por ELISA.

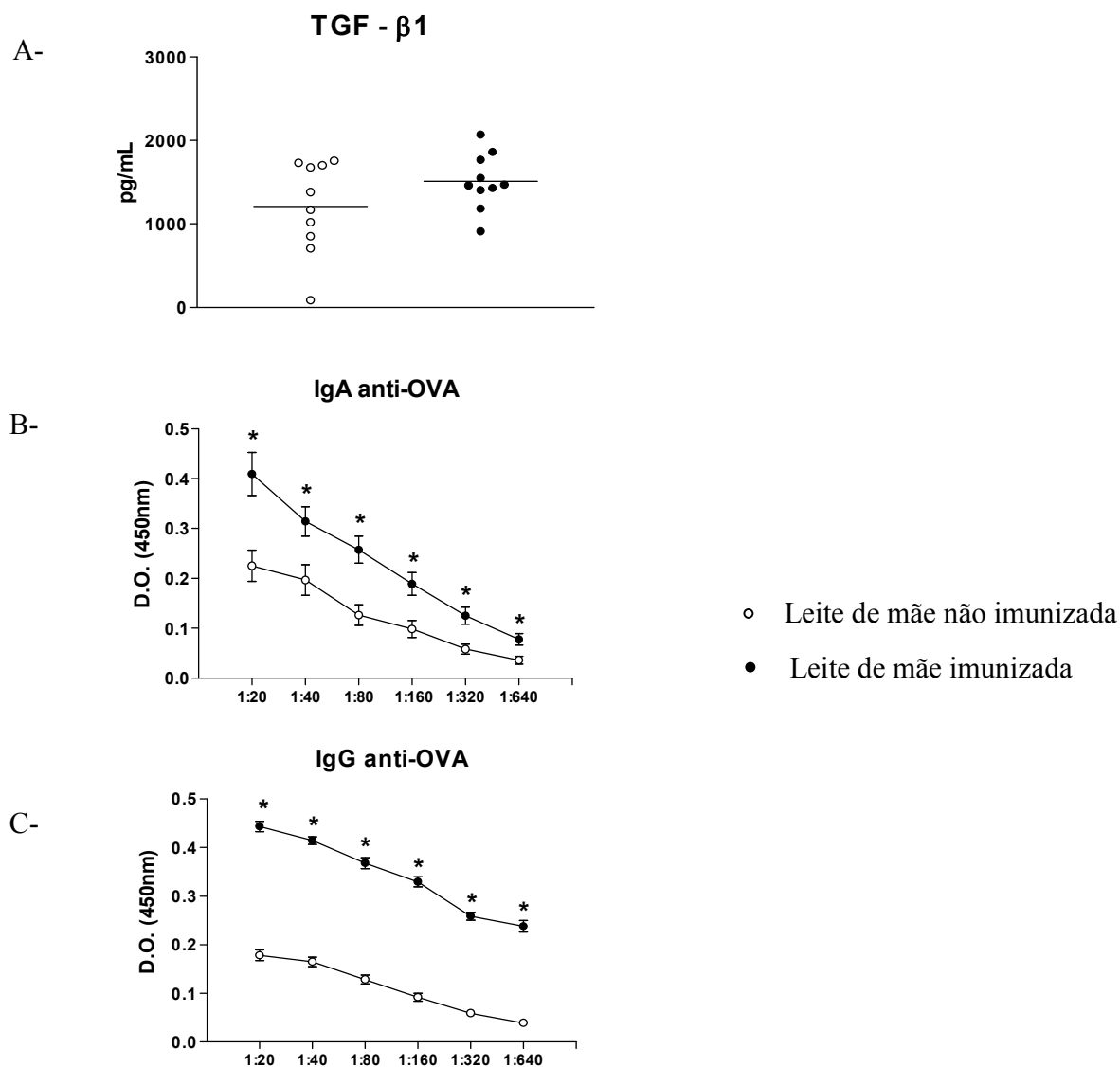
A Figura 2a mostra transferência de níveis fisiológicos de TGF- $\beta$ 1 pelo leite nas mães imunizadas e mães controle.

A presença de anticorpos anti-OVA no leite foi coletada em um período posterior (10 di) para facilitar a obtenção das amostras pela prole, para análise individual de anticorpos IgA e IgG anti-OVA por ELISA.

A Figura 2b e 2c mostra que pela amamentação há transferência de elevados níveis de anticorpos IgA e IgG anti-OVA pela mãe imunizada à prole.

Os resultados mostram que os níveis de TGF- $\beta$ 1 detectados no leite mantém-se em níveis normais com a imunização materna e que esta via é importante na transferência passiva de anticorpos IgG à prole.

**Figura 2** - Níveis de TGF- $\beta$ 1 e anticorpos IgA e IgG anti-OVA no leite de mães imunizadas com OVA.



Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados ou não com OVA, reforçados no 10<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dpi e acasalados aos 21 dpi. As amostras de leite (n=8-10) foram coletadas diretamente do estômago dos filhotes com 10 di para determinação dos níveis de TGF- $\beta$ 1 (A) e aos 10 di para avaliação de anticorpos IgA (B) e IgG anti-OVA (C) por ELISA. \* $P \leq 0,05$  quando comparado à prole não imunizada. O traço horizontal representa a média dos valores obtidos (A) e a média  $\pm$  DP (B e C).

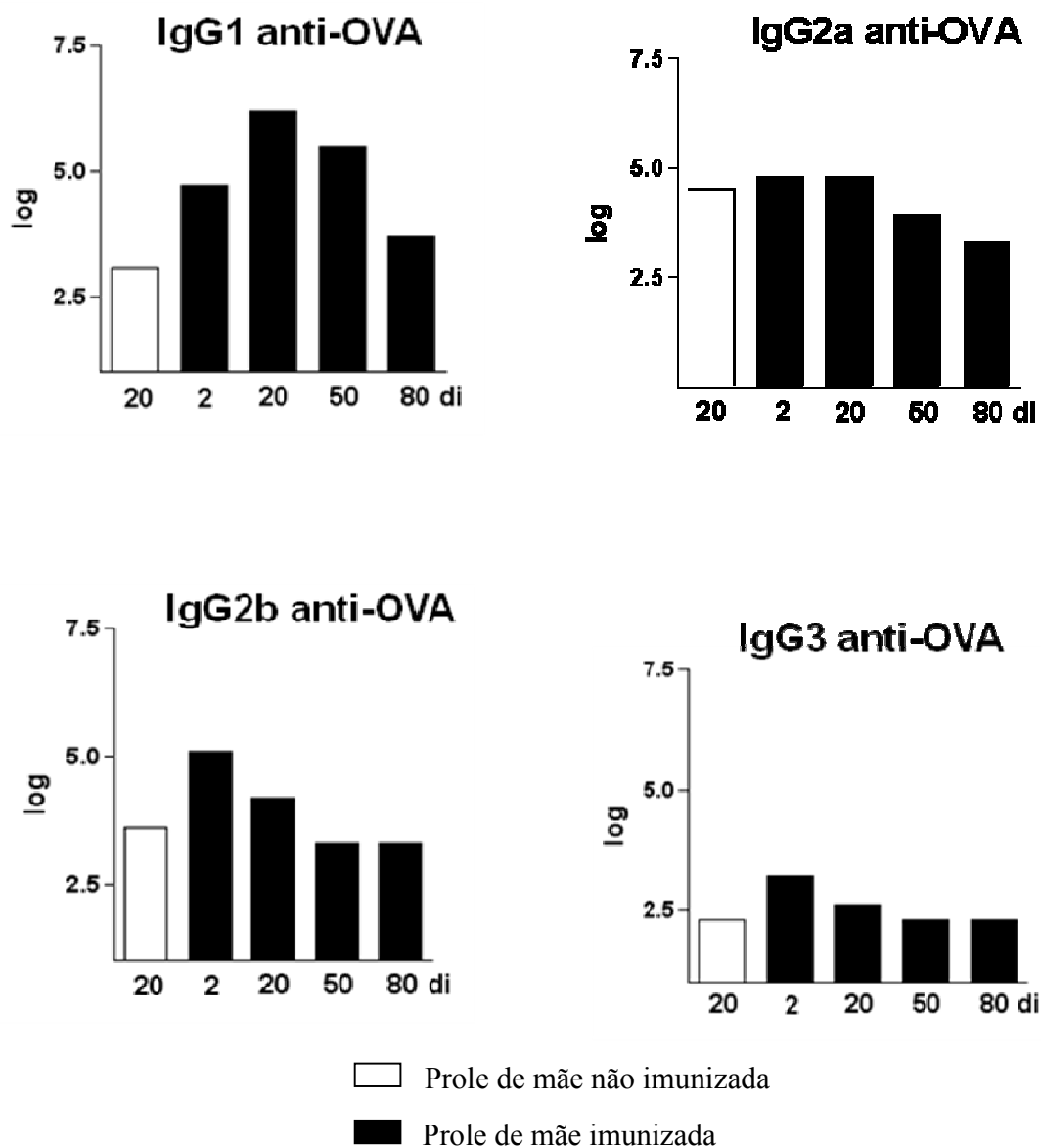
### **4.3 Transferência de anticorpos maternos IgG anti-OVA e a sua permanência na circulação da prole**

Em seguida, avaliamos no soro da prole as subclasses de IgG anti-OVA e a cinética de duração dos anticorpos maternos transferidos. Para isso, camundongos BALB/c fêmeas imunizados ou não com OVA foram acasalados no 21º dpi e as proles avaliadas aos 2, 20, 50 e 80 di para determinação de anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti-OVA no soro por ELISA. A análise foi realizada com um pool de soro (n=10 amostras) para viabilizar a cinética.

Na Figura 3 observamos elevados níveis de anticorpos IgG1 anti-OVA aos 2 di, que indica a transferência vertical por via placentária, os níveis de anticorpos elevaram-se aos 20 di devido a amamentação e diminuíram gradualmente até os 80 di. Os anticorpos IgG2b anti-OVA foram detectáveis até os 20 di enquanto que não foram observadas alterações nos níveis de IgG2a e IgG3 anti-OVA (Fig. 3).

Os resultados mostram que a transferência materna de anticorpos IgG anti-OVA à prole é majoritária de IgG1, seguida de IgG2b, IgG2a e IgG3.

**Figura 3** - Permanência das subclasses de anticorpos maternos IgG anti-OVA no soro da prole.



Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados ou não com OVA, reforçados no 10° e 20° dpi e acasalados aos 21 dpi. Amostra de soro em *pool* (n=10) para cada período, 2, 20, 50 e 80 di foram analisadas por ELISA.

#### **4.4 Transferência de anticorpos maternos IgG1 anafiláticos para a prole**

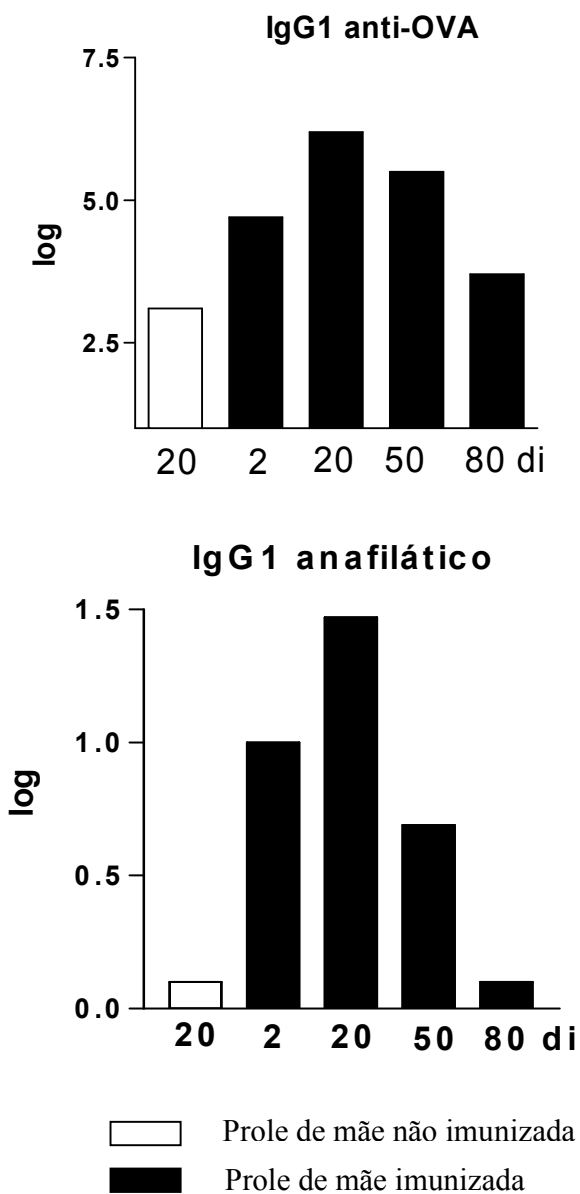
Como observamos que a transferência materna de anticorpos IgG anti-OVA é majoritária de IgG1, avaliamos se há transferência de anticorpos IgG1 anafiláticos. Em camundongos, os anticorpos da subclasse IgG1 podem exercer atividade anafilática e podem ser avaliados pela reação de ACP em camundongos (MOTA I, WONG D, 1969). As proles de mães imunizadas com OVA foram sangradas aos 2, 20, 50 e 80 di e o *pool* de amostra de soro de cada dia foi analisado quanto à presença de anticorpos IgG1 anafiláticos anti-OVA por reação de ACP em camundongos e também para IgG1 anti-OVA por ELISA.

Na Figura 4 pode-se observar que os anticorpos IgG1 anafiláticos anti-OVA são detectáveis no soro das proles já aos 2 di, com pico aos 20 di e indetectáveis aos 80 di. A avaliação de anticorpos IgG1 anti-OVA por ELISA mostrou um perfil similar, mas com diminuição acentuada até os 80 di.

Estes resultados mostram que a imunização materna com OVA é capaz de transferir anticorpos IgG1 anti-OVA para a prole, sem seletividade dos anticorpos, sejam com função anafilática ou não, por ambas as vias placentária e pelo leite.



