Marília Garcia De Oliveira

**EFEITO MODULADOR DA IMUNIZAÇÃO PRÉ-
CONCEPCIONAL MURINA COM OVA NA
MATURAÇÃO TÍMICA DE LINFÓCITOS $T\gamma\delta$ DA
PROLE COM POTENCIAL MODULADOR
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA ALERGIA**

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
2017

Marília Garcia De Oliveira

**EFEITO MODULADOR DA IMUNIZAÇÃO PRÉ-
CONCEPCIONAL MURINA COM OVA NA
MATURAÇÃO TÍMICA DE LINFÓCITOS $T\gamma\delta$ DA
PROLE COM POTENCIAL MODULADOR
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA ALERGIA**

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.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

Versão original

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Garcia de Oliveira, Marília

Efeito modulador da imunização pré-concepcional murina com OVA na maturação tímica de linfócitos Tgd da prole com potencial modulador sobre o desenvolvimento da alergia. / Marília Garcia de Oliveira; orientador Jean Pierre Schatzmann Peron. - São Paulo, 2017.

57 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Interação materno-fetal. 2. Efeito da transferência de anticorpos IgG maternos sobre a maturação tímica de linfócitos Tgd da prole. 3. Inibição da hipersensibilidade do tipo I. I. Schatzmann Peron, Jean Pierre, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marília Garcia de Oliveira

Titulo da Dissertação/Tese: Efeito modulador da imunização pré-concepcional murina com OVA na maturação tímica de linfócitos T $\gamma\delta$ da prole com potencial modulador sobre o desenvolvimento da alergia.

Orientador: Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **014** nas fls.**028** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Jean Pierre Schatzmann Peron**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeito da imunização pré-concepcional murina com OVA na maturação tímica de linfócitos TCD4+, TCD8+, nTreg, Tgammadelta, iNKT e B da prole: produção de citocinas e indução de populações com potencial regulador sobre a resposta alérgica*" do qual participam o(s) aluno(s) **Marília Garcia de Oliveira**, 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 **14.04.2015**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 17 de abril de 2015.

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

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho aos meus pais Vera Lúcia Garcia de Oliveira e Mauro Sérgio Araújo de Oliveira por reunirem todas as formas de amor para construir nossa linda família Por todo o incentivo e por sempre depositarem confiança e fé em tudo o que eu decido fazer. Meus irmãos, Willian Lucas Garcia de Oliveira e Leonardo Garcia de Oliveira, pela criação do que é essencial para a vida: a base e estrutura de qualquer relacionamento, algo que sempre será lembrado por mim. Minha cunhada Gabriela Aparecida Sodré da Silva por ser como uma irmã para mim e por conceber o amor de minha vida, Maurício. Meu querido sobrinho Maurício Sodré Garcia de Oliveira por me fazer enxergar a vida com mais beleza. Ao meu companheiro para toda esta vida, Bruno Vinícius Russo de Almeida, por estar ao meu lado incentivando todos os meus sonho e pelos momentos de alegria por comemorar cada conquista minha alcançada. Obrigada por despertar o melhor de mim em qualquer circunstância. Aos meus avós maternos, Olga e Mariano, e aos meus avós e anjinhos paternos, Terezinha e Euripedes, por estarem sempre olhando por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao Doutor Jefferson Russo Victor por me aceitar há quase cinco anos atrás como aluna de iniciação científica. Desde o início sempre estava disposto à ajudar e à conversar para retirar quaisquer dúvidas. Muito obrigada por incentivar e cultivar o meu amor pela ciência, mais especificamente pela Imunologia, desde as primeiras aulas na graduação.

Agradeço ao Professor Doutor Jean Pierre Schatzmann Peron por me receber carinhosamente como aluna e sempre estar disposto à me ajudar em qualquer situação que passamos juntos nesses dois anos de aprendizado.

À Professora Doutora Maria Notomi Sato por me receber de braços abertos em seu laboratório e pelo relacionamento criado, algo que posso afirmar com clareza, de mãe e filha. Agradeço imensamente por toda a preocupação comigo, dentro e fora do laboratório.

À Kessia Koda Vilela, minha grande amiga e colega de laboratório que nos deixou para brilhar ainda mais como um anjinho. E digo brilhar ainda mais, pois sua ajuda foi algo muito importante no desenvolvimento deste trabalho e, com certeza, você brilhou muito em vida.

Agradeço às minhas amigas Aline Lira e Amanda Inoue que foram mais do que essenciais no decorrer deste trabalho, pois tornaram a rotina de experimentos mais leve com a convivência alegre de todos os dias.

Agradeço imensamente à todos os amigos que conheci em laboratório e que lavarei para toda vida. Adrielli Costa, Anna Cláudia Branco, Anna Júlia Pietrobon, Augusto Cruz, Beatriz Shida, Camila de Lollo, Cesar Cervantes, Cyro de Brito, Elaine Uehara, Fabiana Hirata, Fábio Seiti, Fábio Sgnotto, Franciane Teixeira, Gabriel Costa, Gabrielle Mitsunari, Gisely Mourão, Jana Trancoso, Josenilson de Lima, Kelly Manfrere, Luana de Mendonça, Luanda Oliveira, Mayte Stocco, Marina Torrealba, Nátalli Zanete, Raíssa Bastos, Rosana Domingues, Tiago Titz, Vanessa Faro, Vanessa Gonçalves e Yasmim Leuzzi.

Agradeço especialmente à Noemia Orii, Rosângela Araújo e Patrícia Oliveira do setor de Citometria de Fluxo do LIM-56.

Àos colegas e integrantes do LIM-56 por toda a parceria direta ou indiretamente.

Ao Professor Doutor Alberto José da Silva Duarte por tornar possível a realização de cada trabalho através de seu empenho em construir o LIM-56.

Aos componentes da banca de qualificação Professor Doutor Antônio Condino Neto, Doutora Patrícia Palmeira e Doutora Tatiana Takiishi pelas contribuições e melhorias na dissertação.

À Alexsander Seixas de Souza, técnico responsável pelo setor de Microscopia Confocal do Instituto Butantan.

À Nicole Caroline Mambelli Lisboa e à todos os colegas do Laboratório de Genética do Instituto Butantan.

Agradeço especialmente à fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio na realização deste trabalho.

“Ninguém testemunhou o que estava para acontecer. O "tempo" não existia; a realidade existia fora do tempo, pura permanência. O espaço não existia. A distância entre dois pontos era imensurável. Os pontos podiam estar aqui ou ali, suspensos, saltitantes. Entrelaçado em si próprio, o espaço aprisionava o infinito. De repente, um tremor; uma vibração, uma ordem que nascia. O espaço pulsava, ondulando sobre o nada. O que era perto se afastou. O agora virou passado. O espaço nasceu com o tempo. Ao falarmos em espaço, pensamos em conteúdo. Ao falarmos em tempo, pensamos em transformação. E assim foi. O espaço borbulhou; o tempo, incerto, iniciou sua marcha. Da agitação conjunta do espaço e do tempo surgiu a matéria, expelida de seus poros. Mas atenção! Essa não era uma matéria ordinária feita a nossa. Ela fez o espaço crescer, inflar, como um balão. Esse balão é o nosso Universo.”

Marcelo Gleiser, 2010.

RESUMO

OLIVEIRA, MG. **Efeito modulador da imunização pré-concepcional murina com ova na maturação tímica de linfócitos $T\gamma\delta$ da prole com potencial modulador sobre o desenvolvimento da alergia.** 2017. 59.

Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Para elucidar os mecanismos envolvidos na inibição da hipersensibilidade do tipo I em proles murinas mediada pela imunização materna com Ovalbumina (OVA), as proles foram avaliadas quanto aos linfócitos $T\gamma\delta$ produtores de IL-17 (CD27⁻). A imunização materna com OVA reduziu a expressão de CD27, o que também se refletiu nos pulmões, e a produção de IL-17 por linfócitos $T\gamma\delta$ das proles. A redução da expressão de CD27 também foi evidenciada em linfócitos $T\gamma\delta$ intratímicos das proles após a transferência passiva de anticorpos IgG alérgico específicos para fêmeas gestantes não imunizadas e *in vitro* em resposta a estes mesmos anticorpos, efeito que parece envolver a expressão de receptores para IgG expressos por outras células presentes no timo. As evidências obtidas indicam que a imunização materna influi na maturação tímica de linfócitos inibindo a população que colaborara com a inflamação alérgica. Aparentemente, os anticorpos IgG maternos são responsáveis por este fenômeno e a população estudada está envolvida na inibição da inflamação alérgica observada nas proles.

Palavras-chave: Alergia. Anticorpos IgG maternos. Interação materno-fetal. Linfócitos $T\gamma\delta$.

ABSTRACT

OLIVEIRA, MG. Modulating effect of murine pre-conception immunization with OVA on the thymic maturation of $\gamma\delta$ T lymphocytes from offspring with modulator potential on the development of allergy.

Masters thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

To elucidate the mechanisms involved in inhibition of type I hypersensitivity in murine offspring mediated by maternal immunization with Ovalbumin (OVA), the offspring were evaluated as IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells (CD27⁻). Maternal immunization with OVA reduced the expression of CD27, which was also reflected in the lungs, and the production of IL-17 by $\gamma\delta$ T cells of offspring. Reduction of CD27 expression was also evidenced in intrathymic $\gamma\delta$ T cells of offspring after passive transfer of allergen-specific IgG antibodies to non-immunized pregnant females and *in vitro* in response to these same antibodies, effect that seems to involve the expression of IgG receptors expressed by other cells present in the thymus. Evidence obtained indicates that maternal immunization influences the thymic maturation of lymphocytes by inhibiting the population that collaborate with allergic inflammation. Apparently, maternal IgG antibodies are responsible for this phenomenon and the population studied is involved in the inhibition of allergic inflammation observed in offspring.

Keywords: Allergy. Maternal IgG antibodies. Maternal-fetal interactions. $\gamma\delta$ T cells.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Hipersensibilidade do tipo I.....	14
1.2 Estratégias para a prevenção de alergia.....	15
1.3 Imunidade materna.....	16
1.4 Imunidade neonatal.....	16
1.5 Interação da imunidade materna e neonatal.....	17
1.6 O órgão timo.....	19
1.7 Linfócitos $T\gamma\delta$	20
1.8 Considerações finais e hipótese do trabalho.....	21
2 OBJETIVOS	22
3 MÉTODOS.....	23
3.1 Animais.....	23
3.2 Antígenos.....	23
3.3 Protocolo de imunização materna com OVA ou MOG 35-55.....	23
3.4 Obtenção de timócitos.....	23
3.5 Obtenção de esplenócitos.....	24
3.6 Protocolo de imunização neonatal com OVA.....	24
3.7 Protocolo de indução de inflamação alérgica pulmonar.....	24
3.8 Avaliação do lavado bronco-alveolar.....	25
3.9 Obtenção de células pulmonares após dissociação do tecido.....	25
3.10 Purificação de linfócitos $T\gamma\delta$ à partir de timócitos totais.....	25
3.11 Purificação de anticorpos IgG.....	26
3.12 ELISA para avaliação das subclasses de IgG totais e anti-OVA.....	26
3.13 Avaliação do efeito de anticorpos IgG purificados <i>in vivo</i> sobre timócitos e linfócitos periféricos das proles.....	27

3.14	Avaliação <i>in vitro</i> do efeito de anticorpos IgG maternos sobre timócitos das proles	27
3.15	Citometria de fluxo para avaliação de moléculas extracelulares.....	28
3.16	Citometria de fluxo para avaliação de moléculas intracelulares.....	28
3.17	Conjugação do <i>pool</i> de anticorpos IgG purificados ao fluoróforo Cy3.....	29
3.18	Microscopia confocal para avaliação da reatividade e permeabilidade do <i>pool</i> de anticorpos IgG purificados sobre linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos das proles.....	29
3.19	Análise estatística.....	29
3.20	Aspectos éticos.....	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Avaliação da frequência, estágios de maturação e expressão do marcador de superfície CD27 em linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos das proles.....	30
4.2	Avaliação do efeito da imunização materna com OVA sobre a produção intracelular de IL-17 e sobre a expressão de CD28 por linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos e periféricos das proles.....	33
4.3	Identificação e avaliação fenotípica linfócitos T $\gamma\delta$ infiltrados no tecido pulmonar e presentes no LBA das proles.....	37
4.4	Avaliação do efeito da transferência passiva de anticorpos IgG purificados sobre linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos e periféricos das proles.....	40
4.5	Avaliação <i>in vitro</i> do efeito de anticorpos IgG purificados sobre a maturação e fenótipo de linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos das proles.....	42
4.6	Avaliação da expressão de receptores de anticorpos IgG nas células do timo e da reatividade e permeabilidade de anticorpos IgG purificados sobre linfócitos T $\gamma\delta$ das proles.....	44
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o relatório da Organização Mundial de Alergia (WAO) estima-se que 400 milhões de pessoas no mundo desenvolvem o tipo mais frequente de alergia, a rinite alérgica e que 300 milhões desenvolvam asma alérgica. Isto representa um gasto anual com o tratamento de alergias superior a soma do gasto utilizado para o tratamento da tuberculose e da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA - WAO State of World Allergy Report, 2008).

