SIMONE CORRÊA DA SILVA

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

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

ÁREA DE CONCENTREÇÃO: IMUNOLOGIA

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

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

**SÃO PAULO
2008**

RESUMO

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

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

SUMMARY

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1. Asma, alergia e padrões de reatividade imunológica

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 As células reguladoras e a tolerância

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

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

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

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

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

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

1.3 A tolerância e as mucosas

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

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

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

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

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

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

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

1.4 A tolerância e a gravidez

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5 O padrão imunológico do neonato

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6 CONCLUSÕES

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

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

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

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

7 PERSPECTIVAS

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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