**Figura 4** - Transferência de anticorpos IgG1 anti-OVA anafiláticos à prole.



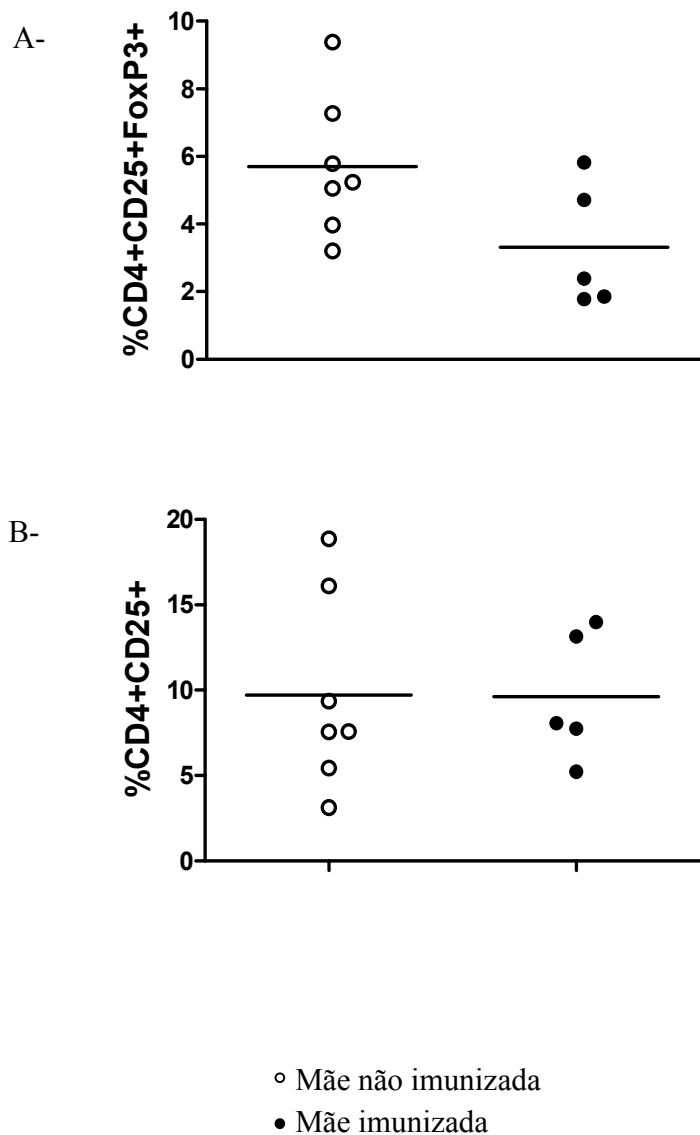
Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados com OVA, reforçados no 10<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dpi e acasalados no 21<sup>o</sup> dpi. As proles obtidas foram sangradas aos 2, 20, 50 e 80 di, e as amostras foram analisadas em pool (n=10) para a detecção de anticorpos IgG1 anti-OVA por ELISA ou anafiláticos por reação de ACP em camundongos. As proles não imunizadas foram avaliadas aos 20 di.

#### **4.5 Efeito da imunização materna com OVA nas células T CD4+CD25+FoxP3+ esplênicas**

A imunização com OVA e a gestação são fatores que podem influenciar na geração de células reguladoras. Avaliamos a frequência de células T CD4+CD25+FoxP3+ no baço de mães imunizadas após o período de amamentação. Para isso, camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados com OVA, desafiados por duas vezes e acasalados no 21º dpi. Após o período de amamentação, aproximadamente no 25º dia após o nascimento das proles, a mãe foi sacrificada e as células T CD4+CD25+FoxP3+ esplênicas foram avaliadas por citometria de fluxo.

A imunização materna não interferiu no percentual de células T CD4+CD25+FoxP3+ (Fig 5a), bem como de CD4+CD25+ (Fig 5b) quando comparado ao grupo controle. Os dados foram analisados no período pós-amamentação e sugerem uma queda do número das células T reguladoras em mães imunizadas.

**Figura 5** - Frequência de células T CD4+CD25+FoxP3+ em mães imunizadas com OVA.



Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados ou não e as células foram analisadas após o período de desmame da prole, que corresponde aos 25 di. As células do baço foram avaliadas quanto a expressão de CD25 e FoxP3 em células T CD4+ (30.000 eventos) por citometria de fluxo.

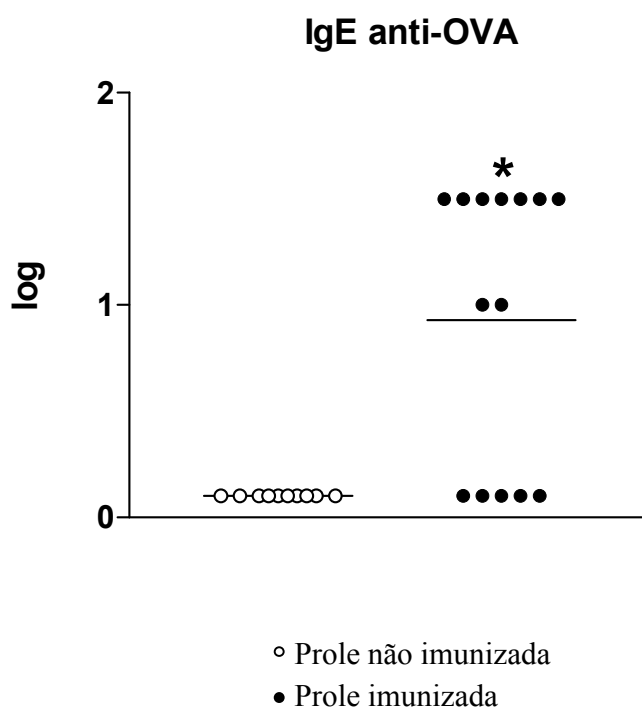
#### **4.6 Resposta humoral na imunização neonatal com OVA**

Com a análise da imunização materna e transferência de anticorpos à prole, prosseguimos para avaliar o efeito da imunização materna na resposta IgE da prole, para tal, avaliamos inicialmente a resposta humoral na imunização neonatal da prole de mães controles não imunizadas. Previamente, já observamos que a imunização neonatal de camundongos BALB/c com OVA aos 3 di é capaz de induzir a resposta IgE na prole (FUSARO et al., 2007), no entanto o perfil das subclasses de anticorpos IgG anti-OVA não foi determinado.

Para tal, camundongos BALB/c fêmeas não imunizadas foram acasalados e as proles obtidas foram imunizadas aos 3 di, reforçadas aos 13 di e sangradas aos 20 di para determinação dos anticorpos IgE anti-OVA da prole por reação de ACP e para determinar os níveis das subclasses de IgG por ELISA.

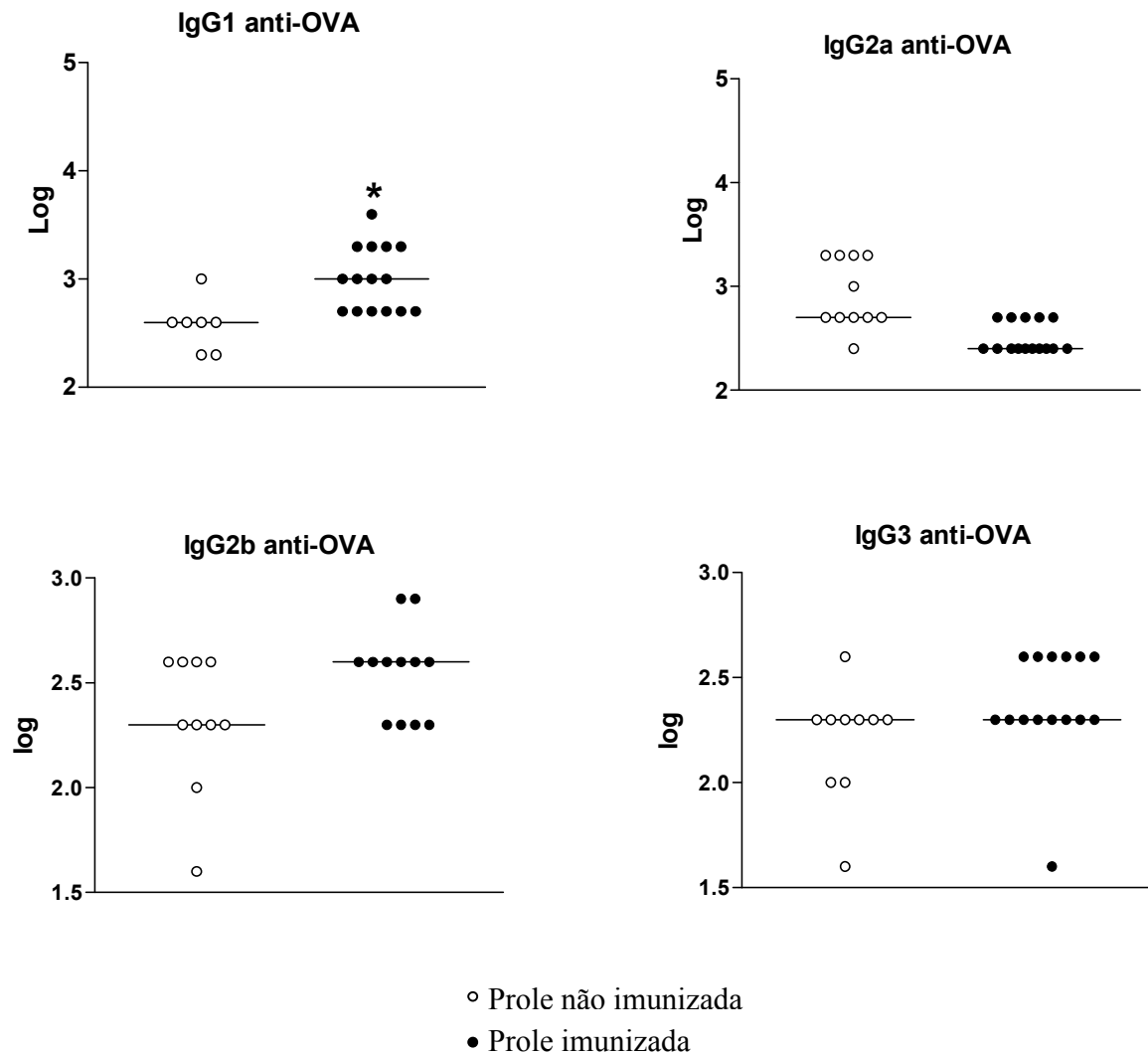
A imunização no período neonatal foi capaz de induzir a produção de anticorpos IgE anafiláticos (Fig 6) e anticorpos IgG1 anti-OVA com baixos níveis de IgG2a, IgG2b e IgG3 (Fig 7). A produção de anticorpos IgE anafiláticos evidencia que o protocolo de imunização no período neonatal foi capaz de sensibilizar as proles em fase neonatal.

**Figura 6** - Produção de anticorpos IgE anti-OVA em camundongos imunizados em período neonatal com OVA.



As proles, provenientes de acasalamentos de camundongos BALB/c, foram imunizadas ou não com OVA aos 3 di, reforçadas aos 13 di, sangradas aos 20 di e os soros avaliados individualmente quanto à presença de anticorpos IgE anti-OVA por reação de ACP. \* $P \leq 0,05$  quando comparado à prole não imunizada. O traço horizontal representa a mediana dos valores.

**Figura 7** - Produção de subclasses de anticorpos IgG anti-OVA em camundongos imunizados em período neonatal com OVA.



As proles provenientes de acasalamentos de camundongos BALB/c, foram imunizadas ou não com OVA aos 3 di, reforçadas aos 13 di, sangradas aos 20 di e os soros (n=10) avaliados individualmente para determinarmos os níveis de anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 por ELISA.\*  $P \leq 0,05$  quando comparado à prole não imunizada. O traço horizontal representa a mediana dos valores.

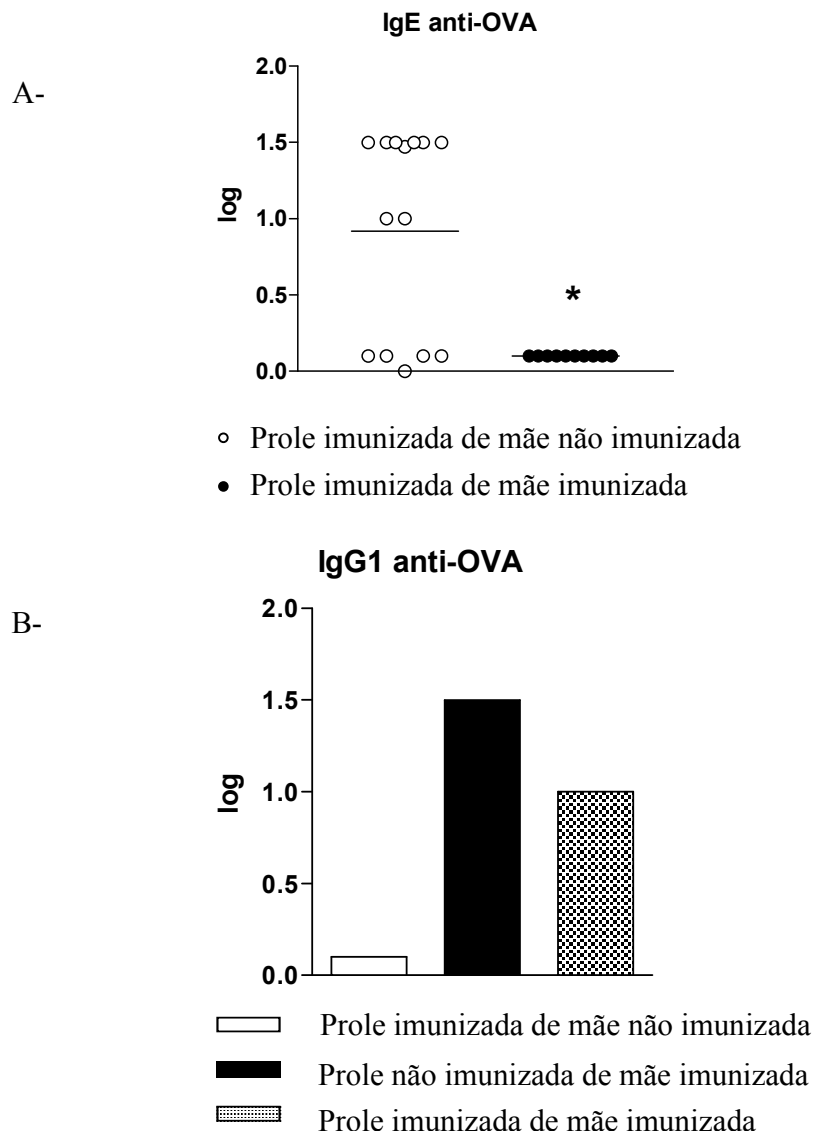
#### **4.7 Efeito da imunização materna na produção de anticorpos IgE e IgG1 anafiláticos da prole imunizada em período neonatal**

Proseguimos para avaliar o efeito da imunização materna com OVA na produção de anticorpos anafiláticos IgE e IgG1 anti-OVA da prole imunizada em período neonatal. Para tal, camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados ou não com OVA, acasaladas e as proles imunizadas com OVA aos 3 di, reforçadas aos 13 di e sangradas aos 20 di. Para detecção de anticorpos anafiláticos IgE anti-OVA, as amostras foram analisadas por reação de ACP em ratos ou em pool para determinação de anticorpos anafiláticos IgG1 anti-OVA por reação de ACP em camundongos.