Nosso grupo vem estudando os mecanismos envolvidos na regulação da resposta alérgica da prole mediada pela imunização materna com alérgenos nos últimos 15 anos. Neste período diferentes mecanismos foram estudados incluindo a transferência passiva de antígenos, anticorpos e citocinas maternas, a indução de alterações fenotípicas nos linfócitos e a indução de populações reguladoras nas proles (FUSARO et al., 2002; FUSARO et al., 2007; FUSARO et al., 2009; MUNIZ et al., 2014; VICTOR et al., 2003; VICTOR et al., 2010).

Atualmente a influência da imunidade materna sobre a regulação da resposta alérgica da prole ainda não é totalmente compreendida. Neste projeto pretendemos investigar parâmetros inéditos na literatura incluindo a influência da imunização materna sobre uma das principais populações de linfócitos maturadas no timo de camundongos, os linfócitos $T\gamma\delta$.

Como revisado recentemente, a imunização materna com alérgenos permite a interação idiotípica entre anticorpos maternos e receptores TCR de linfócitos T imaturos da prole, e a transferência de fatores maternos como citocinas pode influir no fenótipo e maturação de populações de linfócitos T da prole (VICTOR, 2014). Neste sentido, é possível que a imunização materna possa influir na maturação de linfócitos no timo.

1.1 Hipersensibilidades do tipo I

As alergias são manifestações clínicas das reações de hipersensibilidade do tipo I, caracterizadas por uma intensa resposta imune do padrão Th2 com alta produção de anticorpos IgE contra antígenos inócuos, podendo ocasionar danos ao organismo. As manifestações clínicas mais comuns são a asma; rinite; anafilaxias; alergias a drogas, insetos e alimentos; eczemas; urticárias e angioedemas. Atualmente 30 a 40% da população mundial é acometida por uma ou mais manifestações alérgicas em países desenvolvidos e em desenvolvimento (WAO WHITE BOOK ON ALLERGY, 2011).

A resposta alérgica tem início com a sensibilização do organismo, onde os alérgenos são reconhecidos por células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas. Estes antígenos são apresentados via moléculas do MHC classe II a linfócitos TCD4, os quais apresentam tendência

ao desenvolvimento do padrão Th2 em indivíduos geneticamente predispostos, ou atópicos, sendo caracterizado pelo predomínio da secreção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. Estas citocinas apresentam similaridades estruturais e, em camundongos, os genes responsáveis por sua produção estão localizados no cromossomo 11 (MCKENZIE et al., 1993).

O predomínio do padrão Th2 favorece a produção de anticorpos IgE específicos ao alérgeno, que se ligam a receptores de alta afinidade para a IgE (FcεRI) expressos na membrana dos mastócitos presentes em tecidos conjuntivos. Em contato subsequente com o antígeno, quando duas moléculas de IgE se ligam simultaneamente ao alérgeno, tem início a ativação do mastócito resultando na liberação de mediadores pré-formados como a histamina, proteases, citocinas e proteoglicanos, além de dar início a síntese de outros mediadores pró-inflamatórios derivados do metabolismo do ácido aracídico (BOYCE, 2004). Estas moléculas desencadeiam os sintomas alérgicos de acordo com o tecido acometido, como a rinite alérgica, com o acometimento da mucosa nasal e a asma alérgica com o acometimento da mucosa pulmonar.

O desenvolvimento da alergia é influenciado por fatores genéticos e ambientais. Inicialmente a formação de respostas alérgicas foi intensivamente relacionada à genes que participam da síntese dos anticorpos IgE, da inflamação alérgica e da hiper-reatividade de células e órgãos (ROMAGNANI, 1994). Por outro lado, os fatores ambientais têm mostrado grande relevância no desenvolvimento de alergias. Estudos epidemiológicos mostraram que a exposição a agentes infecciosos especialmente durante a infância está relacionada a proteção contra doenças alérgicas (STRACHAN; SANDERS, 1989). Avaliações posteriores sedimentaram esta relação, mostrando que infecções por helmintos (DEL PRETE et al., 1994) e a exposição ambiental a endotoxinas, produtos derivados de micro-organismos, (BRAUN-FAHRLÄNDER et al., 2002) diminuem a frequência do desenvolvimento de alergias.

1.2 Estratégias para a prevenção de alergia

As estratégias de prevenção de alergia são classificadas em três níveis, as estratégias primárias, que visam à prevenção da sensibilização do organismo, as secundárias, que visam à prevenção do desenvolvimento de alergia em organismos previamente sensibilizados, e as terciárias, caracterizadas pelo tratamento dos sintomas da doença alérgica (WARNER; WARNER, 2000).

A melhor estratégia de prevenção de alergia ocorre com em nível primário, uma vez que com estas medidas, podemos garantir a ausência da doença. Este tipo de estratégia vem sendo estudada há anos por nosso grupo em modelos murinos de imunização e/ou exposição materna a alérgenos (DE LIMA LIRA et al., 2014; FUSARO et al., 2007; FUSARO et al., 2009; VICTOR et

al., 2003; VICTOR et al., 2010) neste período, notamos que a utilização destes modelos experimentais deve considerar três importantes aspectos, a imunidade materna durante a gestação, a imunidade neonatal e a interação entre ambas os quais serão discutidos a seguir.

1.3 Imunidade materna

A imunidade materna durante a gestação é caracterizada por um predomínio do padrão Th2 (WEGMANN et al., 1993), com a secreção de citocinas como a IL-4, IL-5 e IL-6 que são responsáveis pela sobrevivência do feto no útero. Isto pode ser observado especialmente no primeiro trimestre de gestação onde o predomínio Th2 é mais intenso (KIM et al., 2008). Por outro lado, a secreção de altos níveis de citocinas do padrão Th1 como a IL-2, IFN- γ e TNF- α está relacionada à ativação de células NK, que são prejudiciais ao tecido placentário e promotoras da reabsorção fetal, sugerindo com isso que o sucesso da gestação pode estar ligado ao equilíbrio entre os padrões Th1 e Th2 (DEALTRY et al., 2000). Citocinas como a IL-17 e a IL-18, características do padrão Th1, também podem ser detectadas na interface materno fetal e aparentemente o predomínio de IL-18 está relacionado ao sucesso da gestação em camundongos (OSTOJIC et al., 2003).

Na placenta também está presente o IFN- γ , produzido principalmente por células NK e trofoblastos em algumas espécies o qual participa da vascularização, angiogênese e da manutenção do tecido da placenta (MURPHY et al., 2009). Desta forma, é possível que a regulação da resposta imune materna durante a gestação não obedeça a uma regra simples de polarização entre um dos padrões de citocinas, Th1 ou Th2 (CHAOUAT, 2007), mas sim, a outros fatores induzidos durante este período.

As fêmeas gestantes em linhagens isogênicas de camundongos sofrem alterações celulares como o aumento do tamanho do baço e de linfonodos, sugerindo a proliferação dos linfócitos maternos independente de estímulo alogênico ou provavelmente à estimulação hormonal materna (BEAGLEY; GOCKEL, 2003).

1.4 Imunidade neonatal

No período neonatal, também há predisposição ao desenvolvimento de respostas do padrão Th2, como ocorre durante a gestação, o que pode ser evidenciado em protocolos de imunização com vírus vivos ou atenuados onde, ao contrário do observado em adultos, há o predomínio da resposta Th1 (BOT et al., 1999).

A capacidade de apresentação de antígenos em neonatos é reduzida devido ao menor número de células apresentadoras de antígenos, que apresentam uma capacidade inferior de

processar antígenos e de expressar moléculas do MHC-II e CD86 em comparação a animais adultos, comprometendo a formação da sinapse imunológica (MARSHALL-CLARKE et al., 2000).

No período neonatal os camundongos também apresentam baixa produção de anticorpos em comparação a animais adultos. Isto se deve aos linfócitos B esplênicos destes camundongos apresentarem, em sua maioria, um fenótipo composto por anticorpos IgM de membrana na ausência ou na baixa expressão de IgD, caracterizando uma predominância de células imaturas. Além disso, os poucos linfócitos B maduros encontrados nestes animais, expressam a molécula CD40 em menor intensidade e a expressão do ligante CD40L em linfócitos T também esta reduzida, o que dificulta a troca de isótipo de anticorpos (ADKINS et al., 2004).

A capacidade de migração de linfócitos B secretores de anticorpos para a medula óssea de camundongos com quatro semanas de idade é normal em comparação a animais adultos. Isto ocorre devido a produção da quimiocina CXCL12, principal fator quimiotático para a migração de linfócitos B para a medula óssea, em níveis similares aos camundongos adultos, conforme demonstrado em um modelo murino de imunização passiva com linfócitos B específicos ao toxóide tetânico em animais recém nascidos ou adultos.

1.5 Interação da imunidade materna e neonatal

A interação entre o sistema imune materno e fetal é intensa, seja pela via placentária ou pela amamentação. Esta última também tem como papel promover função protetora nas infecções respiratórias e gastrointestinais, diminuindo a ocorrência de doenças autoimunes e alérgicas, mesmo em famílias geneticamente predispostas (BUSINCO et al., 1983; HOWIE et al., 1990).

A transferência de anticorpos maternos para a prole é mediada predominantemente pelo receptor FcRn (SIMISTER; REES, 1985). Em roedores, este mecanismo tem especial importância durante a amamentação e ocorre também pela expressão dos receptores FcRn nas células epiteliais do intestino dos neonatos (JONES; WALDMANN, 1972).

Os anticorpos maternos podem neutralizar os antígenos ofertados à prole diminuindo o seu processamento, apresentação e conseqüentemente a indução de resposta imune neonatal (SIEGRIST, 2001). Neste caso, os anticorpos IgG maternos circulantes na prole formariam imunocomplexos com os alérgenos inalados ou ingeridos, os quais são eliminados da circulação antes mesmo de seu reconhecimento pelas células do sistema imune. Conseqüentemente, há redução da sensibilização da prole, bem como, da produção de anticorpos, especialmente da classe IgE. A neutralização de antígenos pela presença de anticorpos maternos não é capaz de impedir a sensibilização da prole na imunização de camundongos neonatos contra o sarampo e o toxóide tetânico (SIEGRIST et al., 1998). Neste modelo, a presença de altos níveis de anticorpos maternos

interfere na resposta humoral, mas não impede a indução de imunidade mediada por linfócitos T, os quais foram capazes de produzir citocinas como o IFN- γ e a IL-5 e a atividade citotóxica em níveis normais.

Por outro lado, os anticorpos maternos podem interagir diretamente com o sistema imune da prole mesmo na ausência do antígeno. Neste sentido, foi demonstrada a inibição da produção de anticorpos IgE anti-fosfolipase A2 (veneno de abelha) na prole de camundongos após a transferência de anticorpo IgG anti-fosfolipase A2, demonstrando a influência dos anticorpos maternos mesmo na ausência do antígeno (SEEGER et al., 1998). Este fenômeno promovido pelos anticorpos maternos pode ser mediado por interações entre os idiótipos dos anticorpos e exercer função estimuladora e/ou reguladora na proliferação dos linfócitos B e T (JERNE, 1984). Anticorpos maternos influenciam a formação do repertório celular da prole através de interações idiotípicas com os receptores de linfócitos B como evidenciado em coelhos (BORGHESI; NICOLETTI, 1996). Interações idiotípicas entre os anticorpos maternos e os receptores de linfócitos B ou T imaturos no período fetal (BOGEN et al., 1993; VAKIL et al., 1986) ou com linfócitos B e T maduros da prole são capazes de selecionar o repertório de linfócitos B e T (GHOSH; CHAKRABARTI, 1993).