Na Figura 8a observamos inibição da produção de anticorpos IgE anti-OVA nas proles de mães imunizadas em comparação aos grupos de proles de mães não imunizadas. A imunização da prole com OVA não induz anticorpos IgG1 anafiláticos. Em contraste, a imunização da prole quando associada com a imunização materna parece controlar os níveis de anticorpos IgG1 anti-OVA das proles imunizadas comparada com as proles controles de mães imunizadas (Fig 8b).

Os resultados confirmam dados anteriores que a imunização materna com OVA é capaz de prevenir a produção de anticorpos IgE e capaz de controlar os níveis de anticorpos IgG1 anafiláticos da prole imunizada.

**Figura 8** - Imunização materna com OVA inibe a produção de anticorpos IgE e IgG1 anafiláticos da prole imunizada.



Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados ou não com OVA, reforçados no 10º e 20º dpi e acasalados no 21º dpi. As proles foram imunizadas ou não com OVA aos 3 di, reforçadas aos 13 di e sangradas aos 20 di. As amostras foram analisadas individualmente por reação de ACP em ratos para a detecção de anticorpos IgE anti-OVA (A) e para determinar os níveis de anticorpos IgG1 anafiláticos anti-OVA (B), as amostras foram utilizadas em pool (n=10) e testadas por reação de ACP em camundongos. \* $P \leq 0,05$ .

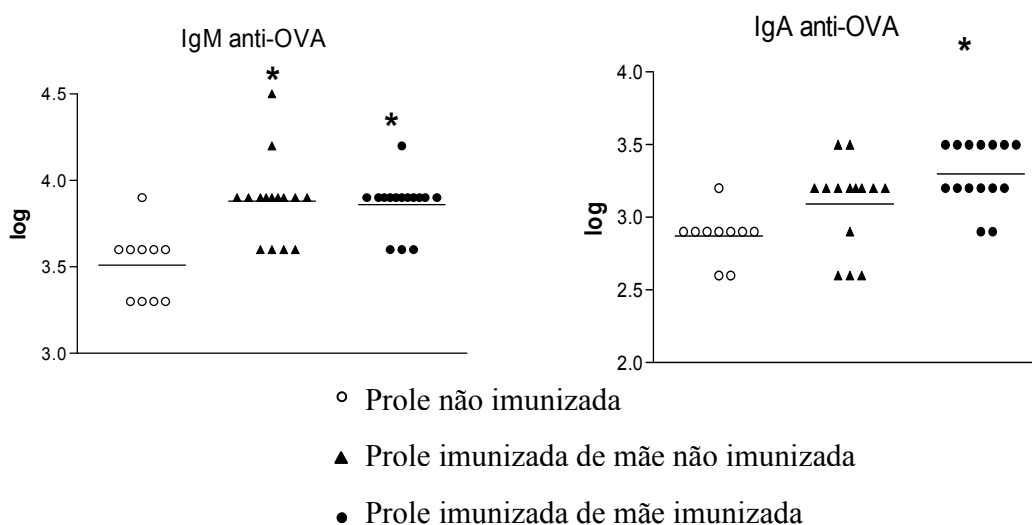


#### 4.8 Efeito da imunização materna na produção de anticorpos IgM e IgA anti-OVA das proles imunizadas

As classes IgM e IgA não são transferidas por via placentária, mas avaliamos se a imunização materna com OVA pode interferir na produção de anticorpos IgM e IgA anti-OVA da prole de camundongos imunizados em idade neonatal. Para tal, camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados com OVA, acasalados, as proles foram imunizadas aos 3 di com OVA e aos 20 di os anticorpos IgM e IgA anti-OVA foram analisados por ELISA.

A Figura 9 mostra que a imunização materna não interferiu na produção de anticorpos IgM e IgA anti-OVA da prole imunizada, os níveis foram equivalentes às proles imunizadas de mãe controle.

**Figura 9** - Produção de anticorpos IgM e IgA anti-OVA em camundongos imunizados em período neonatal de mães imunizadas.



Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados ou não com OVA, reforçados no 10° e 20° dpi e acasalados aos 21 dpi. As proles foram imunizadas com OVA aos 3 di, reforçadas aos 13 di, e os soros coletados aos 20 di (n=10-15) avaliados quanto à presença de anticorpos IgM e IgA anti-OVA por ELISA. \* $P \leq 0,05$  quando comparado à prole não imunizada. O traço horizontal representa a mediana dos valores obtidos.

#### **4.9 Análise das vias de transferência de anticorpos IgG maternos à prole**

Para avaliarmos a influência da via placentária ou pelo leite na transferência de anticorpos IgG à prole foi realizado a troca dos neonatos de mães imunizadas para serem amamentados por mães não imunizadas e vice-versa. Para tal, camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados e acasalados no 21º dpi. A gestação foi monitorada e logo após o nascimento, os neonatos de mães imunizadas foram transferidos para as mães controle (não imunizadas) e os provenientes de mães controle foram colocados para serem amamentados pela mãe imunizada.

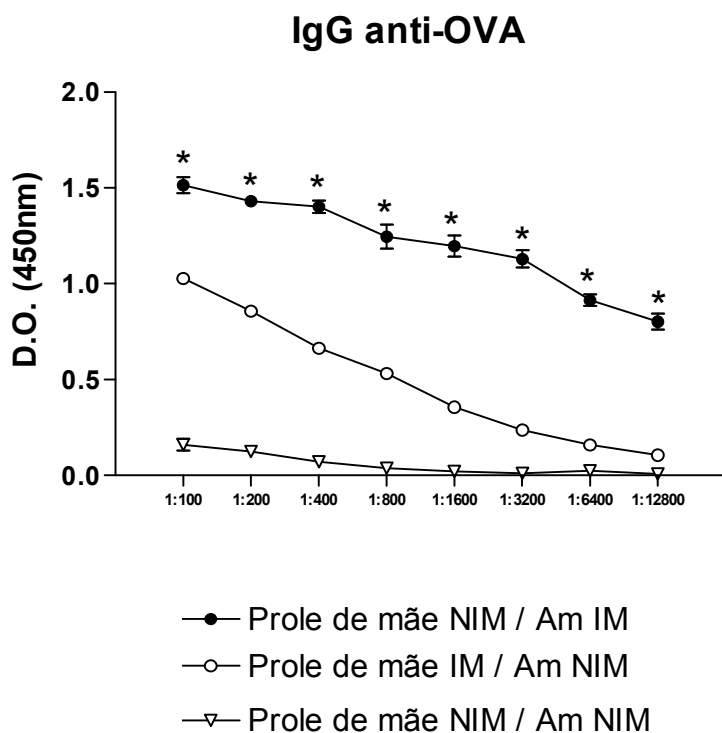
As proles de mães imunizadas amamentadas por mães controle (Prole de mãe IM / Am NIM) e as proles de mães controle amamentadas por mães imunizadas (Prole de mãe NIM / Am IM), foram sangradas aos 20 di, para detecção de anticorpos IgG anti-OVA por ELISA.

A Figura 10 mostra que há transferência de elevados níveis de anticorpos IgG pela amamentação, considerando que no soro das proles controle que foram amamentadas por mães imunes (mãe NIM / Am IM) os níveis de anticorpos IgG foram significativamente superiores ao detectado nas proles de mães imunes amamentadas por mães controle. Os níveis mais elevados dos anticorpos no grupo de prole de mãe NIM / Am IM podem ser em decorrência da idade da prole analisada, 20 di, que ainda estavam sendo amamentados.

A transferência de IgG por via placentária ao feto pode ser identificada pelas proles de mães imunes que foram amamentadas por mães controles (Fig 10).

Os resultados mostram que ambos os períodos pré-natal e pós-natal contribuem para a transferência de anticorpos IgG à prole.

**Figura 10** - Transferência de IgG no período pré e pós-natal à prole.



Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados ou não com OVA, reforçados no 10º e 20º dpi e acasalados aos 21 dpi. Após o nascimento foi realizada a troca de proles de mães imunizadas (IM) para serem amamentados (Am) por mães controles (Prole de mãe IM / Am NIM) ou vice-versa (Prole de mãe NIM / Am IM). As proles foram sangradas aos 20 di e as amostras de soro (n=7) foram analisadas individualmente quanto à presença de anticorpos IgG anti-OVA por ELISA. Resultados estão expressos em média  $\pm$  DP. \* $P \leq 0,05$  em relação ao grupo de prole de mãe IM / Am NIM.

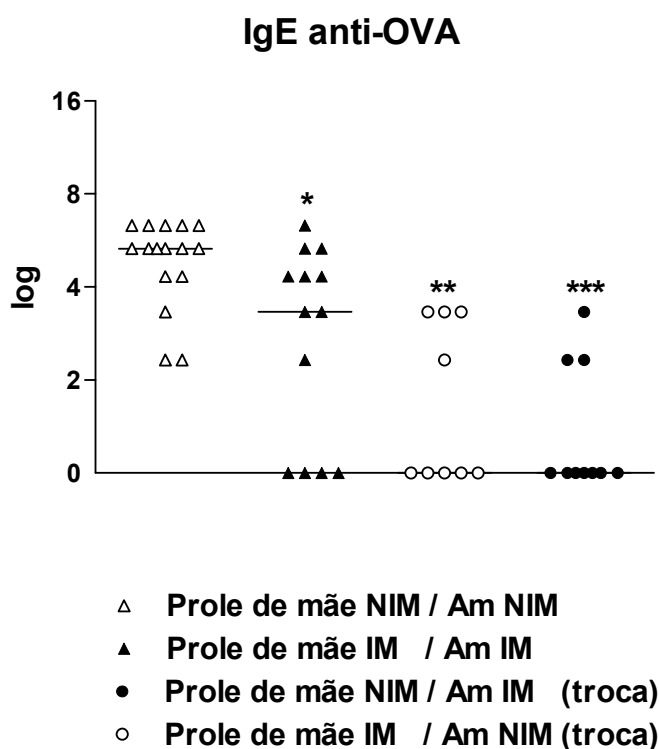
#### **4.10 Resposta IgE da prole submetida ao protocolo de troca de mães na amamentação**

Prosseguindo a avaliação da troca de mães, avaliamos a influência da imunização materna com OVA na produção de anticorpos IgE da prole imunizada em idade jovem (25 di). Para tal, as proles de mães imunes que foram amamentadas por mães não imunizadas ou vice-versa foram imunizadas aos 25 di com OVA, reforçadas aos 35 di e sangradas aos 42 di. As amostras de soro foram analisadas individualmente quanto à presença de anticorpos IgE por ACP.

A Figura 11 mostra a inibição da resposta IgE em ambos os grupos de proles submetidos ao protocolo de troca de proles em relação a prole imunizada de mães controles. A inibição da resposta IgE foi semelhante nos 3 grupos, seja dos que foram submetidos a troca e amamentados por mãe controle ou imunizada.

Os resultados evidenciam que a transferência de anticorpos e fatores que ocorrem por via placentária (pré-natal) ou pelo leite (pós-natal), são potencialmente capazes de inibir a produção de anticorpos IgE da prole. Além disto, o nível de supressão da resposta IgE foi semelhante em ambas as condições pré ou pós-natal.

**Figura 11** - Influência da via de transferência de anticorpo na resposta IgE da prole.



Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados com OVA e acasalados aos 21 dpi. Após o nascimento foi realizada a troca de proles de mães imunizadas para serem amamentados por mães controles (Prole de mãe IM / Am NIM) ou vice-versa (Prole de mãe NIM / Am IM). As proles foram imunizadas aos 25 di com OVA, reforçadas aos 35 di e sangradas aos 42 di. As amostras foram analisadas individualmente quanto à presença de anticorpos IgE por ACP. \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$  e \*\*\* $P \leq 0,001$  em relação ao grupo de prole de mãe NIM. O traço horizontal representa a média dos valores obtidos.

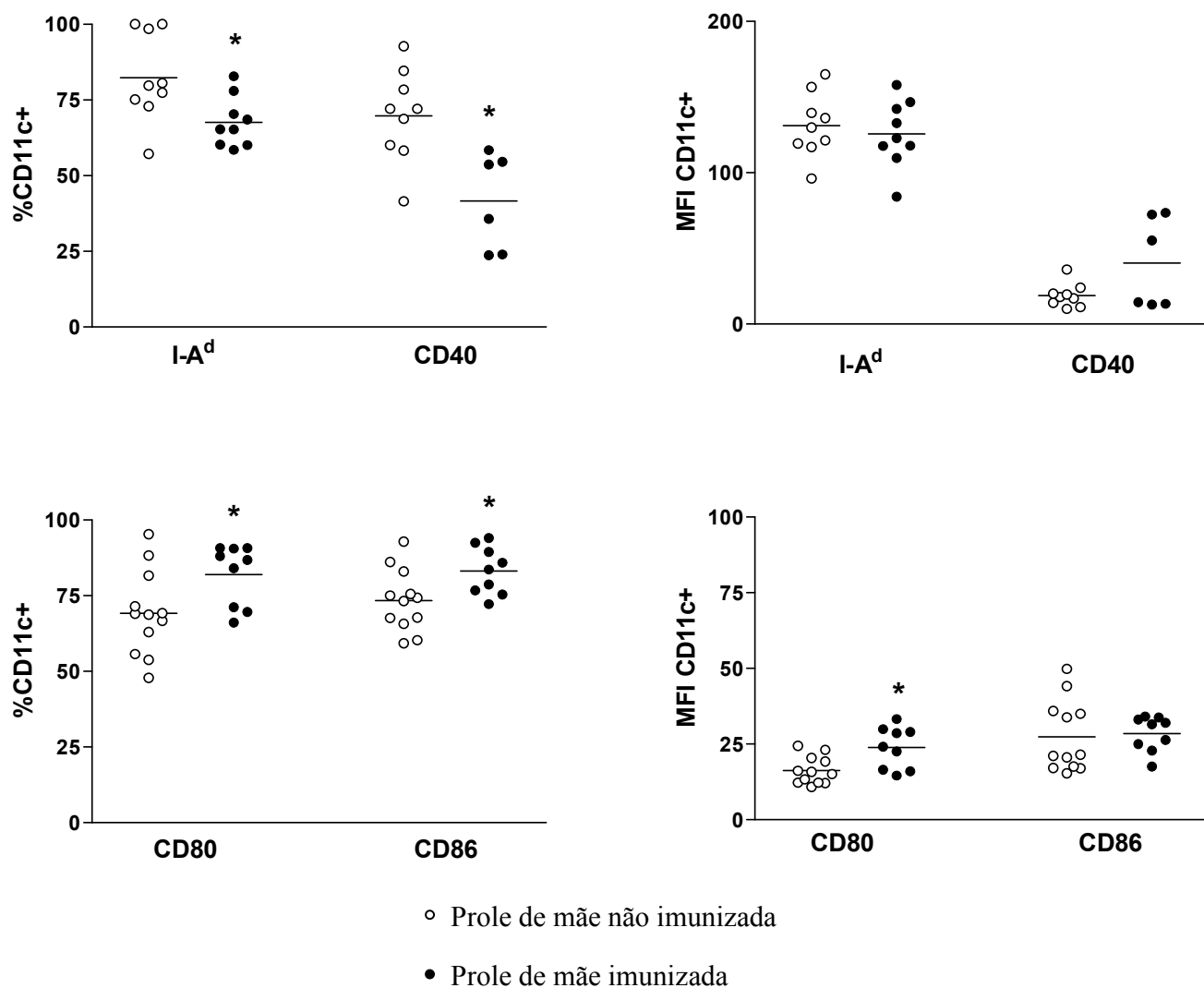
#### **4.11 Efeito da imunização materna na população de células DCs da prole não imunizada**

Os fatores transferidos pela mãe imunizada nos períodos pré e pós-natal são essenciais para inibir a resposta IgE da prole, porém não sabemos se estes fatores podem influenciar no perfil de ativação das DCs. Para tal, camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados ou não e acasalados com machos normais. O baço das proles foi coletado aos 25 di e as células foram avaliadas quanto a expressão das moléculas I-A<sup>d</sup>, CD80, CD86 e CD40 nas células CD11c<sup>+</sup> por citometria de fluxo.

A Figura 12 mostra o percentual das células CD11c<sup>+</sup> que expressam I-A<sup>d</sup>, CD40, CD86 e CD80 e a intensidade de fluorescência (MFI). O percentual de células CD11c<sup>+</sup>I-A<sup>d</sup><sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> diminuiu enquanto houve aumento na porcentagem de células CD11c<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> na prole de mães imunizadas quando comparadas com as proles de mães não imunizadas. Além disso, a intensidade de expressão da molécula CD80 também aumentou significativamente nas proles de mães imunizadas.

Os achados mostram que a imunização materna no período pré-natal aumenta a expressão e a intensidade da molécula CD80 nas DCs CD11c<sup>+</sup> das proles.

**Figura 12** - Influência da imunização materna na expressão de moléculas co-estimulatórias em DCs da prole.



Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizadas com OVA ou não e acasalados com machos normais. As DCs CD11c<sup>+</sup> esplênicas das proles (n= 9-12) de 20 di foram analisadas quanto a expressão das moléculas I-A<sup>d</sup>, CD40, CD80 e CD86 por citometria de fluxo (30.000 eventos). \* $P \leq 0,05$  em relação ao grupo controle. O traço horizontal representa a média dos valores obtidos.

#### **4.12 Efeito da imunização materna com OVA nas células T CD4+CD25+FoxP3+ esplênicas da prole imunizada no período neonatal**

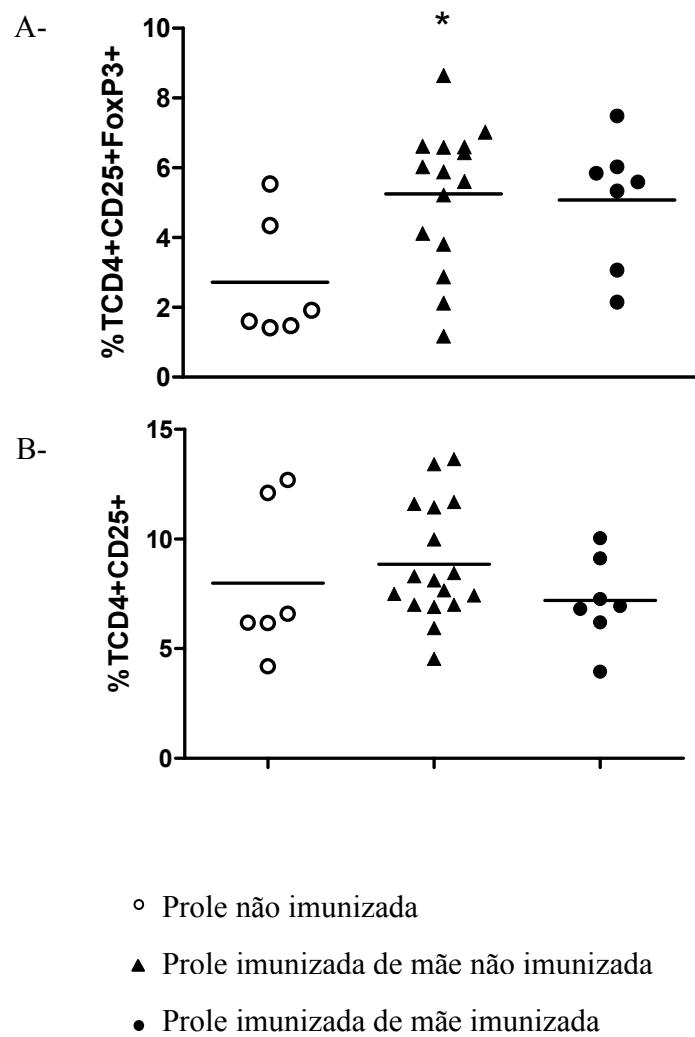
Nossos resultados mostraram que mães imunizadas no período pré-natal mantêm número equilibrado de células T CD4+CD25+FoxP3+ esplênicas, assim averiguamos a frequência dessas células nas proles imunizadas em período neonatal.

Para tal, camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados ou não com OVA, acasaladas e as proles imunizadas com OVA aos 3 di e reforçadas aos 13 di. O baço das proles foi coletado aos 25 di e as células avaliadas quanto a expressão das moléculas CD25 e FoxP3 por citometria de fluxo.

A imunização materna preserva o número percentual de células T CD4+CD25+FoxP3+ esplênicas da prole imunizada em relação ao grupo controle não imunizado (Fig 13). Além disto, a imunização neonatal com OVA da prole induz maior número de T CD4+CD25+FoxP3+ do que as proles controle não imunizadas.



**Figura 13** - Efeito da imunização materna com OVA nas células T CD4+CD25+FoxP3+ da prole imunizada no período neonatal.



Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados ou não, acasalados e as proles foram analisadas aos 25 di. As células T CD4+CD25+FoxP3+ (A) e as células T CD4+CD25+ (B) do baço foram avaliadas (30.000 eventos) por citometria de fluxo.

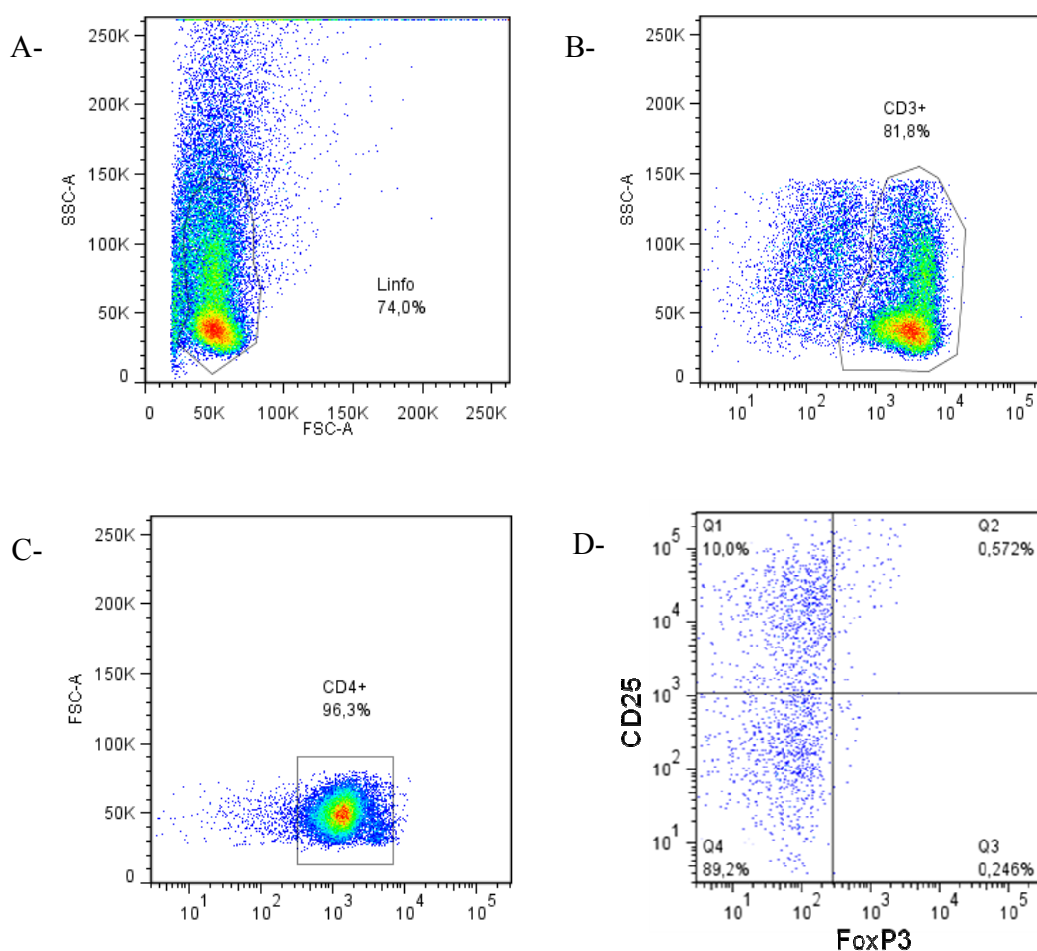
#### 4.13 Efeito das DCs das proles na capacidade de gerar células T reguladoras *in vitro*

Nossos resultados mostraram que a imunização materna foi capaz de aumentar *ex vivo* a expressão da molécula CD80 das CD11c<sup>+</sup> DCs da prole não imunizada. Prosseguimos para avaliar *in vitro* se as DCs das proles pulsadas com OVA são capazes de induzir células T reguladoras antígeno-específicas.

Para isso, DCs de proles de camundongos BALB/c fêmeas imunizados ou não foram obtidas aos 25 di, o baço foi coletado e as células foram purificadas para obtenção de DCs CD11c<sup>+</sup>. As células foram pulsadas com OVA por um período de 24 horas, lavadas e incubadas com células T CD4<sup>+</sup> purificadas de camundongos DO11.10. As células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> foram analisadas após 72 horas de cultura por citometria de fluxo. A Figura 14 mostra a estratégia de *gate* na população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>.

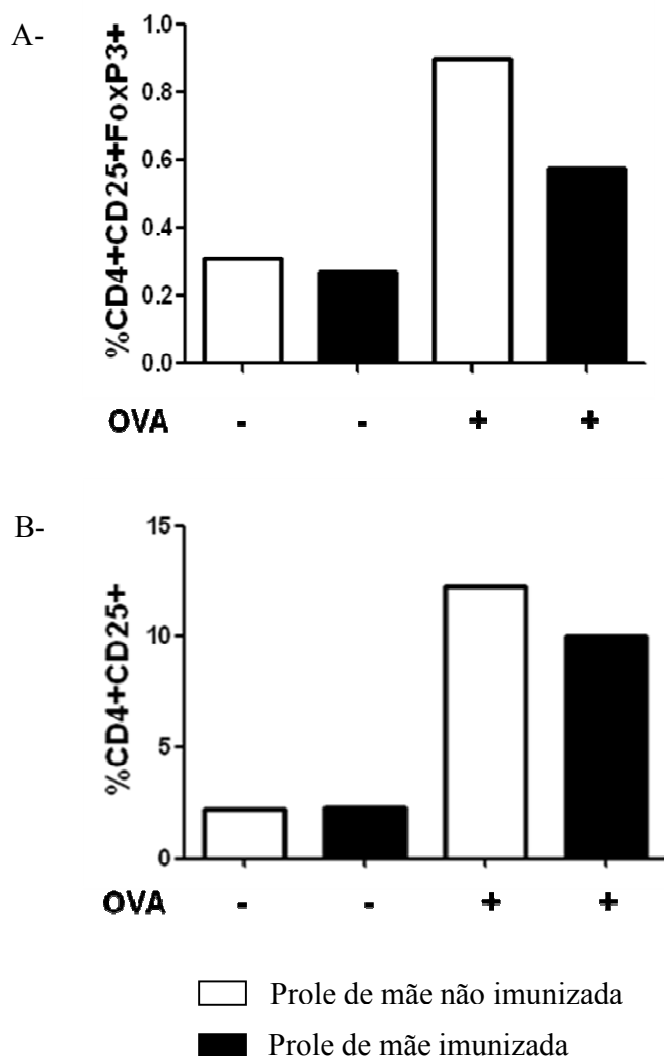
Os resultados mostram que *in vitro* as DCs pulsadas com OVA geram células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, sem contudo discriminar a procedência das DCs, seja de proles de mães imunes ou não (Fig 15). Da mesma forma, o percentual de células ativadas TCD4<sup>+</sup>TCD25<sup>+</sup> não diferem entre os grupos de DCs (Fig. 15b).

**Figura 14** - Estratégia de *gate* para identificação da população de células T CD4+CD25+FoxP3+ após 72 horas de cultura com DCs e linfócitos T CD4+ purificados.