Essas alterações induzidas pelos anticorpos maternos transferidos a prole tem longa duração e resultam em alterações funcionais na reposta humoral da prole como evidenciado em modelo murino de infecção com o vírus da estomatite vesicular (FINK et al., 2008). A capacidade dos anticorpos maternos influírem na função e repertório imune da prole se dá o nome de *maternal imprinting*.

A transferência de anticorpos IgG maternos contra alérgenos de epitélios de gato, pólen (JENMALM; BJÖRKSTÉN, 2000) ou a antígenos alimentares, como a OVA (VANCE et al., 2004) estão relacionados a menor predisposição para o desenvolvimento de alergia em crianças durante os primeiros anos de vida. Em modelos experimentais a IgG materna em resposta a imunização com OVA foi capaz de suprimir a resposta IgE dos filhotes (JARRETT; HALL, 1983).

Além disso, em humanos também já foi evidenciado no contexto da alergia que a transferência passiva de anticorpos IgG maternos anti-Derp está relacionada a proteção quanto ao desenvolvimento de alergia nos filhos (MACCHIAVERNI et al., 2011).

Em conjunto, estas evidências revelam o grande potencial dos anticorpos maternos como inibidores da alergia nas proles, porém, até o momento não foram elucidados todos os mecanismos responsáveis por este fenômeno, sendo a literatura especialmente carente de trabalhos que investiguem o papel do *maternal imprinting* neste contexto.

Em suma, diferentes mecanismos são sugeridos na regulação da resposta alérgica da prole mediada pela imunização materna com alérgenos. Alguns foram descritos por nosso grupo, porém em conjunto com a literatura, atualmente a influência da imunidade materna ainda não é totalmente compreendida.

1.6 O órgão timo

O timo é o primeiro órgão linfoide a se formar durante a gestação, derivando-se da 3^a e 4^a bolsas branquiais. Em humanos, o timo apresenta cerca de 2/3 de seu peso maduro ao nascimento e alcança o pico de sua massa por volta dos 10 anos de idade.

Este órgão linfoide primário é constituído por lóbulos os quais são divididos em córtex (externos) e medula (centrais). No córtex há timócitos imaturos e macrófagos esparsos, que participam da eliminação de timócitos apoptóticos. A região medular abriga timócitos maduros, macrófagos e células dendríticas tímicas (tDCs). Entre o córtex e a medula há células epiteliais que expressam moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) I e II. No interior do timo, estas moléculas apresentam apenas peptídeos de antígenos próprios e são cruciais nos processos de seleção de linfócitos T.

Células progenitoras de linfócitos provenientes da medula óssea chegam ao timo e sofrem o processo de maturação por aproximadamente sete dias. Em um camundongo jovem o timo contém cerca de 10^8 a 2×10^8 timócitos, e cerca de 5×10^7 novas células são produzidas diariamente. Entretanto, apenas 10^6 a 2×10^6 (2 a 4%) dessas células deixam o timo a cada dia como linfócitos T maduros. Estas observações indicam que aproximadamente 98% dos timócitos gerados morrem por apoptose dentro do timo.

O processo de maturação ocorre a partir do córtex, onde observamos as fases iniciais de maturação, no sentido da medula, onde se observa um predomínio de linfócitos TCD4 e TCD8 maduros. Após o processo de maturação tímica predominantemente são maturados linfócitos T que apresentam TCR composto por cadeias α e β e expressam moléculas na membrana. Porém, também são formados linfócitos T que expressam TCR composto por cadeias γ e δ como será discutido a seguir. Além disso, recentemente foi demonstrado que o tipo de célula progenitora infiltrada no timo varia durante a fase fetal. Em uma etapa inicial, infiltram células progenitoras capazes de gerar linfócitos T e posteriormente, células progenitoras capazes de gerar linfócitos B e outras células mieloides (RAMOND et al., 2014).

Na literatura são encontradas poucas evidências que relacionam a atividade tímica com o desenvolvimento de doenças alérgicas, porém, foi evidenciado há alguns anos que o tratamento de pacientes alérgicos através da imunoterapia alérgeno-específica para ácaros de poeira doméstica,

protocolo de alta eficiência no tratamento de alergias, é capaz de induzir um aumento da frequência de linfócitos T recém emigrados do timo na periferia (PEREIRA et al., 2012).

Portanto, considerando que o timo é capaz de maturar linfócitos $T\gamma\delta$ e que estes tem potencial modulador, é possível que a influência sobre a maturação desta população seja capaz de promover a inibição do desenvolvimento de alergia mediada pela imunização materna.

1.7 Linfócitos $T\gamma\delta$

Os linfócitos $T\gamma\delta$ representam cerca de 3% dos linfócitos T maduros presentes em órgãos linfoides secundários e sangue periférico. Esta população de linfócitos pode ser observada na fase fetal e confere imunidade durante o período neonatal antes da completa maturação do sistema imune adaptativo (SINKORA et al., 2005). Presentes principalmente nos tecidos linfoides associados a mucosa estes linfócitos representam aproximadamente metade dos linfócitos intraepiteliais observados no intestino.

Diferente da maioria dos linfócitos T maturados no timo, estes linfócitos expressam receptores TCR compostos por cadeias γ e δ . Desta forma, estes linfócitos não são capazes de interagir com complexos MHC-peptídeos como os linfócitos T que expressam receptores compostos por cadeias α e β . Consequentemente os linfócitos $T\gamma\delta$ não estão sujeitos aos mesmos processos de seleção e ativação discutidos anteriormente no contexto de maturação intratímica.

Durante sua maturação os linfócitos $T\gamma\delta$ expressam diferentes fenótipos, em um estágio precoce esta população expressa o receptor $TCR\gamma\delta$ e as moléculas CD27, CD25 e CD24. Posteriormente a expressão do CD25 é perdida e em um estágio final de maturação é mantido apenas o CD27 combinado a expressão do CD44 (PANG et al., 2012).

Por outro lado, os linfócitos $T\gamma\delta$ expressam em sua membrana diversos receptores que os tornam sensíveis a presença de citocinas, quimiocinas e PAMPs (Padrões moleculares associados a patógenos), estas moléculas são responsáveis pela ativação dos linfócitos $T\gamma\delta$ e induzem a alta produção de citocinas independente da ativação via TCR.

Em camundongos foram descritas duas principais sub populações de linfócitos $T\gamma\delta$, caracterizadas pela produção de $IFN-\gamma$ ou IL-17 (RIBOT et al., 2009). Fenotipicamente estas populações podem ser identificadas e distinguidas pela expressão do receptor CD27, o qual é expresso nos linfócitos $T\gamma\delta$ secretores de $IFN-\gamma$ e não é expresso nos linfócitos $T\gamma\delta$ secretores de IL-17. Os linfócitos $T\gamma\delta$ produtores de $IFN-\gamma$ podem ainda expressar as moléculas CD122 e CD44 em sua membrana.

Os linfócitos $T\gamma\delta$ secretores de IL-17 tem se destacado na literatura por exercerem papel importante na regulação da imunidade contra patógenos como a *Klebsiella pneumonia* e a

Salmonella enterica, e doenças autoimunes como a encefalomielite autoimune experimental (EAE) e a artrite destrutiva crônica (HAPPEL et al., 2003; PLATER-ZYBERK et al., 2009; SCHULZ et al., 2008; SUTTON et al., 2006).

Em humanos não foram descritos linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IFN- γ , porém, já foram identificados linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 em pacientes com psoríase e meningite bacteriana (CACCAMO et al., 2011; LAGGNER et al., 2011).

Até o presente momento o efeito da imunização materna com alérgenos, especialmente dos anticorpos IgG, sobre a maturação, produção de citocinas e função dos linfócitos T $\gamma\delta$ maturados na prole não é descrito.

1.8 Considerações finais e hipótese do trabalho

Com base nos argumentos discutidos observamos que os linfócitos T $\gamma\delta$ maturados no timo são capazes de modular a resposta imune. Nosso grupo vem demonstrando que a imunização materna com OVA é capaz de inibir o desenvolvimento de alergia nas proles utilizando alérgenos como a OVA e o ácaro Der p (DE LIMA LIRA et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2017; VICTOR et al., 2003; VICTOR et al., 2010), mas de fato os mecanismos envolvidos neste fenômeno ainda precisam ser elucidados. A hipótese deste trabalho se baseia na possibilidade de haverem alterações quantitativas ou modulação da secreção de citocinas por linfócitos T $\gamma\delta$ em decorrência da imunização materna com alérgenos (VICTOR, 2014). Esta influência pode impactar o desenvolvimento de alergia nas proles elucidando os mecanismos envolvidos na regulação mediada pela imunização materna.

A atual hipótese do grupo (VICTOR, 2016) enfatiza um possível papel de anticorpos IgG maternos exercendo influência reguladora sobre a ativação e/ou maturação de linfócitos T e B maturados em órgão linfoides primários da prole, neste trabalho esta hipótese foi elucidada no contexto dos linfócitos T $\gamma\delta$ os quais são maturados no timo.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da imunização materna com OVA sobre a maturação de linfócitos $T\gamma\delta$ intratímicos com potencial modulador nas proles e com ênfase no efeito de anticorpos IgG maternos, para tanto foram propostos os seguintes objetivos específicos:

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Avaliação da frequência, estágios de maturação, fenótipo e produção intracelular de IL-17 por linfócitos $T\gamma\delta$ intratímicos e periféricos das proles de mães não imunizadas, tratadas com adjuvante (Hidróxido de Alumínio - Alum), imunizadas com OVA ou imunizadas com MOG 35-55;
- B. Avaliação da frequência e fenótipo de linfócitos $T\gamma\delta$ infiltrados no tecido pulmonar e presentes no lavado bronco-alveolar das proles de mães imunizadas ou não com OVA e submetidas ao protocolo de inflamação alérgica pulmonar;
- C. Produção de um *pool* de anticorpos IgG purificados proveniente de fêmeas imunizadas ou não com OVA e avaliação da frequência das subclasses de IgG e sua especificidade;
- D. Avaliação *in vivo* do efeito da transferência passiva de anticorpos IgG purificados de fêmeas imunizadas ou não com OVA sobre a frequência, estágios de maturação, fenótipo e produção intracelular de IL-17 por linfócitos $T\gamma\delta$ intratímicos das proles.
- E. Avaliação *in vitro* do efeito de anticorpos IgG purificados de fêmeas imunizadas ou não com OVA sobre a frequência, estágios de maturação, fenótipo e produção intracelular de IL-17 por linfócitos $T\gamma\delta$ intratímicos das proles;
- F. Avaliação da expressão de receptores para anticorpos IgG ($Fc\gamma$ Rs: CD16 e CD32) nas principais populações celulares presentes no timo das proles;
- G. Avaliação da reatividade e permeabilidade de anticorpos IgG purificados sobre linfócitos $T\gamma\delta$ intratímicos das proles.

3 MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos isogênicos C57BL/6 *wild type* (WT) ou knockout de CD28 (CD28^{-/-}) fêmeas e machos foram utilizados com oito a 10 semanas de idade. Os animais WT foram adquiridos através do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP e os animais knockout foram adquiridos do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas IV da USP. A prole (F1) de ambos os sexos foi utilizada no período neonatal, aos 20 e 52 dias de idade.

Foram utilizados de nove a 15 camundongos de ambos os sexos, por grupo e em ao menos três experimentos independentes para todos os métodos descritos a seguir. Os grupos adotados neste trabalho foram organizados da seguinte maneira:

- A- Grupo controle: proles de mães não imunizadas (não imunizadas);
- B- Grupo controle: proles de mães tratadas apenas com o adjuvante de imunização (Alum);
- C- Grupo experimental: proles de mães imunizadas com a proteína OVA em adjuvante (OVA);
- D- Grupo controle: proles de mães imunizadas com a proteína heteróloga MOG 35-55 em adjuvante (MOG).

3.2 Antígenos

Foi utilizada a ovalbumina (OVA Grau V – Sigma, St Louis, MO, EUA) ou, como antígeno heterólogo, a glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG 35-55 – Sigma, St Louis, MO, EUA).