O gráfico A representa a seleção da população de linfócitos por tamanho x granulosidade de um camundongo não imunizado de mãe imunizada. O gráfico B e C mostram seleção de células CD3+ e CD4+, respectivamente. D, região Q2, ilustra a dupla marcação com CD25 e FoxP3 representando a população de células T CD4+CD25+FoxP3+.

**Figura 15** - Efeito da imunização materna com OVA nas DCs da prole na geração de células T reguladoras.



Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados ou não, acasalados e as proles (*pool* de 6 animais/por experimento) foram analisadas aos 25 di. As DCs CD11c<sup>+</sup> esplênicas foram purificadas e incubadas com OVA, e incubadas com linfócitos T CD4<sup>+</sup> esplênicos de camundongos transgênicos DO11.10 na proporção de 1:4. Após 72 horas de cultura, as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (A) e as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (B) da co-cultura foram avaliadas (30.000 eventos) por citometria de fluxo. Os gráficos representam 1 experimento de um total de 3.

#### 4.14 Análise da capacidade supressora dos linfócitos T CD4+ co-cultivados com as DCs

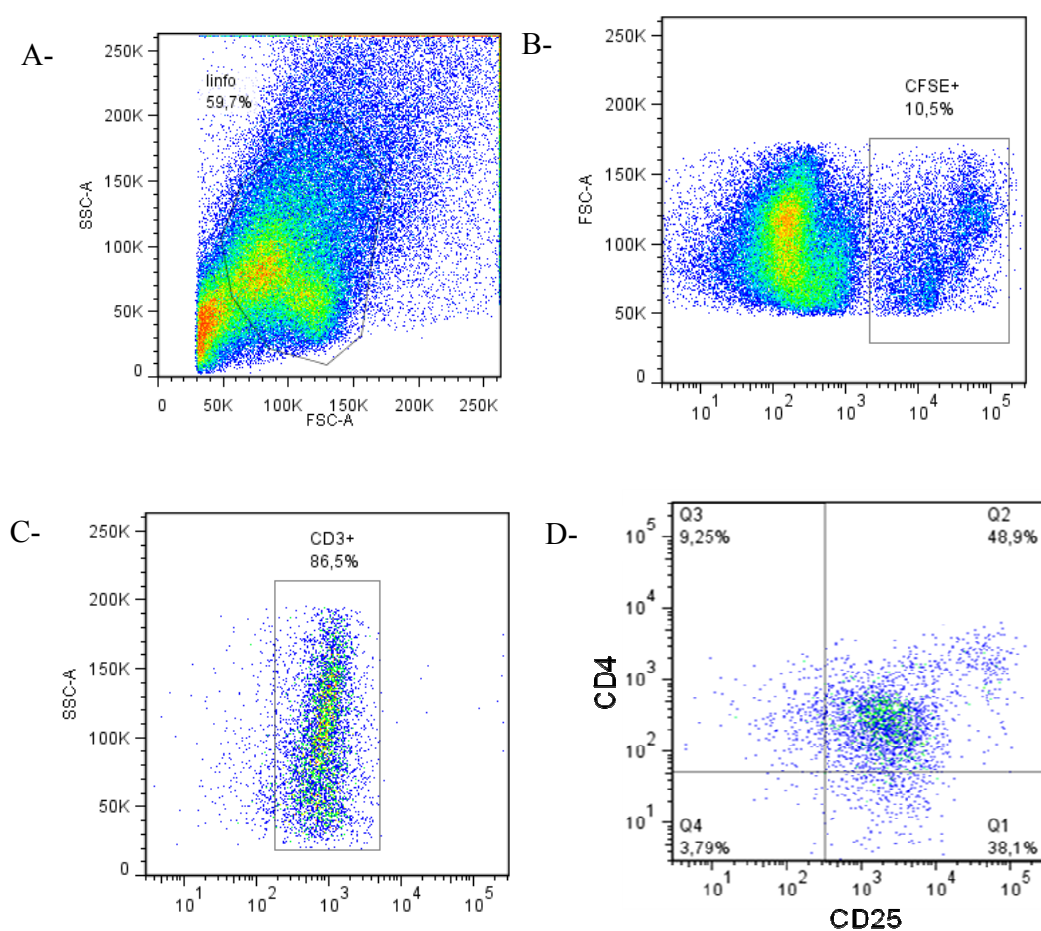
Na co-cultura de DCs das proles pulsadas com OVA com as células TCD4+ de camundongos DO.11.10 houve geração de células T reguladoras. Avaliamos se as células geradas na co-cultura com as DCs são capazes de mediar supressão na resposta proliferativa de células T CD4+ marcadas com CFSE estimuladas com anticorpos anti-CD3.

Para isso, células DCs CD11c+ purificadas de proles de mães imunizadas ou não aos 25 di, foram pulsadas com OVA por um período de 24 horas. Posteriormente, foram incubadas com células T CD4+ de camundongos DO11. 10 por 72 horas de incubação. Foram adicionados esplenócitos de camundongo BALB/c marcados com CFSE ( $5 \times 10^4$ /poço) na presença de anticorpos anti-CD3. Após 72 horas de cultura, a resposta proliferativa foi avaliada por citometria de fluxo. A Figura 16 mostra a estratégia de gate na população de células T CD4+CD25+CFSE+.

As células marcadas com CFSE das co-culturas foram avaliadas quanto ao índice de divisão e de proliferação, evidenciando que não houve diferença significativa entre os grupos analisados (Fig18a e b). Apesar de não termos observado inibição da proliferação, nas condições de cultura com estímulo com OVA sugerem uma diminuição da proliferação (Fig17).

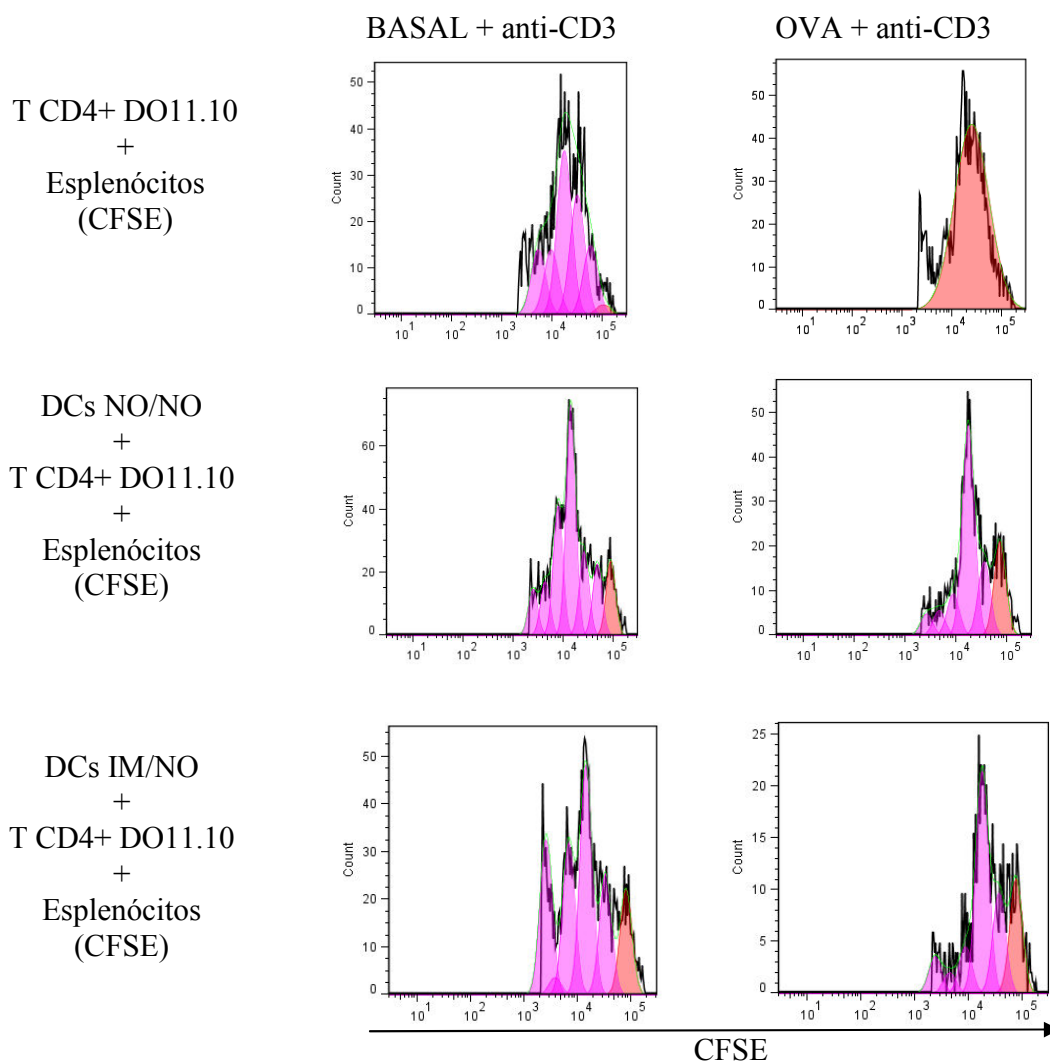
Os resultados mostram que as DC das proles de mães imunizadas mostraram alteração na expressão de moléculas co-estimuladoras, mas que *in vitro* geram níveis normais de células T reguladoras e que nas condições de cultivo não foi possível avaliar o potencial supressor dessas células.

**Figura 16** - Estratégia de *gate* para identificação da população de células T CD4+CFSE+ após 72 horas de cultura com DCs e linfócitos T CD4+CD25+FoxP3+ geradas.



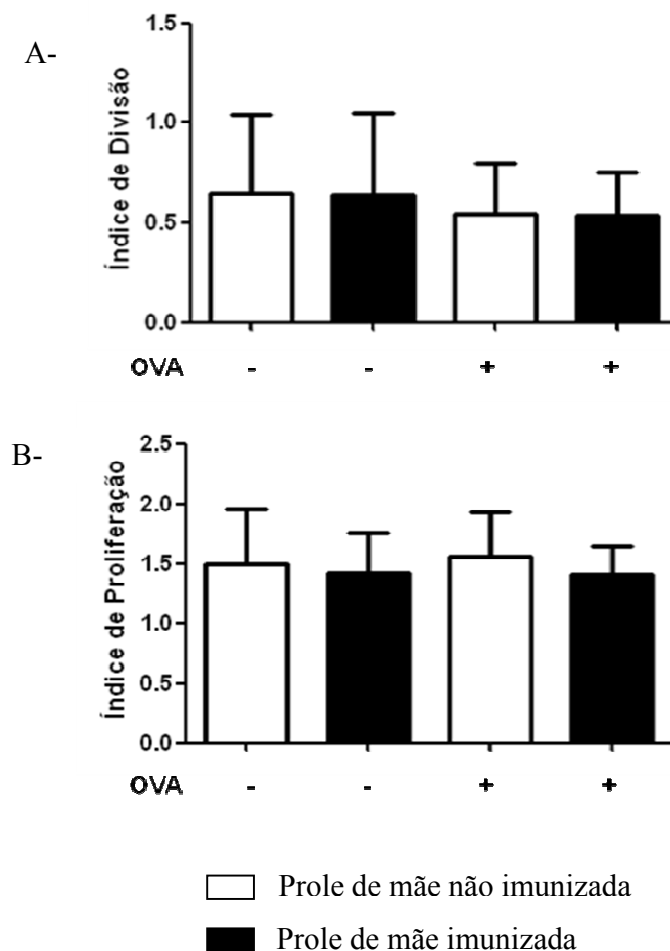
O gráfico A representa a seleção da população de linfócitos por tamanho x granulosidade de um camundongo não imunizado de mãe não imunizada. O gráfico B e C mostram a marcação por CFSE e CD3, respectivamente. O gráfico D, região Q2 mostra dupla marcação com CD4 e CD25 representando a população de células T CD4+CD25+.

**Figura 17** - Avaliação da capacidade supressora das células T CD4+CD25+FoxP3+ geradas por DCs da prole.



Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados ou não, acasalados e as proles (contendo 6 animais/por experimento) foram analisadas aos 25 di. As DCs esplênicas purificadas foram com OVA e incubadas com linfócitos T CD4+ de camundongos DO11.10 na proporção de 1:4. Após 72 horas de cultura, esplenócitos de camundongos BALB/c WT marcados com CFSE foram adicionados na cultura ( $5 \times 10^4$ /poço) e estimulados com anti-CD3. A resposta proliferativa foi avaliada após 72 horas por citometria de fluxo (30.000 eventos). Histogramas representando 1 do total de 4 experimentos.

**Figura 18** - Análise do índice de divisão e proliferação do ensaio de supressão.



Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados ou não, acasalados e as proles ( $n=1$  pool contendo 6 animais/experimento) foram analisadas aos 25 di. As DCs do baço foram purificadas e incubadas com OVA. Após 24 horas, as células foram lavadas e incubadas com linfócitos T CD4+ purificados do baço de camundongos transgênicos DO11.10 na proporção de 1:4. Após 72 horas de cultura, esplenócitos de camundongos BALB/c marcados com CFSE foram adicionados na cultura ( $5 \times 10^4$ /poço) e estimulados com anti-CD3. A resposta proliferativa foi avaliada após 72 horas por citometria de fluxo (30.000 eventos). Os gráficos representam 4 experimentos.



## 5 DISCUSSÃO

A estratégia de imunização materna com alérgenos vem sendo estudada em camundongos como medida profilática para evitar a sensibilização precoce da prole e conseqüentemente controlar o desenvolvimento da resposta alérgica. Entre os vários mecanismos de regulação mediados pela imunização materna, que podem regular a resposta IgE da prole, é decorrente da transferência de anticorpos maternos. Além disto, a imunização materna com OVA pode exercer impacto no sistema imunológico da prole e nos componentes da resposta imune inata e adaptativa, como as DCs e as células T reguladoras.

Para compreendermos os mecanismos envolvidos na prevenção da resposta alérgica da prole, inicialmente avaliamos alguns parâmetros imunológicos na gestação ou amamentação da mãe imunizada com OVA. Na gestação a termo das mães imunizadas, detectamos no líquido amniótico, um significativo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12p70 ou regulatória como IL-10. Embora estas citocinas não tenham sido detectadas no soro do feto é possível que o contato com o feto ocorra pelas mucosas após ingestão do líquido amniótico ou diretamente pela absorção através da pele. No feto humano, aproximadamente 70 % das proteínas no líquido amniótico são diariamente renovadas por ingestão fetal (BLOOMFIELD, HARDING, 1998) ou por penetração através da pele, devido a sua alta permeabilidade (WARNER, 2007).

O aumento das citocinas pró-inflamatórias no líquido amniótico das mães imunizadas com OVA pode representar a produção pelas células da decídua materna. Além disto, é possível que as citocinas tenham acesso ao líquido amniótico sob a forma de imunocomplexos, como detectado com imunocomplexos de OVA e IgG de mães expostas por via oral com OVA (FUSARO et al., 2007). As mães imunizadas e avaliadas em período pós-desmame, não mostraram alteração no percentual de células T reg no baço. É possível que nesta fase essa população celular já tenha atingido níveis basais, sendo que na gestação, é sabido que ocorre expansão dos linfócitos T reguladores nos órgãos linfóides secundários, possivelmente para supressão da resposta imune materna ao feto (ALUVIHARE et al., 2004). Na condição de gestação isogênica, é possível que a expansão de Treg, seja devido

as variações hormonais. De fato, a progesterona é um importante regulador sistêmico e local de células T regs CD4+CD25+ que estão envolvidas na manutenção da tolerância materno-fetal (MAO et al., 2010).

Em outro compartimento materno, como o leite, as citocinas pró-inflamatórias não foram detectadas, mas elevada concentração de TGF- $\beta$ 1 foi detectada após 10 dias de amamentação, independente da imunização materna. Em contraste, no quinto dia de amamentação de mães imunizadas com Der p, há aumento dos níveis de TGF- $\beta$ 1 no leite, mas não de  $\beta$ 2 em relação às mães não imunizadas (FUSARO et al., 2002). Em nossos grupos de mães imunizadas com OVA não foi detectado diferença nos níveis de TGF- $\beta$ 1, que pode ser devido ao período mais tardio de análise, ou seja, no décimo dia de amamentação.

O TGF-  $\beta$  é essencial na indução de tolerância antígeno-específica, seja em doenças autoimunes (STROBEL, 2001, WEINER, 2001) ou alérgicas (LETTERIO, ROBERTS, 1998, KALLIOMÄKI et al., 1999, SATO et al., 2001). O TGF- $\beta$  do leite de mães expostas a OVA por nebulização durante o período de amamentação é capaz de induzir tolerância à prole inibindo a hiperreatividade pulmonar, o número de eosinófilos no lavado bronco-alveolar (LBA) e os níveis séricos de anticorpos IgE, IgG1 e IgA anti-OVA da prole (VERHASSELT et al., 2008).

O TGF- $\beta$  é um importante fator na troca de classe para IgA (KAMER et al., 1995), de fato detectamos elevados níveis de anticorpos IgG anti-OVA no leite das mães imunizadas. Estes achados confirmam dados prévios que mostraram que a imunização materna pré-concepção aumenta os níveis de IgG (FUSARO et al., 2007) e IgA anti-OVA no leite (FUSARO et al., 2009). Em camundongos, os receptores FcR neonatal (FcRn) localizados nas células do epitélio intestinal do neonato possibilitam o transporte de anticorpos IgG do leite para a circulação da prole (CIANGA et al., 1999). Este receptor, em humanos, liga-se ao domínio Fc da IgG em pH ácido no endossoma protegendo a IgG da degradação, contribuindo assim no aumento da meia vida da IgG (SUZUKI et al., 2010). Não é conhecido se o FcRn em camundongos é capaz de regular a meia vida da IgG, contudo a transferência de IgG pela amamentação é uma das vias principais de transmissão de IgG à prole.

.A transferência de anticorpos IgG anti-OVA à prole foi essencialmente da subclasse IgG1, sendo os da subclasse IgG2b somente observado aos 2 di, evidenciando um transporte preferencial de IgG1 seguido de IgG2b pela via placentária. Os níveis de anticorpos elevaram-se aos 20 di e gradualmente diminuíram aos 80 di. O aumento dos níveis de IgG1 aos 20 di, é resultante da amamentação da prole, visto que a prole é amamentada até 25 di e que os anticorpos IgG1 possuem uma vida média de aproximadamente 30 dias.

Similarmente, há transferência de anticorpos IgG1 seguido de IgG2a e IgG2b à prole por camundongos fêmeas A/Sn imunizadas com Der p antes da concepção, tanto por via placentária como pelo leite (FUSARO et al., 2002). Em humanos a transferência de anticorpos ao feto ocorre exclusivamente por via placentária sendo predominantemente de IgG1>IgG3>IgG4>IgG2 (PITCHER –WILMOTT et al., 1980, GARTY et al., 1994).

Para verificarmos se há transferência de anticorpos IgG1 com função anafilática à prole foi realizada uma cinética para verificar o aparecimento de anticorpos IgG1 anafiláticos no soro da prole. Houve transferência de anticorpos IgG1 anafiláticos seja por via placentária como pela amamentação, onde os títulos mantiveram-se elevados aos 20 di, decaindo aos 50-80 di. Os anticorpos IgG1 anafiláticos estão presentes já no início da vida da prole, contudo, não é conhecido se estes anticorpos podem contribuir para o desencadeamento de reações anafiláticas. Considerando que em camundongos os anticorpos IgG1 que exercem atividade anafilática são positivamente reguladas pela IL-4 (FAQUIM et al., 1999) podendo estar envolvidas na inflamação pulmonar e na hiperreatividade das vias aéreas (MACEDO et al., 2004).

Por outro lado, é possível que os anticorpos maternos IgG1 não anafiláticos que constituem a maioria dos anticorpos transferidos à prole, sejam protetores ao neonato prevenindo a sensibilização da prole por formarem imunocomplexos no momento da exposição ao alérgeno. Neste sentido, previamente foi observado em paralelo aos elevados níveis de anticorpos maternos na circulação da prole, há inibição da reação de hipersensibilidade do tipo I da prole imunizada em período neonatal (VICTOR et al., 2003). A medida que os níveis de anticorpos IgG1 maternos diminuem na circulação da prole há perda do efeito inibitório da resposta IgE. Além disto, a injeção de anticorpos IgG de mães

imunizadas com OVA em neonatos previne o desenvolvimento da resposta alérgica da prole (VICTOR et al., 2010).

Para avaliarmos a associação dos protocolos de imunização da mãe e do neonato, analisamos inicialmente a resposta humoral das proles imunizadas em período neonatal. A imunização dos neonatos com OVA, de mães não imunizadas, realizada aos 3 di mostrou indução de anticorpos IgE e IgG1, mas não de IgG2a, IgG2b e IgG3 anti-OVA aos 20 di. A produção de anticorpos anafiláticos IgE evidencia que o protocolo de imunização neonatal foi capaz de sensibilizar a prole. Apesar da indução de anticorpos IgE, não é conhecido se a imunização neonatal e posterior instilação nasal do alérgeno é capaz de induzir hiperreatividade pulmonar. Nossos resultados preliminares (não mostrados), em camundongos de 20 di mostraram dificuldade técnica para canular a traquéia para medição da mecânica pulmonar, além de não mostrar infiltração de eosinófilos no pulmão. Assim, está sendo necessário aguardar quatro semanas após a imunização neonatal para iniciar os desafios com o alérgeno via intranasal e promover hiperreatividade pulmonar. De fato, foi descrito que não é possível induzir hiperreatividade pulmonar em prole BALB/c de 17 di exposta a OVA por nebulização, em contraste em camundongos a partir de 8 semanas de idade (HAMADA et al., 2000).

Apesar da imaturidade do sistema imune neonatal (SIEGRIST, 2001) os camundongos imunizados aos 3 di foram capazes de desenvolver anticorpos IgE e IgG1 anti-OVA, o que pode refletir a predisposição de resposta do tipo Th2 no período neonatal. A tendência de resposta Th2 do neonato pode ser devido a população de linfócitos T CD4+ apresentarem hipometilação na região regulatória da expressão de citocinas Th2 facilitando assim a alta e rápida expressão dos genes de *IL-4* e *IL-13* após ativação (Rose et al., 2007), como também devido ao aumento da expressão da cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-13 nas células Th1, receptor alternativo para IL-4, que ao formar um heteroreceptor com IL-4R $\alpha$  favorece as células Th1 a entrarem em apoptose após re-exposição com o antígeno e IL-4 (LI et al., 2004).

Além disto, a escassa resposta de anticorpos IgG2a, um isótipo dependente de IFN- $\gamma$ , nos neonatos imunizados pode representar uma diminuição de resposta Th1. De fato, em camundongos neonatos as células T exibem baixa secreção de IFN- $\gamma$  pelas células Th1

(ADKINS et al., 2004, SIEGRIST, 2007), essencialmente devido a baixa produção de IL-12 pelas APCs (LEE et al., 1996).

No período neonatal também foi observada escassa produção de IgG3 na imunização com OVA. Os anticorpos IgG3, estão principalmente relacionados com a resposta a antígenos T-independente tipo II como polissacarídeos da parede bacteriana (ADKINS et al., 2004; SIEGRIST, 2007). Uma possível explicação pode ser devido a redução do número de receptores TACI, membro da família do receptor de TNF, expressos nos linfócitos B do neonato e que é essencial na resposta a antígenos T-independente (YAN et al., 2001; VON BÜLOW et al., 2001). Nos camundongos neonatos imunizados com OVA a diminuída produção de IgG3 pode representar uma imaturidade dos fatores para a mudança de classe a este isotipo considerando que a OVA é um antígeno T-dependente.

Visto que a imunização neonatal induz precocemente a produção de anticorpos IgE anafiláticos, a imunização materna com OVA, foi utilizada como estratégia para inibir a resposta IgE da prole imunizada. Os mecanismos de regulação envolvidos no controle da resposta IgE da prole evidenciam que fatores e anticorpos maternos transferidos durante a gestação e amamentação são capazes de diminuir a OVA da imunização neonatal prevenindo a sensibilização da prole (FUSARO et al., 2007, 2009, 2010, VICTOR et al., 2010). Vários são os mecanismos que os anticorpos IgG anti-OVA maternos podem prevenir ou controlar a sensibilização da prole, seja por formar imunocomplexos com a OVA na imunização da prole; por interagir com receptores inibidores Fc $\gamma$ RIIB presentes nos linfócitos B (VICTOR et al., 2010) e DCs; por interações idiotípicas entre o BCR ou TCR de linfócitos regulando a diferenciação em plasmócitos ou controlando a proliferação da células T ao antígeno (HIERNAUX et al., 1981, VAKIL et al., 1986, RIGATO et al., 2009).

Para analisarmos a contribuição da gestação ou amamentação na transferência de anticorpos, respectivamente ao feto ou ao neonato, realizamos o protocolo de troca de proles logo após o nascimento entre as mães imunizadas para as não imunizadas e vice-versa. Elevados níveis de IgG anti-OVA foram transferidos à prole, seja pela via placentária ou pela amamentação. Os níveis de anticorpos maternos foram mais elevados nas proles amamentadas por mães imunizadas devido ao tempo de análise. Entretanto,

ambas as vias efetivamente contribuíram para a inibição da produção de anticorpos IgE anti-OVA quando a prole foi imunizada aos 25 di.

Previamente, foi observado que a injeção de anticorpos policlonais de coelho IgG anti-OVA em neonatos imunizados com OVA aos 3 di foi capaz de inibir a resposta IgE anti-OVA em comparação aos neonatos imunizados tratados com anticorpos IgG controle (FUSARO et al., 2007). Além disso, injeções por via intravenosa de IgG de mães imunizadas com OVA para fêmeas não imunizadas durante a gestação foi capaz de diminuir a expressão de CD40 e CD23 em linfócitos B e aumentar a porcentagem de linfócitos T CD4+ produtores de IL-10 da prole sem alterar a expressão do receptor FcγRIIb nos linfócitos B e na resposta IgE (VICTOR et al., 2010). Os achados mostram que somente os anticorpos não são capazes, ou foram insuficientes, para regular negativamente a resposta IgE em contraste com as mães não imunes tratadas com anticorpos IgG durante o período de amamentação.

Em conjunto, estes achados salientam a importância de avaliarmos o efeito da imunização materna no desenvolvimento da resposta imune e da regulação do neonato. Iniciando a avaliação *ex vivo* fenotípica/ativação das DCs das proles não imunizadas evidenciamos um aumento percentual e na intensidade de expressão de CD80 nas DCs de camundongos de mães imunes em relação às proles controles. É possível que o aumento da expressão de CD80 nas DCs CD11c+ das proles possa influenciar para atenuar a resposta Th2. De fato, a expressão de CD86 em DCs é importante na indução da resposta Th2 (KUCHROO et al., 1995). Além disto, camundongos que foram expostos a OVA por aerossol e que receberam injeções de anticorpos anti-CD86, mas não de anti-CD80, tiveram inibição da resposta alérgica pulmonar e do infiltrado eosinofílico, bem como diminuição da produção de IgE e IgG1 (HACZKUET al., 1999).

Da mesma forma, em humanos, as DCs do sangue periférico de indivíduos atópicos para ácaros de poeira doméstica (APD) estimuladas com Der p1 aumentam a expressão de CD86, PDL-1 e a produção de IL-10 enquanto as DCs de indivíduos não atópicos aumentam a expressão de CD80 (HAMMAD et al., 2001). Contudo, DCs do baço de camundongos sensibilizados com OVA mostraram aumento da expressão da molécula CD80, com níveis de CD86 inalterados sugerindo que o aumento da expressão de CD80 possa estar relacionada com as células Th2 na alergia (CHENG et al., 2003).

Em contraste, nossos achados *ex vivo* das proles de mães imunizadas com OVA e que são protegidas ao desenvolvimento da resposta alérgica mostra aumento das DCs, o que parece prevenir excesso da resposta Th2 não sugere ser decorrente de aumento do número de células T CD4+CD25+FoxP3+ na prole imunizada. É possível que a imunização materna não seja capaz de aumentar quantitativamente o número de linfócitos reguladores mas pode influenciar na função reguladora das células T CD4+.

Células T reguladoras são importantes no controle da resposta alérgica (ROBINSON et al., 2004). Além disto, a transferência de linfócitos T CD4+ da prole amamentada por mães expostas por aerossol à OVA em camundongos é capaz de inibir ao desenvolvimento de alergia, sugerindo que na amamentação é fundamental o TGF- $\beta$  como fator de proteção da alergia da prole e na indução de células T reguladoras (VERHASSELT et al., 2008).