3.3 Protocolo de imunização materna com OVA ou MOG 35-55

Camundongos fêmeas com 8 a 10 semanas de idade foram imunizadas por via subcutânea (sc) com 1500 µg de OVA (Grau V – Sigma, St Louis, MO, EUA) ou com 150 mg de MOG 35-55 (Sigma, St Louis, MO, EUA) em 6mg de Al(OH)₃ (Hidróxido de alumínio – FURP, São Paulo) e reforçadas com 1000 µg de OVA ou 50 mg de MOG 35-55 em salina pela via intraperitoneal (ip) após 10 e 20 dias. As fêmeas foram acasaladas no 21º dia pós imunização (dpi).

Alguns grupos de animais derivados de fêmeas que não foram imunizadas ou que receberam apenas 6 mg de Al(OH)₃ (Hidróxido de alumínio – FURP, São Paulo) também foram utilizados como grupos controle.

3.4 Obtenção de timócitos

As proles dos grupos de animais foram avaliadas aos três (período neonatal) ou aos 20 dias de idade. Para tanto, os animais foram anestesiados e o timo removido de forma asséptica e depositado em placas de petri contendo meio de cultura RPMI 1640 (Sigma). Com o auxílio de peneiras para cultura celular (Cell Strainer – BD Biosciences, MA, EUA) o tecido tímico foi macerado com êmbolo de seringa de 1 mL e a suspensão celular foi lavada por centrifugação durante 10 minutos a 200 x g em meio de cultura RPMI (Cultilab, SP, Brasil) por 2 vezes. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (SFB – HyClone III, Logan, EUA). As células foram quantificadas e a viabilidade foi observada com azul de tripan 0,5% em câmara de Neubauer.

3.5 Obtenção de esplenócitos

Os animais foram anestesiados e o baço removido de forma asséptica e depositado em placas de petri contendo meio de cultura RPMI 1640 (Sigma). Com o auxílio de peneiras para cultura celular (Cell Strainer – BD Biosciences, MA, EUA) a polpa do baço foi macerada com êmbolo de seringa de 1 mL e a suspensão celular foi tratada com 600 µL da solução de lise de eritrócitos (ACK *Lysing Buffer* – Biosource, Rockville, MD, EUA) por 1 minuto. A seguir, a suspensão celular foi lavada por centrifugação durante 10 minutos a 200 x g em salina com outra lavagem posterior em meio de cultura RPMI (Cultilab, SP, Brasil). Posteriormente, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (SFB – HyClone III, Logan, EUA). As células foram quantificadas e a viabilidade foi observada com azul de tripan 0,5% em câmara de Neubauer.

3.6 Protocolo de imunização neonatal com OVA

Aos três dias de idade, os animais de ambos os sexos de mães imunizadas ou não com OVA foram imunizados por via intraperitoneal (ip) com 100 µg de OVA (Grau V – Sigma, St Louis, MO, EUA) em 6 mg de Al(OH)₃ (Hidróxido de alumínio – FURP, São Paulo) e reforçadas com 100 µg de OVA em salina pela via intraperitoneal (ip) após 10 dias.

3.7 Protocolo de indução de inflamação alérgica pulmonar

Após o desmame das proles que foram imunizadas, iniciou-se o protocolo de indução de inflamação alérgica pulmonar com *Endofit Ovalbumin* (5 mg/mL - InvivoGen, San Diego, CA, EUA). Foram realizadas 5 instilações via nasal com 20 µL de Endofit Ovalbumin nos dias 35, 42, 49, 50 e 51. E no dia 52 foram realizados os procedimentos de lavado bronco-alveolar e coleta do tecido pulmonar.

3.8 Avaliação do lavado bronco-alveolar (LBA)

Os animais submetidos ao protocolo de indução de inflamação alérgica pulmonar foram anestesiados com Tiopental sódico (1 g em 30 mL) via intraperitoneal (ip) e após exsanguinação pela aorta abdominal, o LBA foi obtido com a lavagem dos pulmões utilizando 1,5 mL de salina por três vezes através de uma cânula adaptada à traqueia do animal. Foi realizado um *pool* das amostras de LBA por prole de cada mãe submetida ao protocolo devido ao baixo rendimento celular (de 4 a 6 animais por *pool*). O *pool* de LBA foi centrifugado a 200 x g por 10 minutos e o botão de células foi ressuscitado em 1 mL de PBS. As células totais foram contadas em câmara de Neubauer para posterior marcação para avaliação por citometria de fluxo. Foram avaliados ao menos três *pools* por grupo experimental.

3.9 Obtenção de células pulmonares após dissociação do tecido

Após a coleta do LBA, os pulmões foram coletados cirurgicamente de forma asséptica e depositados individualmente em tubos cônicos contendo 1 mL de meio de cultura RPMI 16410 (Sigma). A este tecido foi adicionado 2 mg/mL de Colagenase IV (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA) e 1 mg/mL de DNase I (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA) e os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Após esse período, os pulmões foram dissociados em peneiras para cultura celular (Cell Strainer – BD Biosciences, MA, EUA) e a suspensão celular foi lavada por centrifugação durante 10 minutos a 200 x g em meio de cultura RPMI por três vezes e por uma vez em PBS. Posteriormente, as células foram ressuscitadas em 1 mL de PBS para posterior marcação e avaliação por citometria de fluxo.

3.10 Purificação de linfócitos T $\gamma\delta$ à partir de timócitos totais

Foi realizado *pool* de timos provenientes de cinco animais aos 20 dias de idade de mães não imunizadas. As células foram processadas como descrito no item 3.4 e após a contagem de timócitos totais, foi utilizado o kit de isolamento de linfócitos T $\gamma\delta$ (TCR γ/δ^+ T Cell Isolation Kit, mouse – Miltenyi Biotec). Inicialmente, as células foram incubadas com *microbeads* conjugadas com anticorpos monoclonais anti-CD45R e anti-CD11b e, simultaneamente, com anticorpos monoclonais anti-TCR $\gamma\delta$ biotinizados. Após incubação de 15 minutos, as células foram lavadas, ressuscitadas com tampão (PBS, 0,5% BSA e 2mM EDTA) e submetidas a separação magnética em coluna LD (MACS Separator – Miltenyi Biotec). Nesta etapa todas as células CD45R⁺ e CD11b⁺ foram retidas na coluna gerando uma suspensão de linfócitos T (T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$) purificados. Esta fração de células foi utilizada para alguns experimentos de cultura. Após essa etapa, as células

foram lavadas e posteriormente incubadas por 15 minutos com *microbeads* conjugadas com anticorpos monoclonais anti-biotina. Após isso as células foram lavadas e ressuspensas novamente com o tampão já descrito, e submetidas a separação magnética em coluna LS onde foi gerada uma suspensão de linfócitos T $\alpha\beta$ purificados os quais foram descartados. Para obtenção de linfócitos T $\gamma\delta$ purificados a coluna foi removida do campo magnético e lavada com 3mL de tampão com a utilização de êmbolo. Esta última etapa de separação magnética foi repetida para aumento do grau de pureza dos linfócitos T $\gamma\delta$. As suspensões celulares utilizadas foram contadas e marcadas com *Live/Dead* (BD Biosciences) para confirmação de viabilidade e pureza por citometria de fluxo ou foram submetidas à experimentos descritos à seguir.

3.11 Purificação de anticorpos IgG

Fêmeas não prenhas submetidas ao protocolo de imunização com OVA foram sangradas 48 dias após a imunização (período que corresponde ao termo de fêmeas submetidas ao protocolo de imunização e de acasalamento). Os soros foram separados e armazenados em *pool* a -20°C . Como controle foi obtido soro de fêmeas WT não imunizadas e não prenhas com 8 a 10 semanas de idade.

A purificação de anticorpos IgG de *pool* de soros foi realizada segundo as especificações do Kit *Melon Gel IgG Spin Purification* (Pierce, IL, EUA). Resumidamente, 500 μL de gel de purificação foram colocados em uma coluna acoplada a um tubo cônico de 15 mL e centrifugado por 1 minuto a 2000 g. O sobrenadante foi desprezado e a centrifugação repetida com a adição de 2 mL do tampão de lavagem do kit. A amostra do *pool* de soros foi diluída e adicionada sobre o gel, homogeneizada por 5 minutos e após centrifugação, o sobrenadante (anticorpos IgG purificados) foi coletado e armazenado a -20°C para posterior utilização nos experimentos de cultura. A concentração de IgG foi determinada por ELISA.

3.12 ELISA para avaliação das subclasses de IgG totais e anti-OVA

Anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 totais e anti-OVA foram analisados por ELISA. Resumidamente, microplacas de 96 orifícios (Costar, Cambridge, MA, UK) foram sensibilizadas com 5 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpos anti-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 ou com OVA em tampão carbonato-bicarbonato (TCB) 0,1M (pH 9,5) e incubadas por 1 hora a 37°C e por 18 horas a 4°C . Após lavagens com solução de PBS, as microplacas foram bloqueadas com PBS contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA fração V) por 1 hora a 37°C . Em seguida, as microplacas foram lavadas e incubadas com diluições seriadas do *pool* de anticorpos IgG purificados ou com as respectivas curvas padrão por 2 horas a 37°C . Após esta etapa, foram lavadas novamente com PBS contendo 0,1% de Tween e incubadas com anticorpos biotinilados anti- γ 1, anti- γ 2a, anti- γ 2b ou

anti- $\gamma 3$ (PharMingen, San Diego, CA, EUA) e incubados por 1 hora a 37 °C. Em seguida, após uma série de lavagens, foi adicionado às placas o conjugado avidina-peroxidase (Sigma) e incubado por 45 minutos a 37 °C. Após esta etapa, a atividade enzimática foi detectada pela adição de 50 μ l de substrato TMB (Tetrametil-benzidina, Calbiochem, La Jolla, CA) por no máximo 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1M) e a leitura foi realizada a 450 nm em leitor de microplaca de ELISA (Molecular Devices, CA, EUA). Os valores de densidade ótica (DO) obtidos foram utilizados para interpolação com curva padrão de anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b ou IgG3 ou expressos como títulos de anticorpos anti-OVA (log da maior diluição considerada positiva).

3.13 Avaliação do efeito de anticorpos IgG purificados *in vivo* sobre timócitos e linfócitos periféricos das proles

Camundongos fêmeas WT com oito a 10 semanas de idade foram acasaladas por sete dias com machos WT. Foram realizados dois grupos com doses diferentes de anticorpos IgG purificados e tempos diferentes. O primeiro grupo consistiu em mães que receberam a dose de 100 μ g de anticorpos IgG purificados de soro de fêmeas imunizadas ou controle pela via intravenosa (plexo orbital) aos 10, 15 e 20 dias de gestação, totalizando a transferência de 300 μ g de cada IgG. Já o segundo grupo consistiu em mães que receberam a dose de 400 μ g de anticorpos IgG purificados de soro de fêmeas imunizadas ou controle também por via intravenosa (plexo orbital) aos 10, 13, 15 e 17 dias de gestação totalizando a transferência de 1.600 μ g de cada IgG. As proles derivadas de mães submetidas à transferência de 300 μ g ou de 1.600 μ g de IgG durante a gestação foram avaliadas no período neonatal (3 d.i.) através da coleta do baço e timo.

3.14 Avaliação *in vitro* do efeito de anticorpos IgG purificados sobre timócitos das proles

Os lóbulos tímicos obtidos de cada animal aos 3 ou 20 dias de idade, proveniente de mães não imunizadas foram processados conforme descrito nos itens 3.4 e 3.12. Após a obtenção da suspensão celular já contada foram adicionados 1×10^6 timócitos totais de cada animal, 1×10^5 linfócitos T (T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$, ou somente T $\gamma\delta$) purificados a partir de um *pool* (cada um contendo de quatro a seis timos) em placas de 96 orifícios contendo meio de cultura RPMI 1640 (Sigma) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB – HyClone III, Logan, EUA). As células foram cultivadas por 7 dias (168 horas) em estufa com temperatura mantida a 37 °C e contendo 5% de CO₂ na presença de 100 μ g/mL de anticorpos IgG purificados de fêmeas imunizadas ou não com OVA. À alguns orifícios da placa foi adicionado Brefeldina A nas últimas 24 horas para posterior

avaliação da produção intracelular de citocinas. Após o cultivo, as células foram submetidas ao protocolo de marcação e avaliação por citometria de fluxo.