Proporções equivalentes de células T CD4+CD25<sup>high</sup>FoxP3+ são encontrados em animais tolerantes e não tolerantes (STRICKLAND et al., 2006). Além disso, o tratamento de camundongos asmáticos com DCs diferenciadas na presença de IL-10 (DC10) por 4 semanas diminuiu a infiltração de eosinófilos no lavado broncoalveolar e controlou a resposta alérgica, entretanto, não foi capaz de aumentar o número de células T CD4+CD25<sup>high</sup>FoxP3+ nos linfonodos do mediastino (HIUANG et al., 2011).

Vários podem ser os fatores que colaboraram para o controle da alergia, seja por indução de células T reguladoras, ou TGF- $\beta$ , e até mesmo pela interação de complexo de anticorpos com antígeno via o receptor inibidor Fc $\gamma$ RIIB nas DCs. Embora, não tenha sido verificado aumento na percentagem de células T reguladoras nas proles imunizadas de mães imunes e que *in vitro* as DC dessas proles não influenciam na geração de células T reg, avaliamos se as células TCD4+ co-cultivadas com as DCs poderiam suprimir a resposta proliferativa de células T. Resultados mostram que as DCs CD11c+ das proles não imunizadas de mães imunizadas em co-cultura com células T CD4+ de camundongos D011.10 transgênico para OVA não influenciaram na resposta proliferativa de esplenócitos de BALB/c ao estímulo por anticorpos anti-CD3. É possível que essa condição de co-cultura não seja apropriada para avaliar a função supressora, sendo a depleção de populações talvez mais indicada para avaliar esta função.

Em conjunto, os dados mostram que a vacinação materna com OVA foi capaz de regular negativamente a resposta alérgica da prole seja por um efeito direto dos anticorpos maternos ou por influenciar indiretamente no fenótipo das DCs da prole, contribuindo assim, na regulação da resposta Th2 alérgica em período precoce de vida.



## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que a imunização com OVA influencia no sistema imunológico da gestante considerando os elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias no líquido amniótico, e da presença de citocina regulatória no leite; demonstrando que as vias, placentária e da amamentação são essenciais para a transferência de anticorpos e prevenção da resposta alérgica da prole,

A imunização materna além de inibir o desenvolvimento da resposta IgE da prole aumenta a expressão *ex vivo* da molécula co-estimuladora nas DCs da prole e mantém equilibrado os números de células TCD4+CD25+FoxP3+,

As DCs das proles co-cultivadas com células T antígeno-específicas induzem linfócitos T reguladores mas não medeiam supressão das células efectoras,

A imunização materna influencia diretamente no sistema imune do neonato essencialmente através de anticorpos que impedem a sensibilização da prole modulando negativamente a resposta alérgica da prole.

## 7 REFERÊNCIAS

ANDERSSON, J.; TRAN, D. Q.; PESU, M.; DAVIDSON, T. S.; RAMSEY, H.; O'SHEA, J. J.; SHEVACH, E. M. CD4+FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF- $\beta$ -dependent manner. **J. Exp. Med.**, v. 205, n. 9, p. 1975-1981, 2008.

ADKINS, B.; BU, Y.; CEPERO, C.; PEREZ, R. Exclusive Th2 primary effector function in spleens but mixed Th1/Th2 function in lymph nodes of murine neonates. **J. Immunol.**, v. 164, n. 5, p. 2347-2353, 2000.

ADKINS, B.; BU, Y.; GUEVARA, P. The generation of Th memory in neonates versus adults: prolonged primary Th2 effector function and impaired development of Th1 memory effector function in murine neonates. **J. Immunol.**, v. 166, n. 2, p. 918-925, 2001.

ADKINS, B.; WILLIAMSON, T.; GUEVARA, P.; BU, Y. Murine neonatal lymphocytes show rapid early cell cycle entry and cell division. **J. Immunol.**, v. 170, n. 9, p. 4548-4556, 2003.

ADKINS, B.; CLAUDE, L.; MARSHALL-CLARKE, S. Neonatal adaptive immunity comes of age. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 7, p. 553-564, 2004.

ALUVIHARE, V. R.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A. G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. **Nat. Immunol.**, v. 5, n. 3, p. 266-271, 2004.

ANSEL, K. M.; NGO, V. N.; HYMAN, P. L.; LUTHER, S. A.; FORSTER, R.; SEDGWICK, J. D.; BROWNING, J. L.; LIPP, M.; CYSTER, I. G. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. **Nature**, v. 406, n. 6793, p. 309-314, 2000.

BACCHETTA, R.; GAMBINERI, E.; RONCAROLO, M. G. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 120, n. 2, p. 227-235, 2007.

BANHAM, A. H.; POWRIE, F. M.; SURI-PAYER, E. FOXP3+ regulatory T cells: Current controversies and future perspectives. **Eur. J. Immunol.**, v. 36, n. 11, p. 2832-2836, 2006.

BETTELLI, E.; KORN, T.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. Induction and effector functions of T(H)17 cells. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1051-1057, 2008.

BINGHAM, C.O. 3<sup>RD</sup>; AUSTEN, K. F. Mast-cell responses in the development of asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 105, p.S527-S534, 2000.

BLOOMFIELD, F.; HARDING, J. E. Experimental aspects of nutrition and fetal growth. **Fetal Mat. Rev.**, v. 10, p. 91-107, 1998.

BROCKOW, I.; ZUTAVERN, A.; HOFFMANN, U.; GRÜBL, A.; VON BERG, A.; KOLETZKO, S.; FILIPIAK, B.; BAUER, C. P.; WICHMANN, H. E.; REINHARDT, D.; BERDEL, D.; KRÄMER, U.; HEINRICH, J. GINIplus Study Group. Early allergic sensitizations and their relevance to atopic diseases in children aged 6 years: results of the GINI study. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, v. 19, n.3, p. 180-187, 2009.

BRUSSEE, J. E.; SMIT, H. A.; VAN STRIEN, R. T.; CORVER, K.; KERKHOF, M.; WIJGA, A. H.; AALBERSE, R. C.; POSTMA, D.; GERRITSEN, J.; GROBBEE, D. E.; DE JONGSTE, J. C.; BRUNEKREEFF, B. Allergen exposure in infancy and the development of sensitization, wheeze, and asthma at 4 years. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 115, n. 5, p. 946-952, 2005.

BURCHELL, J. T.; STRICKLAND, D. H.; STUMBLES, P. A. The role of dendritic cells and regulatory T cells in the regulation of allergic asthma. **Pharmacol. Ther.**, v. 125, n. 1, p. 1-10, 2010.

CASAS, R.; BJÖRKSTÉN, B. Detection of Fel d 1-immunoglobulin G immune complexes in cord blood and sera from allergic and non-allergic mothers. **Pediatr. Allergy Immunol.**, v. 12, n. 2, p. 59-64, 2001.

CASAS, R.; JENMALM, M. C.; BJÖRKSTÉN, B. Cat allergen-induced cytokine secretion and Fel d 1-immunoglobulin G immune complexes in cord blood. **Clin. Exp. Allergy**, v. 34, n. 4, p. 591-596, 2004.

CHENG, X.; WANG, C.; QIAN, G.; ZHU, B. CD80, but not CD86 were up-regulated on the spleen-derived dendritic cells from OVA-sensitized and challenged BALB/c mice. **Immunol. Lett.**, v. 89, n. 1, p. 31-8, 2003.

CIANGA, P.; MEDESAN, C.; RICHARDSON, J. A.; GHETIE, V.; WARD, E. S. Identification and function of neonatal Fc receptor in mammary gland of lactating mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, n. 8, p. 2515-2523, 1999.

COFFMAN, R. L.; MOSMANN, T. R. CD4+ T-cell subsets: regulation and function. **Res. Immunol.**, v. 142, n. 1, p. 7-9, 1991.

COFFMAN, R. L.; VARKILA, K.; SCOTT, P.; CHATELAIN, R. Role of cytokines in the differentiation of CD4+ T-cell subsets in vivo. **Immunol. Rev.**, v. 123, p. 189-207, 1991.

COOMBS, R. R. A.; GELL, P. G. H. Classification of allergic reactions responsible of clinical hypersensitivity and disease. In: GELL, P. G. H.; COOMBS, R. R. A.; LACHMANN, P. J. (editors). **Clinical aspects of immunology**. 3. ed. Oxford: Blackwell, 1975. p. 761-781

COOMBES, J. L.; SIDDIQUI, K. R.; ARANCIBIA-CÁRCAMO, C. V.; HALL, J.; SUN, C. M.; BELKAID, Y.; POWRIE, F. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. **J. Exp. Med.**, v. 204, n. 8, p. 1757-1764, 2007.

DADAGLIO, G.; SUN, C. M.; LO-MAN, R.; SIEGRIST, C. A.; LECLERC, C. Efficient in vivo priming of specific cytotoxic T cell responses by neonatal dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 168, n. 5, p. 2219-2224, 2002.

DURANDY, A.; DE SAINT BASILE, G.; LISOWSKA-GROSPIERRE, B.; GAUCHAT, J. F.; FORVEILLE, M.; KROCZEK, R. A.; BONNEFOY, J. Y.; FISCHER, A. Undetectable CD40 ligand expression on T cells and low B cell responses to CD40 binding agonists in human newborns. **J. Immunol.**, v. 154, n. 4, p. 1560-1568, 1995.

ELLERTSEN, L. K.; NYGAARD, U. C.; MELKILD, I.; LØVIK, M. Maternal allergen immunisation to prevent sensitisation in offspring: Th2-polarising adjuvants are more efficient than a Th1-polarising adjuvant in mice. **BMC. Immunol.**, v.1, n. 11:8, 2010.

FAQUIM-MAURO, E. L.; COFFMAN, R. L.; ABRAHAMSOHN, I. A.; MACEDO, M. S. Cutting edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. **J. Immunol.**, v. 163, n. 7, p. 3572-3576, 1999.

FUSARO, A. E.; MACIEL, M.; VICTOR, J. R.; OLIVEIRA, C. R.; DUARTE, A. J. S.; SATO, M. N. Influence of maternal murine immunization with *Dermatophagoides pteronyssinus* extract on the type I hypersensitivity response in offspring. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 127, p. 208-216, 2002.

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

FUSARO, A. E.; BRITO, C. A.; TANIGUCHI, E. A.; MUNIZ, B. P.; VICTOR, J. R.; ORII, N. M.; DUARTE, A. J. S.; SATO, M. N. Balance between early life tolerance and sensitization in allergy: dependence on the timing and intensity of prenatal and postnatal allergen exposure of the mother. **Immunology**, v. 128, p. e541-e550, 2009.

GARTY, B. Z.; LUDOMIRSKY, A.; DANON, Y. L.; PETER, J. B.; DOUGLAS, S. D. Placental transfer of immunoglobulin G subclasses. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 1, n. 6, p. 667-669, 1994.

HACZKU, A.; TAKEDA, K.; REDAI, I.; HAMELMANN, E.; CIESLEWICZ, G.; JOETHAM, A.; LOADER, J.; LEE, J. J.; IRVIN, C.; GELFAND, E. W. Anti-CD86 (B7.2) treatment abolishes allergic airway hyperresponsiveness in mice. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 159, n.5, pt. 1, p. 1638-1643, 1999.

HAMADA, K.; GOLDSMITH, C. A.; GOLDMAN, A.; KOBZIK, L. Resistance of very young mice to inhaled allergen sensitization is overcome by coexposure to an air-pollutant aerosol. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 161, n.4, pt. 1, p. 1285-1293, 2000.

HAMMAD, H.; CHARBONNIER, A. S.; DUEZ, C.; JACQUET, A.; STEWART, G. A.; TONNEL, A. B.; PESTEL, J. Th2 polarization by Der p 1 – pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. **Blood**, v. 98, n. 4, p. 1135–1141, 2001.

HAYASHI, Y.; TSUKUMO, S.; SHIOTA, H.; KISHIHARA, K.; YASUTOMO, K. Antigen-specific T cell repertoire modification of CD4+CD25+ regulatory T cells. **J. Immunol.**, v. 172, n. 9, p. 5240-5248, 2004.

HIERNAUX, J.; BONA, C.; BAKER, P. J. Neonatal treatment with low doses of anti-idiotypic antibody leads to the expression of a silent clone. **J. Exp. Med.**, v. 153, n. 4, p.1004-1008, 1981.

IVANOV, I. I.; MCKENZIE, B. S.; ZHOU, L.; TADOKORO, C. E.; LEPELLEY, A.; LAFAILLE, J. J.; CUA, D. J.; LITTMAN, D. R. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 121-133, 2006.

JARRETT, E.; HALL, E. Selective suppression of IgE antibody responsiveness by maternal influence. **Nature**, v. 280, n. 5718, p. 145-147, 1979.

JARRETT, E. E.; HALL, E. IgE suppression by maternal IgG. **Immunology**, v. 48, n. 1, p. 49-58, 1983.

JOETHAM, A.; TAKEDA, K.; TAUBE, C.; MIYAHARA, N.; MATSUBARA, S.; KOYA, T.; RHA, Y. H.; DAKHAMA, A.; GELFAND, E. W. Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. **J. Immunol.**, v. 178, n. 3, p.1433-1442, 2007.

HUANG, H.; DAWICKI, W.; ZHANG, X.; TOWN, J.; GORDON, J. R. Tolerogenic dendritic cells induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell differentiation from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-/lo</sup>Foxp3<sup>-</sup> effector T cells. **J. Immunol.**, v. 185, n. 9, p. 5003-5010, 2010.

KANSWAL, S.; KATSENELSON, N.; SELVAPANDIYAN, A.; BRAM, R. J.; AKKOYUNLU, M. Deficient TACI expression on B lymphocytes of newborn mice leads to defective Ig secretion in response to BAFF or APRIL. **J. Immunol.**, v. 181, n. 2, p. 976-990, 2008.

KALLIOMÄKI, M.; OUWEHAND, A.; ARVILOMMI, H.; KERO, P.; ISOLAURI, E. Transforming growth factor- $\beta$  in breast milk: A potential regulator of atopic disease at early age. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 104, n. 6, p. 1251-1257, 1999.

KEARLEY, J.; BARKER, J. E.; ROBINSON, D. S.; LLOYD, C. M. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is interleukin 10 dependent. **J. Exp. Med.**, v. 202, n.11, p. 1539-1547, 2005.

KRAMER, D. R.; SUTHERLAND, R. M.; BAO, S; Husband AJ. Cytokine mediated effects in mucosal immunity. **Immunol Cell Biol.**, v. 73, n. 5, p. 389-396, 1995.