3.15 Citometria de fluxo para avaliação de moléculas extracelulares

Solução de timócitos e esplenócitos na concentração de $0,5 \times 10^6$ foram transferidos para tubos de ensaio (5 mL), centrifugados e lavados em solução de PBS contendo 1% de SAB (PBS-SAB) a 4 °C por duas vezes. Após a última lavagem, foi adicionado sobre o botão de células 0,5 µg de anticorpo monoclonal anti-CD11b, anti-CD11c, anti-CD16/32, anti-CD19, anti-CD24, anti-CD25, anti-CD27, anti-CD28, anti-CD44, antiCD45R, anti-F4/80 e anti-TCRγδ conjugados com os fluorógenos PE (BD Biosciences), APC (BD Biosciences), BD Horizon-V450 (BD Biosciences), PE-Texas Red (BD Biosciences), PercP (BD Biosciences), PercP-Cy5 (BD Biosciences) ou FITC (BD Biosciences) ou com seus respectivos anticorpos isotípicos e incubados durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, cada suspensão celular foi lavada duas vezes com PBS a 4 °C. A compensação do aparelho foi realizada utilizando micro esferas adsorvidas com anticorpos *anti-rat/anti-hamster* (*CompBeads* - BD Biosciences) e os respectivos anticorpos conjugados a fluorógenos. A aquisição de 500.000 eventos por amostra foi realizada no quadrante de linfócitos (determinado pela relação tamanho/granulosidade).

Neste quadrante foram determinados quadrantes para avaliarmos as células que expressam os fenótipo TCRγδ+ (Linfócitos Tγδ) dentro do qual, foi avaliada a expressão das moléculas de membrana e/ou intracelulares. Também foram avaliados alguns estágios de maturação de linfócitos Tγδ (TCRγδ+CD25+CD24+, TCRγδ+CD25-CD24+ e TCRγδ+CD25-CD24-). A aquisição de dados foi realizada em citômetro LSRFortessa (BD Biosciences - EUA) e a análise foi realizada utilizando o software FlowJo 7.5.6 (FlowJo LLC - EUA).

3.16 Citometria de fluxo para avaliação de moléculas intracelulares

Para a determinação intracelular de citocinas, os timócitos e esplenócitos foram cultivados em placas de 48 ou 96 orifícios (Costar, Cambridge, MA, UK) na presença de Brefeldina A (10 µg/mL - Sigma) em meio de cultura RPMI contendo 10% de SFB e incubadas por 24 horas em estufa com temperatura mantida a 37 °C e contendo 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram lavadas com solução PBS e marcadas de acordo com os fenótipos descritos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e fixadas com PBS contendo 1% de Formol (Merck). Após mais uma lavagem, as células foram permeabilizadas com PBS contendo 0,05% de Saponina (Sigma) e o anticorpo monoclonal anti-IL-17 marcado com Bv605 (BD Biosciences) e incubadas por 30 minutos a 4 °C. As células foram lavadas e ressuspendidas em PBS. A aquisição de 500.000 eventos

por amostra no quadrante de linfócitos (tamanho/granulosidade) foi realizada em citômetro LSRFortessa (BD Biosciences - EUA) e a análise foi realizada utilizando o software FlowJo 7.5.6 (FlowJo LLC - EUA).

3.17 Conjugação do *pool* de anticorpos IgG purificados ao fluoróforo Cy3

Anticorpos IgG purificados à partir do *pool* de soros de fêmeas imunizadas ou não com OVA foram conjugados com o corante Cy3 (*Amersham Cy3 Mono-Reactive Dye* - GE Healthcare). Para o procedimento, 500 mg de cada IgG foi ressuspensionado em tampão de Carbonato-Bicarbonato de Sódio e após isso o volume foi adicionado para a conjugação à 500 mg de Cy3. A suspensão foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e, a cada 10 minutos, a suspensão foi homogeneizada através do vórtex. Após a conjugação, as alíquotas de IgG conjugadas ao Cy3 foram armazenadas à -80 °C no escuro.

3.18 Microscopia confocal para avaliação da reatividade e permeabilidade do *pool* de anticorpos IgG purificados sobre linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos das proles

Os linfócitos T $\gamma\delta$ purificados foram incubados com 4mg/mL de IgG-Cy3 ou apenas com Cy3 durante 2 horas em estufa à 37 °C. Após isso, as células foram lavadas e fixadas com Formol 1% por 30 minutos em TA. As células foram lavadas novamente e marcadas com o anticorpo anti-TCR $\gamma\delta$ (Bv421 – BD Biosciences) por uma hora em TA. Em seguida as células foram lavadas e ressuspensionadas em PBS para posterior centrifugação e fixação em lâminas tratadas com poli-L-lisina (Knittel). As lâminas foram vedadas com lamínulas e armazenadas em geladeira até o dia da análise que foi realizada no microscópio confocal de varredura à laser LSM 510 (META).

3.19 Análise estatística

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

3.20 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pela comissão de ética em pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP) com o protocolo de número 122/14, pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP com o número 014 (folha: 028; livro: 03) e pela comissão de pesquisa e ética no uso de animais do Instituto de Medicina Tropical da USP com o número CPE-IMT/000302A.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da frequência, estágios de maturação e expressão do marcador de superfície CD27 em linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos das proles.

Inicialmente, avaliamos o efeito da imunização materna com OVA sobre a frequência e maturação dos linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos nas proles. Nesta etapa inicial foram avaliados quatro grupos de animais, proles de mães não imunizadas, proles de mães que receberam apenas o adjuvante de imunização (Alum), proles de mães imunizadas com OVA e proles de mães imunizadas com a proteína heteróloga MOG 35-55.

A estratégia de *gates* utilizada para identificar os linfócitos T $\gamma\delta$ e seus estágios de maturação nas proles de cada grupo está ilustrada na figura 1A-D, respectivamente.

A imunização materna com OVA foi capaz de aumentar o percentual de linfócitos T $\gamma\delta$ no período neonatal (três dias de idade) das proles (Fig. 2A) em comparação aos grupos controle (proles de mães não imunizadas e proles de mães tratadas com Alum), e em relação ao grupo de proles de mães imunizadas com MOG. Passamos então à identificação das principais etapas de maturação de linfócitos T $\gamma\delta$ das proles no período neonatal, as quais são caracterizadas como imatura (TCR $\gamma\delta$ +CD25+CD24+), intermediária (TCR $\gamma\delta$ +CD25-CD24+) e madura (TCR $\gamma\delta$ +CD25-CD24-). Na figura 2B podemos observar que não houve diferença entre os grupos quanto a frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos em cada um dos estágios de maturação avaliados.

Avaliamos ainda o fenótipo dos linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos das proles no período neonatal e pudemos observar que a imunização materna com OVA foi capaz de aumentar a frequência de expressão do receptor CD27, cuja expressão está relacionada ao tipo de citocina secretada, nos linfócitos T $\gamma\delta$ maduros das proles em comparação a todos os outros grupos controle de proles (Fig. 2C).

Figura 1 - Estratégia de identificação dos diferentes estágios de maturação de linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos das proles. Dot plots ilustrativos da estratégia de gates utilizada para definição de linfócitos T $\gamma\delta$. Grupos de proles de mães não imunizada (A), imunizadas com Alum (B), OVA (C) ou MOG (D) foram sacrificados aos 3 d.i. e os timócitos T $\gamma\delta$ das proles foram avaliados quanto aos seus estágios de maturação (imaturo: CD25+CD24+, intermediário: CD25-CD24+ e maduro: CD25-CD24-) por citometria de fluxo.

Figura 2 - Avaliação do efeito da imunização materna com OVA sobre o percentual e estágios de maturação de linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos das proles. Grupos de proles de mães não imunizadas ou tratadas com Alum ou imunizadas com OVA ou MOG foram sacrificados aos 3 d.i. Os timócitos T $\gamma\delta$ das proles foram avaliados quanto ao percentual (A) e quanto ao percentual (B) e a expressão de CD27 (C) durante seus estágios de maturação por citometria de fluxo. * $p \leq 0,05$ em relação às proles dos grupos de mães não imunizadas, tratadas com Alum ou imunizadas com MOG.

4.2 Avaliação do efeito da imunização materna com OVA sobre a produção intracelular de IL-17 e sobre a expressão de CD28 por linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos e periféricos das proles.

Com base nos resultados iniciais, onde foi possível observar a ausência de efeito modulador nos grupos MOG, a partir desta etapa optamos por avaliar apenas o grupo OVA e mantivemos os grupos controle: proles de mães não imunizadas e proles de mães tratadas com Alum.

Devido ao aumento da frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ CD27⁺ observado em resposta a imunização materna, e ao fato dos linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 murinos não expressarem CD27, avaliamos se o aumento da expressão de CD27 se refletiria na redução da frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17. A avaliação da produção intracelular de IL-17 nos linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos das proles no período neonatal revelou que a imunização materna foi capaz de reduzir a frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 em comparação ao grupo controle, o que se manteve até os 20 dias de idade (Fig. 3A-B).

Avaliamos ainda se este efeito se reflete sobre os linfócitos T $\gamma\delta$ periféricos. A avaliação dos linfócitos esplênicos das proles no período neonatal e aos 20 dias de idade revelou que imunização materna não altera a frequência desta população no baço (Fig. 3C;E), porém foi capaz de reduzir a frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 (Fig. 3D;F), de forma similar ao observado no timo.

Com base nestes resultados, onde confirmamos a ausência de efeito modulador nos grupos Alum, a partir desta etapa optamos por avaliar apenas o grupo OVA e mantivemos como controle apenas o grupo de proles de mães não imunizadas.

A avaliação da expressão da molécula CD28 foi realizada devido a este receptor estar relacionado à sobrevivência de linfócitos T $\gamma\delta$, os resultados revelaram que a imunização materna com OVA foi capaz de aumentar a expressão de CD28 nos linfócitos T $\gamma\delta$ em estágios intermediário e maduro das proles (Fig. 4A).

Devido ao aumento da expressão de CD28 durante o processo de maturação de linfócitos T $\gamma\delta$ em decorrência da imunização materna, avaliamos ainda se a expressão desta molécula é necessária para a indução da regulação exercida sobre a maturação dos linfócitos T $\gamma\delta$ da prole.

Para tanto, animais CD28^{-/-} foram submetidos ao protocolo de imunização materna com OVA e as proles foram avaliadas no período neonatal nos mesmos parâmetros das proles WT. De forma similar aos animais WT, a imunização materna de animais CD28^{-/-} não influenciou na frequência e estágios de maturação dos linfócitos T $\gamma\delta$ das proles em comparação ao grupo controle (Fig. 4B;C).

Quanto à expressão da molécula CD27, foi possível observar que a ausência da expressão do receptor coestimulador CD28 nas proles permitiu o aumento da frequência de CD27 em linfócitos T $\gamma\delta$ da prole desde o estágio inicial de maturação em comparação ao grupo controle (Fig. 4D).

Figura 3 - Avaliação do efeito da imunização materna com OVA sobre o percentual e produção de IL-17 por linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos e periféricos das proles. Grupos de proles de mães não imunizadas ou tratadas com Alum ou imunizadas com OVA foram sacrificados aos 3 d.i. e 20 d.i. Os linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos (A;B) foram avaliados quanto à produção intracelular de IL-17 e os linfócitos T $\gamma\delta$ periféricos foram avaliados quanto ao percentual (C;E) e produção de IL-17 (D;F) por citometria de fluxo. * $p \leq 0,05$ em relação às proles dos grupos de mães não imunizadas e tratadas com Alum.

Figura 4 - Avaliação do efeito da imunização materna com OVA sobre o fenótipo de linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos das proles de camundongos WT e CD28^{-/-}. Grupos de proles de mães imunizadas ou não com OVA foram sacrificados aos 3 d.i. Os timócitos T $\gamma\delta$ de camundongos WT foram avaliados quanto ao percentual de expressão de CD28 (A) durante os estágios de maturação. Os timócitos T $\gamma\delta$ de camundongos CD28^{-/-} foram avaliados quanto ao percentual (B), percentual durante os estágios de maturação (C) e expressão de CD27 durante os estágios de maturação (D) por citometria de fluxo. *p ≤ 0,05 em relação às proles de mães não imunizadas.