KOCH, C.; BOESMAN, M.; GITLIN, D. Maternofoetal transfer of Gamma G immunoglobulins. **Nature**, v. 216, n. 120, p. 1116-1117, 1967

KUCHROO, V. K.; DAS, M. P.; BROWN, J. A.; RANGER, A. M.; ZAMVIL, S. S.; SOBEL, R. A.; WEINER, H. L.; NABAVI, N.; GLIMCHER, L.H. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. **Cell**, v. 80, n. 5, p. 707-718, 1995.

LAMBERT, P. H.; LIU, M.; SIEGRIST, C. A. Can successful vaccines teach us how to induce efficient protective immune responses? **Nat. Med.**, v. 11, p. S54–S62, 2005.

LEE, S. M.; SUEN, Y.; CHANG, L.; BRUNER, V.; QIAN, J.; INDES, J.; KNOPPEL, E.; VAN DE VEN, C.; CAIRO, M. S. Decreased interleukin-12 (IL-12) from activated cord versus adult peripheral blood mononuclear cells and upregulation of interferon-gamma, natural killer, and lymphokine-activated killer activity by IL-12 in cord blood mononuclear cells. **Blood**, v. 88, n. 3, p. 945-954, 1996.

LEE, Y. K.; TURNER, H.; MAYNARD, C. L.; OLIVER, J. R.; CHEN, D.; ELSON, C. O.; WEAVER, C. T. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. **Immunity**, v. 30, n. 1, p. 92-107, 2009.

LETTERIO, J.; ROBERTS, A. B. Regulation of immune responses by TFG-beta. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 16, p.137-161, 1998.

LEWKOWICH, I. P.; HERMAN, N. S.; SCHLEIFER, K. W.; DANCE, M. P.; CHEN, B. L.; DIENGER, K. M.; SPROLES, A. A.; SHAH, J. S.; KÖHL, J.; BELKAID, Y.; WILLS-KARP, M. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. **J. Exp. Med.**, v. 202, n. 11, p. 1549-1561, 2005.

LI, L.; LEE, H. H.; BELL, J. J.; GREGG, R. K.; ELLIS, J. S.; GESSNER, A.; ZAGHOUBANI, H. IL-4 utilizes an alternative receptor to drive apoptosis of Th1 cells and skews neonatal immunity toward Th2. **Immunity**. v. 20 n. 4, p. 429-440, 2004.

LIMA, C.; SOUZA, V. M.; FAQUIM-MAURO, E. L.; HOSHIDA, M. S.; BEVILACQUA, E.; MACEDO, M. S.; TAVARES-DE-LIMA, W.; VARGAFTIG, B. B. Modulation of the induction of lung and airway allergy in the offspring of IFN-gamma-treated mother mice. **J. Immunol.**, v. 175, n. 6, p. 3554-3559, 2005.

LU, M.; DAWICKI, W.; ZHANG, X.; HUANG, H.; NAYYAR, A.; GORDON, J. R. Therapeutic induction of tolerance by IL-10-differentiated dendritic cells in a mouse model of house dust mite-asthma. **Allergy**, v. 66, n. 5, p. 612-620, 2011.



MACEDO-SOARES, M. F.; ITAMI, D. M.; LIMA, C.; PERINI, A.; FAQUIM-MAURO, E. L.; MARTINS, M. A.; MACEDO, M. S. Lung eosinophilic inflammation and airway hyperreactivity are enhanced by murine anaphylactic, but not nonanaphylactic, IgG1 antibodies. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 114, n. 1, p. 97-104, 2004.

MAO, G.; WANG, J.; KANG, Y.; TAI, P.; WEN, J.; ZOU, Q.; LI, G.; OUYANG, H.; XIA, G.; WANG, B. Progesterone increases systemic and local uterine proportions of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells during midterm pregnancy in mice. **Endocrinology**, v. 151, n. 11, p. 5477-5488, 2010.

MARSHALL-CLARKE, S.; TASKER, L.; PARKHOUSE, R. M. Immature B lymphocytes from adult bone marrow exhibit a selective defect in induced hyperexpression of major histocompatibility complex class II and show B7.2 induction. **Immunology**, v. 100, n. 2, p. 141-151, 2000.

MELKILD, I.; GROENG, E. C.; LEIKVOLD, R. B.; GRANUM, B.; LØVIK, M. Maternal allergen immunization during pregnancy in a mouse model reduces adult allergy-related antibody responses in the offspring. **Clin, Exp, Allergy**, v. 32, n. 9, p. 1370-1376, 2002.

MIN, B.; LEGGE, K. L.; BELL, J. J.; GREGG, R. K.; LI, L.; CAPRIO, J. C.; ZAGHOUBANI, H. Neonatal exposure to antigen induces a defective CD40 ligand expression that undermines both IL-12 production by APC and IL-2 receptor up-regulation on splenic T cells and perpetuates IFN-gamma-dependent T cell anergy. **J. Immunol.**, v. 166, n. 9, p. 5594-5603, 2001.

MJÖSBERG, J.; BERG, G.; ERNERUDH, J.; EKERFELT, C. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in human pregnancy: development of a Treg-MLC-ELISPOT suppression assay and indications of paternal specific Tregs. **Immunology**, v. 120, n. 4, p. 456-466, 2007.

MORO, K.; YAMADA, T.; TANABE, M.; TAKEUCHI, T.; IKAWA, T.; KAWAMOTO, H.; FURUSAWA, J.; OHTANI, M.; FUJII, H.; KOYASU, S. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit<sup>(+)</sup>Sca-1<sup>(+)</sup> lymphoid cells. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 540-544, 2010.

MOTA, I.; WONG, D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. **Life Sci.**, v. 8, n. 16, p., 813 – 820, 1969.

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

MURPHY, K. M.; REINER, S. L. The lineage decisions of helper T cells. **Nat. Ver. Immunol.**, v. 2, n. 12, p. 933-944, 2002.

NAHMIAS, A. J.; KOURTIS, A. P. The great balancing acts. **Clin. Perinatol.**, v. 24, n. 2 , p. 497-521, 1997.

PALOMARES, O.; YAMAN, G.; AZKUR, A. K.; AKKOC, T.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. **Eur. J. Immunol.**, v. 40, n. 5, p. 1232-1240, 2010.

PAWANKAR, R.; BAENA-CAGNANI, C. E.; BOUSQUET, J.; CANONICA, G. W.; CRUZ, A. A., KALINER, M. A. State of World Allergy Report 2008: allergy and chronic respiratory diseases. **WAO J. Suppl.**, v. 1, p. S4–17, 2008.

PEDEN, D. B. Development of atopy and asthma: candidate environmental influences and important periods of exposure. **Environ. Health Perspect.**, v. 108, n. 3, p. 475-482, 2000.

PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; SARKAR, D.; WALTER, M. R.; SHI, Y.; FISHER, P. B. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v.22, p. 929-979, 2004.

PIHLGREN, M.; SCHALLERT, N.; TOUGNE, C.; BOZZOTTI, P.; KOVARIK, J.; FULURIJA, A.; KOSCO-VILBOIS, M.; LAMBERT, P. H.; SIEGRIST, C. A. Delayed and deficient establishment of the long-term bone marrow plasma cell pool during early life. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, n. 3, p. 939-946, 2001.

PIHLGREN, M.; TOUGNE, C.; BOZZOTTI, P.; FULURIJA, A.; DUCHOSAL, M. A.; LAMBERT, P. H.; SIEGRIST, C. A. Unresponsiveness to lymphoid-mediated signals at the neonatal follicular dendritic cell precursor level contributes to delayed germinal center induction and limitations of neonatal antibody responses to T-dependent antigens. **J. Immunol.**, v. 170, n. 6, p. 2824-2832, 2003.

PIHLGREN, M.; FRIEDLI, M.; TOUGNE, C.; ROCHAT, A. F.; LAMBERT, P. H.; SIEGRIST, C. A. Reduced ability of neonatal and early-life bone marrow stromal cells to support plasmablast survival. **J. Immunol.**, v. 176, n. 1, p. 165-172, 2006.

PITCHER-WILMOTT, R. W.; HINDOCHA, P.; WOOD, C. B. The placental transfer of IgG subclasses in human pregnancy. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 41, n. 2, p. 303-308, 1980.

RAGHAVAN, M.; BONAGURA, V. R.; MORRISON, S. L.; BJORKMAN, P. J. Analysis of the pH dependence of the neonatal Fc receptor/immunoglobulin G interaction using antibody and receptor variants. **Biochemistry**, v. 34, n. 45, p. 14649-14657, 1995.

RICHTER, M. Y.; JAKOBSEN, H.; BIRGISDOTTIR, A.; HAEUW, J. F.; POWER, U. F.; DEL GIUDICE, G.; BARTOLONI, A.; JONSDOTTIR, I. Immunization of female mice with glycoconjugates protects their offspring against encapsulated bacteria. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 1, p. 187-195, 2004.

RIDGE, J. P.; FUCHS, E. J.; MATZINGER, P. Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells. **Science**, v. 271, n. 5256, p. 1723-1726, 1996.

RIGATO, P. O.; FUSARO, A. E.; VICTOR, J. R.; SATO, M. N. Maternal immunization to modulate the development of allergic response and pathogen infections. **Immunotherapy**, v. 1, n. 1, p. 141-156, 2009.

ROBINSON, D. S.; LARCHÉ, M.; DURHAM, S. R. Tregs and allergic disease. **J. Clin. Invest.**, v. 114, n. 10, p. 1389-1397, 2004.

ROSE, S.; LICHTENHELD, M.; FOOTE, M. R.; ADKINS, B. Murine neonatal CD4<sup>+</sup> cells are poised for rapid Th2 effector-like function. **J. Immunol.**, v. 178, n. 5, p. 2667-2678, 2007.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; SHIMIZU, J.; YAMAZAKI, S.; SAKIHAMA, T.; ITOH, M.; KUNIYASU, Y.; NOMURA, T.; TODA, M.; TAKAHASHI, T. Immunologic tolerance maintained by CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. **Immunol. Rev.**, v. 182, p. 18-32, 2001.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 531–562, 2004.

SATO, M. N.; CARVALHO, A. F.; SILVA, A. O.; MACIEL, M. J. R.; FUSARO, A. E.; DUARTE, A. J. D. Low dose of orally administered antigen down-regulates the T helper type 2-response in a murine model of dust mite hypersensitivity. **Immunology**, v. 98, n. 3, p. 338-344, 1999.

SIEGRIST, C. A. Neonatal and early life vaccinology. **Vaccine**, v. 14, n. 19, p. 3331-3346, 2001.

SIEGRIST, C. A. The challenges of vaccine responses in early life: selected examples. **J. Comp. Pathol.**, v. 137, p. S4–S9, 2007.

STROBEL, S. Immunity induced after a feed of antigen during early life: oral tolerance sensitization. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 60, n. 4, p. 437-442, 2001.

SUZUKI, T.; ISHII-WATABE, A.; TADA, M.; KOBAYASHI, T.; KANAYASU-TOYODA, T.; KAWANISHI, T.; YAMAGUCHI, T. Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR. **J. Immunol.**, v. 184, n. 4, p. 1968-1976, 2010.

UPHAM JW; RATE, A.; ROWE, J.; KUSEL, M.; SLY, P. D; HOLT PG. Dendritic cell immaturity during infancy restricts the capacity to express vaccine-specific T-cell memory. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 2, p. 1106-1112, 2006

VAKIL, M.; SAUTER, H.; PAIGE, C.; KEARNEY, J. F. In vivo suppression of perinatal multispecific B cells results in a distortion of the adult B cell repertoire. **Eur. J. Immunol.**, v. 16, n. 9, p 1159-1165, 1986.

VAN SCOTT, M. R.; JUSTICE, J. P.; BRADFIELD, J. F.; ENRIGHT, E.; SIGOUNAS, A.; SUR, S. IL-10 reduces Th2 cytokine production and eosinophilia but augments airway reactivity in allergic mice. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 278, n. 4, p. 667-674, 2000.

VERHASSELT, V.; MILCENT, V.; CAZARETH, J.; KANDA, A.; FLEURY, S.; DOMBROWICZ, D.; GLAICHENHAUS, N.; JULIA, V. Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma. **Nat. Med.**, v. 14, n. 2, p. 170-175, 2008.

VICTOR, J. R.; FUSARO, A. E.; DUARTE, A. J. S.; SATO, M. N. Preconception maternal immunization to dust mite inhibits the type I hypersensitivity response of offspring. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, n. 2, p. 269-277, 2003.

VICTOR, J. R.; MUNIZ, B. P.; FUSARO, A. E.; DE BRITO, C. A.; TANIGUCHI, E. F.; DUARTE, A. J. S.; SATO, M. N. Maternal immunization with ovalbumin prevents neonatal allergy development and up-regulates inhibitory receptor Fc gamma RIIB expression on B cells. **BMC Immunol.**, v.11, p. 11:11, 2010.

VON MUTIUS, E. Environmental factors influencing the development and progression of pediatric asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 109, n. 6, p. S525-S532, 2002.

VON BÜLOW, G. U.; VAN DEURSEN, J. M.; BRAM, R. J. Regulation of the T-independent humoral response by TACI. **Immunity**, v. 14, n. 5, p. 573-582, 2001.

WARNER, J. O. The early life origins of asthma and related allergic disorders. **Arch. Dis. Child**, v. 89, n. 2, p. 97-102, 2004.

WEGMANN, T. G.; LIN, H.; GUILBERT, L.; MOSMANN, T. R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? **Immunol. Today**, v. 14, n. 7, p. 353-356, 1993.

WEINER, H. L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. **Immunol. Rev.**, v. 182, p. 207-214, 2001.

WU, L.; LIU, Y. J. Development of dendritic-cell lineages. **Immunity**, v. 26, n. 6, p. 741-750, 2007.

YAN, M.; WANG, H.; CHAN, B.; ROOSE-GIRMA, M.; ERICKSON, S.; BAKER, T.; TUMAS, D.; GREWAL, I. S.; DIXIT, V. M. Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 7, p. 638-643, 2001.

YOSHIDA, M.; CLAYPOOL, S. M.; WAGNER, J. S.; MIZOGUCHI, E.; MIZOGUCHI, A.; ROOPENIAN, D. C.; LENCER, W. I.; BLUMBERG, R. S. Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. **Immunity**, v. 20, n. 6, p. 769-783, 2004.