4.3 Identificação e avaliação fenotípica linfócitos T $\gamma\delta$ infiltrados no tecido pulmonar e presentes no LBA das proles.

Para avaliarmos se linfócitos T $\gamma\delta$ podem exercer alguma função durante a resposta inflamatória alérgica, grupos de proles de mães imunizadas ou não com OVA foram submetidos ao protocolo de imunização e indução de inflamação alérgica pulmonar com OVA como previamente descrito por nosso grupo.

A estratégia de *gates* utilizada na identificação dos linfócitos T $\gamma\delta$ em amostras de tecido pulmonar dissociado está ilustrada na figura 5A-D. A imunização materna com OVA foi capaz de reduzir a frequência de linfócitos T infiltrados no pulmão das proles em resposta à inflamação induzida com OVA (Fig. 6A). Devido aos linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 murinos serem identificados fenotipicamente como TCR $\gamma\delta$ +CD27-, avaliamos a frequência desta população e constatamos que a imunização materna induz uma redução da frequência da subpopulação T $\gamma\delta$ CD27- em comparação ao grupo controle (Fig. 6B). O lavado bronco-alveolar (LBA) foi avaliado em *pools* e a imunização materna não foi capaz de influir na frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ no LBA das proles (Fig. 6C), porém, o mesmo perfil de frequência do fenótipo CD27- foi observado em linfócitos T $\gamma\delta$ no LBA (Fig. 6D).

Figura 5 - Identificação de linfócitos $T\gamma\delta$ infiltrados no tecido pulmonar da prole. *Dot plots* ilustrativos da estratégia de *gates* utilizada para identificação e fenotipagem de linfócitos $T\gamma\delta$ infiltrados no tecido pulmonar (A-D) da prole. Grupos de proles de mães imunizadas ou não com OVA foram imunizados com OVA e submetidos ao protocolo de inflamação pulmonar com OVA Endofit (5 mg/mL) e sacrificados aos 52 d.i. Os pulmões foram lavados com solução salina para realização do *pool* de LBA de cada prole e posteriormente foram dissociados com 2 mg/mL de Colagenase IV e 1 mg/mL de DNase I para avaliação individual por citometria de fluxo.

Figura 6 - Avaliação fenotípica de linfócitos $T\gamma\delta$ infiltrados no tecido pulmonar e no LBA das proles. Grupos de proles de mães imunizadas ou não com OVA foram imunizados com OVA e submetidos ao protocolo de inflamação pulmonar com OVA Endofit (5 mg/mL) e sacrificados aos 52 d.i. Os pulmões foram dissociados com 2 mg/mL de Colagenase IV e 1 mg/mL de DNase I e avaliados individualmente (A;B), previamente esses pulmões foram lavados com solução salina e foram feitos *pool* de LBA de cada prole (C;D). Os linfócitos $T\gamma\delta$ infiltrados ou presentes no LBA foram avaliados quanto ao percentual e expressão de CD27 por citometria de fluxo. * $p \leq 0,05$ em relação às proles de mães não imunizadas.

4.4 Avaliação do efeito da transferência passiva de anticorpos IgG purificados sobre linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos e periféricos das proles.

Passamos a avaliar se a transferência passiva de anticorpos IgG purificados de fêmeas imunizadas ou não com OVA poderia induzir as alterações observadas sobre os linfócitos T $\gamma\delta$ da prole como observado em decorrência da imunização materna.

Primeiramente produzimos e avaliamos o *pool* de anticorpos IgG purificados de fêmeas imunizadas ou não com OVA quanto às subclasses de anticorpos IgG. O *pool* proveniente de fêmeas imunizadas com OVA ou de fêmeas não imunizadas apresentam níveis similares de anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 totais (Fig. 7A) porém, como esperado, o *pool* de fêmeas imunizadas apresenta um aumento da frequência de anticorpos IgG específicos a OVA em todas as subclasses avaliadas (Fig. 7B).

Posteriormente, grupos de mães foram tratadas passivamente com anticorpos IgG purificados de fêmeas imunizadas ou não com OVA durante a gestação totalizando 300 μ g ou 1.600 μ g de IgG de cada *pool*. As proles derivadas dessas mães foram avaliadas no período neonatal em parâmetros semelhantes aos analisados anteriormente.

De forma semelhante ao observado nas proles de mães imunizadas com OVA, as proles derivadas de mães tratadas com anticorpos IgG de fêmeas imunizadas com OVA não sofreram alteração na frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ em ambas as doses utilizadas. (Fig. 7C-G). Por outro lado, as proles de mães tratadas com anticorpos IgG de fêmeas imunizadas, em ambas as doses, mostraram uma maior expressão de CD27 no estágio maduro dos linfócitos T $\gamma\delta$ (Fig. 7D;H) e uma redução da produção de IL-17 por linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos (Fig. 7E-F) e esplênicos (Fig. 7I-J) em comparação as proles derivadas de mães tratadas com anticorpos IgG de fêmeas não imunizadas, características semelhantes as observadas em decorrência da imunização materna com OVA.

Figura 7 - Avaliação do efeito do efeito *in vivo* dos anticorpos IgG purificados sobre os linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos das proles de camundongos WT. Anticorpos IgG purificados derivados de *pool* de fêmeas imunizadas ou não com OVA foram avaliados quanto às subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (A-B). Grupos de proles de mães tratadas com 300 ou 1.600 μ g de IgG de fêmeas imunizadas ou não com OVA foram sacrificados aos 3 d.i. Os timócitos foram avaliados quanto ao percentual (C;G), expressão de CD27 durante os estágios de maturação (D;H) e produção intracelular de IL-17 no timo (E;I) e no baço (F;J) por citometria de fluxo. * $p \leq 0,05$ em relação às proles de mães tratadas com IgG de fêmeas não imunizadas .

4.5 Avaliação *in vitro* do efeito de anticorpos IgG purificados sobre a maturação e fenótipo de linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos das proles.

Para elucidarmos o mecanismo envolvido na modulação mediada por anticorpos IgG *in vivo*, passamos a investigar o potencial modulador de anticorpos IgG purificados *in vitro*.

Para tanto, os timócitos totais das proles aos três dias de idade derivadas de mães não imunizadas, foram cultivados com anticorpos IgG purificados de fêmeas imunizadas ou não com OVA. Nesta condição, os linfócitos T $\gamma\delta$ das proles não mostraram alterações quanto a sua frequência total e de estágios de maturação em resposta ao cultivo com anticorpos IgG purificados de fêmeas imunizadas ou não (Fig. 8A;B). A avaliação da expressão de CD27 revelou um aumento da expressão desta molécula em resposta ao cultivo com anticorpos IgG purificados de fêmeas imunizadas em todos os estágios de maturação avaliados (Fig. 8C).

Posteriormente avaliamos os mesmos parâmetros após o cultivo de linfócitos T purificados (linfócitos T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$) ou somente linfócitos T $\gamma\delta$ purificados com anticorpos IgG purificados. Em ambas as condições de cultivo não foi observado nenhum efeito dos anticorpos IgG purificados (Fig. 8D-F e H-J).

Adicionalmente, avaliamos ainda a produção intracelular de IL-17 nas condições de cultura com linfócitos T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$ ou linfócitos T $\gamma\delta$ purificados onde também não foi observado efeito dos anticorpos IgG (Fig. 8G e K).

Figura 8 - Avaliação do efeito *in vitro* dos anticorpos IgG purificados sobre os linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos das proles de camundongos WT. Grupos de proles de mães não imunizadas foram sacrificados aos 3 d.i. (A-C) e 20 d.i. (D-K). Os timócitos foram cultivados com 100 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpos IgG purificados de fêmeas imunizadas ou não com OVA por 7 dias e os linfócitos T $\gamma\delta$ foram avaliados quanto ao percentual (A;D;H), percentual (B;E;I) e expressão de CD27 (C;F;J) durante os estágios de maturação. Os timócitos foram cultivados nas últimas 24 horas com brefeldina A e avaliados quanto à produção intracelular de IL-17 (G;K) por citometria de fluxo. * $p \leq 0,05$ em relação ao cultivo com IgG de fêmeas não imunizadas.

4.6 Avaliação da expressão de receptores de anticorpos IgG nas células do timo e da reatividade e permeabilidade de anticorpos IgG purificados sobre linfócitos T γ δ das proles.

Em continuidade a elucidação do mecanismo, passamos a investigar quais populações celulares capazes de expressar receptores para anticorpos IgG poderiam ser encontradas no timo das proles no período neonatal, bem como sua frequência e intensidade de expressão.

Corroborando com dados da literatura, não foi possível identificar a expressão de receptores para anticorpos IgG na superfície dos linfócitos T α β e T γ δ (dados não demonstrados). Por outro lado, foi possível identificar três principais populações celulares de importância imunológica capazes de expressar Fc γ Rs (CD16 e/ou CD32): células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. A imunização materna não foi capaz de influir na frequência de células dendríticas e macrófagos, bem como na respectiva frequência e intensidade de Fc γ Rs nestas populações em comparação ao grupo controle (Fig. 9A-F).

Por outro lado, a imunização materna induziu um aumento da frequência de linfócitos B no timo das proles (Fig. 9G) e estes linfócitos expressam os receptores Fc γ RIIb (único receptor de IgG expresso nesta população) em frequência similar, porém em maior intensidade quando comparados aos animais do grupo controle (Fig. 9H-I).

Adicionalmente, avaliamos ainda se o *pool* de anticorpos IgG de ambas as procedências poderiam interagir com os linfócitos T γ δ de proles de mães não imunizadas mesmo na ausência da expressão de Fc γ Rs. Para tanto os anticorpos IgG purificados de fêmeas imunizadas (IgG IM) ou não (IgG NO) com OVA foram conjugados ao fluoróforo Cy3 e após incubação com linfócitos T γ δ purificados foi possível observar que ambos os *pools* de anticorpos IgG são capazes de interagir diretamente com a membrana de linfócitos T γ δ (Fig. 10). Não foi observada reatividade inespecífica do fluoróforo utilizado e não foram observadas interações intracelulares.

Figura 9 - Avaliação da expressão dos receptores FcγRs (CD16/CD32) em células do timo das proles. Grupos de proles de mães imunizadas ou não com OVA foram sacrificados aos 3 d.i. As células dendríticas, macrófagos e linfócitos B derivados do timo foram avaliados quanto ao percentual (A;D;G), percentual de expressão de FcγRs (B;E;H) e quanto à intensidade de fluorescência média de expressão de receptores de FcγRs (C;F;I) por citometria de fluxo. * $p \leq 0,05$ em relação às proles de mães não imunizadas.

Figura 10 - Avaliação da reatividade e permeabilidade de anticorpos IgG purificados sobre linfócitos T $\gamma\delta$ purificados das proles. Grupos de proles de mães não imunizadas foram sacrificados aos 20 d.i. Os timócitos foram processados e os linfócitos T $\gamma\delta$ foram purificados. Os linfócitos T $\gamma\delta$ foram incubados com anticorpos IgG de fêmeas não imunizadas, anticorpos IgG de fêmeas de mães imunizadas com OVA ou conjugados apenas ao fluoróforo Cy3 como controle e a análise foi realizada através de microscopia confocal.

5 DISCUSSÃO

A imunização materna com OVA induziu um aumento no percentual de linfócitos T $\gamma\delta$ maturados nos timos das proles no período neonatal, bem como um aumento da frequência de expressão do receptor CD27 de forma antígeno específica e independente do adjuvante utilizado.

A expressão do CD27 em linfócitos T $\gamma\delta$ murinos é determinante na produção de IFN- γ ou IL-17 por estas células (Ribot *et al.*, 2009), sendo os linfócitos T $\gamma\delta$ CD27- (que não expressam CD27) murinos produtores exclusivos de IL-17. O aumento da expressão do CD27 em resposta a imunização materna sugeriu, portanto, uma regulação negativa sobre a produção de IL-17 por estes linfócitos o que foi confirmado no timo, na periferia (baço) e no sítio de inflamação alérgica das proles (epitélio e lavado pulmonar).

A expressão da molécula co-estimuladora CD28 em linfócitos T $\gamma\delta$ colabora com sua sobrevivência durante o processo de maturação em humanos e camundongos (RIBOT *et al.*, 2012), porém já foi observado que sua expressão não é responsável pela diferenciação de linfócitos T $\gamma\delta$ quanto a produção de IFN- γ ou IL-17 (LAIRD *et al.*, 2013). Devido a evidência de que a imunização materna induziu um aumento da frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos das proles e que estes expressam o CD28 em maior frequência, decidimos avaliar se a expressão desta molécula poderia influir no mecanismo estudado.

A imunização de animais CD28^{-/-} em protocolo similar ao adotado com animais WT revelou que a expressão do CD28 pode exercer papel importante no aumento da frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos nas proles já que esta não ocorreu nas proles CD28^{-/-} de mães imunizadas. Porém, foi possível observar que, mesmo na ausência de CD28, a imunização materna é capaz de induzir efeito regulador na prole com o aumento da expressão do CD27 nos linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos da prole. Isto sugere ainda que a regulação induzida pela imunização materna pode ser exercida por interações independentes de contato célula a célula que envolva a ativação de moléculas co-estimuladoras como o CD28.

Já foi descrito por diversos grupos que os linfócitos T $\gamma\delta$ são capazes de regular o infiltrado eosinofílico na inflamação alérgica bem como a produção de IgE (DE OLIVEIRA HENRIQUES; PENIDO, 2012; HUANG *et al.*, 2013). A participação de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 também foi apontada há anos na indução da inflamação alérgica pulmonar (JAFFAR *et al.*, 2011), da dermatite murina (GRAY *et al.*, 2013) e recentemente foi ainda evidenciado que os linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 são cruciais para a indução de inflamação alérgica em modelo murino de alergia (ULLAH *et al.*, 2015). Isto mostra que a redução da maturação de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 observada em nosso modelo, em decorrência da imunização materna, é compatível com a

inibição do desenvolvimento de uma resposta alérgica como demonstrado em nosso modelo experimental (DE LIMA LIRA et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2017).

Os receptores TCR $\gamma\delta$ já foram considerados órfãos de ligantes por décadas, a alguns anos, alguns autores deram início a discussão sobre possíveis ligantes de receptores TCR $\gamma\delta$ bem como a possível participação de sua ativação no processo de maturação desta população (KRESLAVSKY; VON BOEHMER, 2010). No mesmo ano foi demonstrado que a sinalização via TCR $\gamma\delta$ poderia, de fato, participar do processo de maturação dos linfócitos T $\gamma\delta$ influenciando em seu potencial de migração (JIN et al., 2010). Neste ínterim, outras evidências foram obtidas até recentemente quando foi demonstrado que a sinalização via TCR em linfócitos T $\gamma\delta$ é capaz de influir especificamente na indução de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 e IFN- γ (MUÑOZ-RUIZ et al., 2016).

Nosso grupo vem sugerindo há anos que o principal fator mediador da inibição da alergia nas proles mediada pela imunização materna podem ser os anticorpos IgG maternos (VICTOR et al., 2003; VICTOR et al., 2010). Há alguns anos sugerimos, ainda de forma hipotética, que esta influência poderia ocorrer ainda durante o processo de maturação dos timócitos (VICTOR, 2014) e que os anticorpos maternos produzidos em resposta a imunização com alérgenos podem atingir órgão linfoides primários das proles exercendo papel fulcral na regulação da maturação de linfócitos (VICTOR, 2016) o que foi recentemente evidenciado *in vitro* com o uso de timócitos humanos (SGNOTTO et al., 2017).

Isto nos levou a realizar avaliações *in vivo* e *in vitro* sobre o efeito dos anticorpos IgG purificados afim de elucidar o fenômeno regulador observado sobre os linfócitos T $\gamma\delta$ das proles. Corroborando com nossa hipótese, a transferência passiva de anticorpos IgG purificados de fêmeas imunizadas conseguiu induzir um aumento *in vivo* na expressão de CD27 em linfócitos T $\gamma\delta$ da prole em ambas as doses avaliadas e de forma semelhante ao observado em resposta a imunização materna, esta evidência é inédita na literatura onde nunca foi descrito o efeito regulador da transferência de anticorpos IgG sobre linfócitos T $\gamma\delta$ das proles.

Para elucidar estes resultados, passamos a avaliar este efeito *in vitro* onde observamos que os anticorpos IgG purificados de fêmeas imunizadas induzem um aumento da expressão de CD27 nos linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos em um intervalo de sete dias, porém apenas quando o cultivo foi realizado com timócitos totais, não ocorrendo nas condições de cultivo com linfócitos T totais (T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$) ou somente linfócitos T $\gamma\delta$ purificados. Resultados que sugeriram a modulação mediada por anticorpos IgG de forma dependente da colaboração de outras populações celulares presentes no timo.

Isso nos levou a investigar outras populações celulares presentes no timo das proles que expressam receptores para anticorpos IgG (Fc γ Rs: CD16 e CD32) e, portanto, possuem alto

potencial de colaboração mediante interações com anticorpos IgG. Observamos então que os linfócitos B intratímicos das proles de mães imunizadas apresentam um aumento em sua frequência, assim como na intensidade de expressão de FcγRs nas proles de mães imunizadas com OVA, o que não foi observado nos outros tipos celulares analisados, células dendríticas e macrófagos intratímicos.

Com isso, revelou-se a sugestão da possível colaboração dos linfócitos B sobre a regulação do processo de maturação intratímica de linfócitos Tγδ. A quase duas décadas, foi descrita a presença de linfócitos B progenitores no timo de camundongos (KAWAMOTO et al., 1998) e que estes linfócitos emigram do timo e expressam o fenótipo B maduro (AKASHI et al., 2000), porém a função dos linfócitos B intratímicos ainda não é bem compreendida. Foi demonstrada a participação dos linfócitos B intratímicos no processo de seleção negativa de linfócitos Tαβ (FROMMER; WAISMAN, 2010), porém, não há evidências de seu papel sobre a maturação de linfócitos Tγδ.

É interessante notar que a indução do aumento da expressão de receptores para anticorpos IgG em linfócitos B, FcγRIIb (única isoforma de FcγRs expressa em linfócitos B), já foi descrita em linfócitos B periféricos de proles em decorrência da imunização materna com OVA (DE LIMA LIRA et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2017; VICTOR et al., 2010), porém sua evidência intratímica é inédita.

Por fim, foi ainda realizada uma abordagem ilustrativa sobre a interação direta de anticorpos IgG com linfócitos Tγδ onde foi possível observar que os anticorpos IgG são capazes de interagir diretamente com a membrana de linfócitos Tγδ, o que não ocorre via receptores de anticorpos IgG já que esta população celular não os expressa, e portanto está sujeita a influência do idiótipo (especificidade) destes anticorpos embora tenha sido evidenciada em ambos os *pools* testados.

Para elucidarmos o mecanismo observado em sua totalidade, mais experimentos ainda precisam ser realizados, até o momento nossos resultados sugerem que os anticorpos IgG maternos são capazes de induzir a regulação da maturação de linfócitos Tγδ produtores de IL-17 nas proles. Além disso, sugerem que este mecanismo envolve interações diretas dos anticorpos IgG com os linfócitos Tγδ e a colaboração de populações celulares intratímicas que expressam receptores para anticorpos IgG, especialmente os linfócitos B.

Este tipo de abordagem onde há relação da produção e/ou presença de anticorpos IgG com a maturação de linfócitos é escassa na literatura, em humanos, foi descrita uma correlação positiva entre a produção de anticorpos IgG anti-urease de *Helicobacter pylori* e a quantidade de linfócitos Tγδ de pacientes com gastrite (FUTAGAMI et al., 2006) e, em modelo murino de atrite induzida com colágeno, foi demonstrada a correlação entre a menor frequência de linfócitos Tγδ produtores de IL-17 e a menor produção de anticorpos IgG totais e IgG2a antígeno específicos, o que foi capaz

de diminuir a intensidade da inflamação neste modelo (ROARK et al., 2007). Estes dados corroboram com nossa hipótese porém em nenhuma das abordagens foi investigado o mecanismo envolvido.

Por fim vale apontar que nosso grupo realizou uma abordagem translacional no contexto deste projeto utilizando timócitos obtidos de crianças com até sete dias de idade os quais foram cultivados na mesma condição adotada para a avaliação *in vitro* no modelo experimental, porém utilizando anticorpos IgG purificados de indivíduos atópicos ou não atópicos. Estes resultados, ainda não divulgados, revelaram que anticorpos IgG de indivíduos atópicos induzem um aumento da expressão de CD27 em linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos humanos, o que foi acompanhado pelo aumento da frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17. Em humanos, diferente do observado em camundongos, os linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 podem expressar CD27, enquanto aqueles produtores de IFN- γ não expressam (CACCAMO et al., 2011). Isto sugere similaridade entre um mecanismo observado no modelo experimental e um possível mecanismo regulador em humanos onde o timo de uma criança gestada por uma mãe atópica poderia sofrer influência de anticorpos IgG maternos favorecendo a maturação de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17, mas todas essas evidências ainda não são conclusivas.

Em conjunto, os achados resultantes desta dissertação sugerem que durante a gestação os anticorpos IgG maternos transferidos passivamente ao feto podem modular a produção de IL-17 por linfócitos T $\gamma\delta$ durante o processo de maturação intratímico. Este mecanismo parece ser exercido por anticorpos IgG maternos que interagem diretamente com os linfócitos T $\gamma\delta$ intratímicos, mas parecem depender da colaboração de linfócitos B e do estado imune materno. Em conjunto estes eventos conduzem o sistema imune da prole a regulação negativa de uma população celular que colabora com a inflamação alérgica.

6 CONCLUSÃO

A imunização materna inibe a maturação tímica de linfócitos $T\gamma\delta$ produtores de IL-17 nas proles por um mecanismo mediado por anticorpos IgG maternos e que sugere envolver a colaboração de linfócitos B intratímicos.

REFERÊNCIAS*

ADKINS, B.; LECLERC, C.; MARSHALL-CLARKE, S. Neonatal adaptive immunity comes of age. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, p. 553-564, Jul 2004. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15229474> >.

BEAGLEY, K. W.; GOCKEL, C. M. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 38, n. 1, p. 13-22, Aug 2003. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12900050> >.

BOGEN, B.; DEMBIC, Z.; WEISS, S. Clonal deletion of specific thymocytes by an immunoglobulin idiotype. **EMBO J**, v. 12, n. 1, p. 357-363, Jan 1993. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8428591> >.

BORGHESI, C.; NICOLETTI, C. Autologous anti-idiotypic antibody response is regulated by the level of circulating complementary idiotype. **Immunology**, v. 89, n. 2, p. 172-177, Oct 1996. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8943710> >.

BOT, A. et al. Induction of antibody response by DNA immunization of newborn baboons against influenza virus. **Viral Immunol**, v. 12, n. 2, p. 91-106, May 1999. ISSN 0882-8245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10413355> >.

BOYCE, J. A. The biology of the mast cell. **Allergy Asthma Proc**, v. 25, n. 1, p. 27-30, 2004 Jan-Feb 2004. ISSN 1088-5412. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15055558> >.

BRAUN-FAHRLÄNDER, C. et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. **N Engl J Med**, v. 347, n. 12, p. 869-877, Sep 2002. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12239255> >.

BUSINCO, L. et al. Predictive value of cord blood IgE levels in 'at-risk' newborn babies and influence of type of feeding. **Clin Allergy**, v. 13, n. 6, p. 503-508, Nov 1983. ISSN 0009-9090. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6685583> >.

CACCAMO, N. et al. Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human V γ 9V δ 2 T cells. **Blood**, v. 118, n. 1, p. 129-138, Jul 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21505189> >.

CHAOUAT, G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? **Semin Immunopathol**, v. 29, n. 2, p. 95-113, Jun 2007. ISSN 1863-2297. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17626305> >.

DE LIMA LIRA, A. A. et al. Maternal immunization with ovalbumin or Dermatophagoides pteronyssinus has opposing effects on Fc gamma RIIb expression on offspring B cells. **Allergy Asthma and Clinical Immunology**, v. 10, SEP 2 2014 2014. ISSN 1710-1484;1710-1492.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**. informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DE OLIVEIRA HENRIQUES, M. D.; PENIDO, C. $\gamma\delta$ T Lymphocytes Coordinate Eosinophil Influx during Allergic Responses. **Front Pharmacol**, v. 3, p. 200, 2012. ISSN 1663-9812. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23316161> >.

DE OLIVEIRA, M. G. et al. Preconception allergen sensitization can induce B10 cells in offspring: a potential main role for maternal IgG. **Allergy Asthma Clin Immunol**, v. 13, p. 22, 2017. ISSN 1710-1484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28428801> >.

DEALTRY, G. B.; O'FARRELL, M. K.; FERNANDEZ, N. The Th2 cytokine environment of the placenta. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 123, n. 2, p. 107-119, Oct 2000. ISSN 1018-2438. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11060482> >.

DEL PRETE, G.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S. Human Th1 and Th2 cells: functional properties, mechanisms of regulation, and role in disease. **Lab Invest**, v. 70, n. 3, p. 299-306, Mar 1994. ISSN 0023-6837. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8145524> >.

FINK, K. et al. Long-term maternal imprinting of the specific B cell repertoire by maternal antibodies. **Eur J Immunol**, v. 38, n. 1, p. 90-101, Jan 2008. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18081043> >.

FUSARO, A. et al. Influence of maternal murine immunization with Dermatophagoides pteronyssinus extract on the type I hypersensitivity response in offspring. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 127, n. 3, p. 208-216, MAR 2002 2002.

FUSARO, A. E. et al. 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, SEP 2007 2007.

FUSARO, A. E. et al. 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, n. 1, p. e541-e550, SEP 2009 2009.

FUTAGAMI, S. et al. gammadelta T cells increase with gastric mucosal interleukin (IL)-7, IL-1beta, and Helicobacter pylori urease specific immunoglobulin levels via CCR2 upregulation in Helicobacter pylori gastritis. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 21, n. 1 Pt 1, p. 32-40, Jan 2006. ISSN 0815-9319. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16706809> >.

GHOSH, S. K.; CHAKRABARTI, D. Immunoregulation by processed immunoglobulin on B-cells. **Indian J Biochem Biophys**, v. 30, n. 6, p. 414-421, Dec 1993. ISSN 0301-1208. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7911781> >.

GRAY, E. E. et al. Deficiency in IL-17-committed V γ 4(+) $\gamma\delta$ T cells in a spontaneous Sox13-mutant CD45.1(+) congenic mouse substrain provides protection from dermatitis. **Nat Immunol**, v. 14, n. 6, p. 584-592, Jun 2013. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23624556> >.

HAPPEL, K. I. et al. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to Klebsiella pneumoniae infection. **J Immunol**, v. 170, n. 9, p. 4432-4436, May 2003. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12707317> >.

HOWIE, P. W. et al. Protective effect of breast feeding against infection. **BMJ**, v. 300, n. 6716, p. 11-6, Jan 1990. ISSN 0959-8138. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2105113> >.

HUANG, Y. et al. Antigen-specific regulation of IgE antibodies by non-antigen-specific $\gamma\delta$ T cells. **J Immunol**, v. 190, n. 3, p. 913-921, Feb 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23275606> >.

JAFFAR, Z. et al. Prostaglandin I_2 promotes the development of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells that associate with the epithelium during allergic lung inflammation. **J Immunol**, v. 187, n. 10, p. 5380-5391, Nov 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976777> >.

JARRETT, E. E.; HALL, E. IgE suppression by maternal IgG. **Immunology**, v. 48, n. 1, p. 49-58, Jan 1983. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6848454> >.

JENMALM, M. C.; BJÖRKSTÉN, B. Cord blood levels of immunoglobulin G subclass antibodies to food and inhalant allergens in relation to maternal atopy and the development of atopic disease during the first 8 years of life. **Clin Exp Allergy**, v. 30, n. 1, p. 34-40, Jan 2000. ISSN 0954-7894. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10606928> >.

JERNE, N. K. Idiotypic networks and other preconceived ideas. **Immunol Rev**, v. 79, p. 5-24, Jun 1984. ISSN 0105-2896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6378763> >.

JIN, Y. et al. Cutting edge: Intrinsic programming of thymic $\gamma\delta$ T cells for specific peripheral tissue localization. **J Immunol**, v. 185, n. 12, p. 7156-7160, Dec 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21068400> >.

JONES, E. A.; WALDMANN, T. A. The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat. **J Clin Invest**, v. 51, n. 11, p. 2916-2927, Nov 1972. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5080417> >.

KIM, J. H. et al. Maternal cytokine production during pregnancy and the development of childhood wheezing and allergic disease in offspring three years of age. **J Asthma**, v. 45, n. 10, p. 948-952, Dec 2008. ISSN 1532-4303. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19085588> >.

KRESLAVSKY, T.; VON BOEHMER, H. gammadeltaTCR ligands and lineage commitment. **Semin Immunol**, v. 22, n. 4, p. 214-221, Aug 2010. ISSN 1096-3618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20447836> >.

LAGGNER, U. et al. Identification of a novel proinflammatory human skin-homing V γ 9V δ 2 T cell subset with a potential role in psoriasis. **J Immunol**, v. 187, n. 5, p. 2783-2793, Sep 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21813772> >.

LAIRD, R. M. et al. $\gamma\delta$ T cells acquire effector fates in the thymus and differentiate into cytokine-producing effectors in a *Listeria* model of infection independently of CD28 costimulation. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63178, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23671671> >.

MACCHIAVERNI, P. et al. Mother to child transfer of IgG and IgA antibodies against *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Scand J Immunol**, v. 74, n. 6, p. 619-627, Dec 2011. ISSN 1365-3083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21883350> >.

MARSHALL-CLARKE, S. et al. Neonatal immunity: how well has it grown up? **Immunol Today**, v. 21, n. 1, p. 35-41, Jan 2000. ISSN 0167-5699. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10637557> >.

MCKENZIE, A. N. et al. Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes. **J Immunol**, v. 150, n. 12, p. 5436-5444, Jun 1993. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8099936> >.

MUNIZ, B. P. et al. Tolerogenic microenvironment in neonatal period induced by maternal immunization with ovalbumin. **Immunobiology**, v. 219, n. 5, p. 377-384, MAY 2014 2014. ISSN 0171-2985.

MURPHY, S. P. et al. Interferon gamma in successful pregnancies. **Biol Reprod**, v. 80, n. 5, p. 848-859, May 2009. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164174> >.

MUÑOZ-RUIZ, M. et al. TCR signal strength controls thymic differentiation of discrete proinflammatory $\gamma\delta$ T cell subsets. **Nat Immunol**, Apr 2016. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27043412> >.

OSTOJIC, S. et al. Demonstration of the presence of IL-16, IL-17 and IL-18 at the murine fetomaternal interface during murine pregnancy. **Am J Reprod Immunol**, v. 49, n. 2, p. 101-112, Feb 2003. ISSN 1046-7408. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12765349> >.

PANG, D. J. et al. Understanding the complexity of $\gamma\delta$ T-cell subsets in mouse and human. **Immunology**, v. 136, n. 3, p. 283-290, Jul 2012. ISSN 1365-2567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22385416> >.

PEREIRA, C. et al. T cell receptor excision circles (TREC) and recent thymic migrant cells in specific immunotherapy and respiratory allergy to *Dermatophagoides pteronyssinus*. **Eur Ann Allergy Clin Immunol**, v. 44, n. 2, p. 61-72, Apr 2012. ISSN 1764-1489. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22768725> >.

PLATER-ZYBERK, C. et al. Combined blockade of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 17 pathways potently suppresses chronic destructive arthritis in a tumour necrosis factor alpha-independent mouse model. **Ann Rheum Dis**, v. 68, n. 5, p. 721-728, May 2009. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18495731> >.

RAMOND, C. et al. Two waves of distinct hematopoietic progenitor cells colonize the fetal thymus. **Nat Immunol**, v. 15, n. 1, p. 27-35, Jan 2014. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24317038> >.

RIBOT, J. C. et al. B7-CD28 costimulatory signals control the survival and proliferation of murine and human $\gamma\delta$ T cells via IL-2 production. **J Immunol**, v. 189, n. 3, p. 1202-1208, Aug 2012. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22732586> >.

RIBOT, J. C. CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. **Nat Immunol**, v. 10, n. 4, p. 427-436, Apr 2009. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270712> >.

ROARK, C. L. et al. Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma delta T cells. **J Immunol**, v. 179, n. 8, p. 5576-5583, Oct 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17911645> >.

ROMAGNANI, S. Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. **Curr Opin Immunol**, v. 6, n. 6, p. 838-846, Dec 1994. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7710707> >.

SCHULZ, S. M. et al. IL-17A is produced by Th17, gammadelta T cells and other CD4-lymphocytes during infection with Salmonella enterica serovar Enteritidis and has a mild effect in bacterial clearance. **Int Immunol**, v. 20, n. 9, p. 1129-1138, Sep 2008. ISSN 1460-2377. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599501> >.

SEEGER, M. et al. Antigen-independent suppression of the IgE immune response to bee venom phospholipase A2 by maternally derived monoclonal IgG antibodies. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 7, p. 2124-2130, Jul 1998. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9692881> >.

SIEGRIST, C. A. Neonatal and early life vaccinology. **Vaccine**, v. 19, n. 25-26, p. 3331-3346, May 2001. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11348697> >.

SIEGRIST, C. A. et al. Influence of maternal antibodies on vaccine responses: inhibition of antibody but not T cell responses allows successful early prime-boost strategies in mice. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 12, p. 4138-4148, Dec 1998. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9862350> >.

SIMISTER, N. E.; REES, A. R. Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. **Eur J Immunol**, v. 15, n. 7, p. 733-738, Jul 1985. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2988974> >.

SINKORA, M.; SINKOROVÁ, J.; HOLTMEIER, W. Development of gammadelta thymocyte subsets during prenatal and postnatal ontogeny. **Immunology**, v. 115, n. 4, p. 544-555, Aug 2005. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16011523> >.

STRACHAN, D. P.; SANDERS, C. H. Damp housing and childhood asthma; respiratory effects of indoor air temperature and relative humidity. **J Epidemiol Community Health**, v. 43, n. 1, p. 7-14, Mar 1989. ISSN 0143-005X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2592894> >.

SUTTON, C. et al. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. **J Exp Med**, v. 203, n. 7, p. 1685-1691, Jul 2006. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16818675> >.

ULLAH, M. A. et al. Allergen-induced IL-6 trans-signaling activates $\gamma\delta$ T cells to promote type 2 and type 17 airway inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 136, n. 4, p. 1065-1073, Oct 2015. ISSN 1097-6825. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25930193> >.

VAKIL, M. et al. 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, Sep 1986. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2428628> >.

VANCE, G. H. et al. Serum ovalbumin-specific immunoglobulin G responses during pregnancy reflect maternal intake of dietary egg and relate to the development of allergy in early infancy. **Clin Exp Allergy**, v. 34, n. 12, p. 1855-1861, Dec 2004. ISSN 0954-7894. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15663559> >.

VICTOR, J. et al. Preconception maternal immunization to dust mite inhibits the type I hypersensitivity response of offspring. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2, p. 269-277, FEB 2003 2003.

VICTOR, J. R. Influence of Maternal Immunization with Allergens on the Thymic Maturation of Lymphocytes with Regulatory Potential in Children: A Broad Field for Further Exploration. **Journal of Immunology Research**, 2014 2014. ISSN 1740-2522;1740-2530.

VICTOR, J. R. Allergen-specific IgG as a mediator of allergy inhibition: lessons from mother to child. **Hum Vaccin Immunother**, p. 0, Nov 2016. ISSN 2164-554X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27808600> >.

VICTOR, J. R. et al. Maternal immunization with ovalbumin prevents neonatal allergy development and up-regulates inhibitory receptor Fc gamma RIIB expression on B cells. **Bmc Immunology**, v. 11, MAR 11 2010 2010.

WARNER, J. A.; WARNER, J. O. Early life events in allergic sensitisation. **Br Med Bull**, v. 56, n. 4, p. 883-893, 2000. ISSN 0007-1420. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359626> >.

WEGMANN, T. G. et al. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? **Immunol Today**, v. 14, n. 7, p. 353-356, Jul 1993. ISSN 0167-5699. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8363725> >.