

***CAMILA RENNÓ GUIMARÃES***

**Caracterização fenotípica da população de células  
T reguladoras em sangue de cordão umbilical de  
recém-nascidos a termo e pré-termo**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Pediatria

Orientadora: Dra. Patricia Palmeira

**São Paulo**

**2015**

***CAMILA RENNÓ GUIMARÃES***

**Caracterização fenotípica da população de células  
T reguladoras em sangue de cordão umbilical de  
recém-nascidos a termo e pré-termo**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Pediatria

Orientadora: Dra. Patricia Palmeira

**São Paulo**

**2015**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Guimarães, Camila Rennó

Caracterização fenotípica da população de células T reguladoras em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos a termo e pré-termo / Camila Rennó Guimarães. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Pediatria.

Orientadora: Patricia Palmeira.

Descritores: 1.Linfócitos T reguladores 2.Antígeno CTLA-4 3.Integrina alfa4 4.Citometria de fluxo 5.Recém-nascido prematuro 6.Recém-nascido a termo

USP/FM/DBD-385/15

*Dedico esse trabalho aos meus pais, que nunca deixaram de incentivar, de apoiar e me levantar todas e inúmeras vezes. À eles, dedico meu crescimento pessoal e profissional todos esses anos.*

*Agradecimentos especiais à*

*Minha amiga e orientadora Patricia Palmeira Daenekas Jorge que me acolheu, ajudou e aconselhou a todo instante. Pelos momentos disponibilizados e pelo tempo dedicado a me ensinar a ser melhor.*

*À Camila Quinello, Ana Lúcia Lessa, Cláudia Zago, Maria Isabel Valdomir Nadaf que não se cansaram em me transmitir todo o ensinamento e todo o carinho que me farão levar por todos os meus novos caminhos.*

*À Letícia Zicari Boneder, pela alegria e companheirismo e que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.*

*À Equipe do Laboratório de Investigação Médica – 36 (LIM-36) que me ajudou em todos os momentos e com os quais pude contar em cada desafio.*

*Agradecimentos:*

*À Profa. Dra. Magda Carneiro-Sampaio por ter disponibilizado seu Laboratório permitindo, assim, a realização deste trabalho.*

*Às secretárias da Pós-Graduação do Departamento de Pediatria, por estarem sempre prontamente dispostas para auxiliar no que fosse preciso.*

*À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.*

*Aos membros da Banca examinadora do Exame de Qualificação: Dra. Maria Notomi Sato, Dra. Vera Lúcia Jornada Krebs, Dra. Maria Esther Jurfest Rivero Ceccon que aceitaram gentilmente meu convite e contribuíram de forma construtiva com sugestões para o melhor desenvolvimento do trabalho.*

*A todos os profissionais do Centro Obstétrico do Instituto Central do HC que sempre estiveram disponíveis, contribuindo com as coletas e me auxiliando quando fosse necessário, em especial à enfermeira Silvana.*

*E, finalmente, às mães que cederam gentilmente as amostras de sangue de cordão umbilical para que fosse possível a realização deste trabalho.*

## NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## SUMÁRIO

### LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

### LISTA DE TABELAS

### LISTA DE FIGURAS

### RESUMO

### SUMMARY

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1.	Justificativa	19
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
2.1.	Objetivo geral	23
2.2.	Objetivos específicos	23
<b>3.</b>	<b>CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
3.1.	Aspectos éticos	25
3.2.	Casuística	25
3.2.1.	Obtenção de amostras de sangue de cordão umbilical	25
3.2.2.	Obtenção de amostras de sangue periférico de adultos	27
3.3.	Delineamento metodológico	27
3.4.	Dosagem de citocinas nas amostras de soro de cordão umbilical	28
3.5.	Caracterização fenotípica dos linfócitos T reguladores	28
3.6.	Análise estatística	31
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
4.1.	Análise do grupo amostral	33
4.2.	Dosagem de citocinas nas amostras de soro de cordão umbilical	38
4.3.	Caracterização fenotípica das células T reguladoras nas amostras de sangue de cordão umbilical	42
4.4.	Expressão de CD45RA em células Treg neonatais	47
4.5.	Expressão de CTLA-4 em células Treg neonatais	48



4.6.	Expressão dos marcadores de <i>homing</i> $\alpha 4\beta 7$ e $\alpha 4\beta 1$ em células Treg neonatais	50
5.	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>53</b>
6.	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>66</b>
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>68</b>

#### **ANEXOS**

**Anexo I. Aprovação Cappesq**

**Anexo II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**Anexo III. Ficha de Anamnese**

**Anexo IV.**

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>APC</b>	<i>Antigen presenting cell</i> (Célula apresentadora de antígeno)
<b>ATP</b>	<i>Adenosine triphosphate</i> (Trifosfato de adenosina)
<b>cAMP</b>	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> (Monofosfato de adenosina cíclico)
<b>CBA</b>	<i>Cytometric bead array</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of Differentiation</i> (Grupamento de diferenciação)
<b>CD122</b>	Cadeia $\beta$ do receptor de IL-2
<b>CD127</b>	Cadeia $\alpha$ do receptor de IL-7
<b>CD25</b>	Cadeia $\alpha$ do receptor de IL-2
<b>CMV</b>	Citomegalovírus
<b>CTLA-4</b>	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i> (Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos)
<b>DC</b>	<i>Dendritic cell</i> (Célula Dendrítica)
<b>DUM</b>	Data da última menstruação
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
<b>Foxp3</b>	<i>Forkhead box P3</i>
<b>FSC-A</b>	<i>Forward-scatter</i> (tamanho)
<b>G1</b>	Grupo 1
<b>G2</b>	Grupo 2
<b>G3</b>	Grupo 3
<b>GBS</b>	<i>Group B Streptococcus</i> (Estreptococo do grupo B)
<b>HIV</b>	<i>Human immunodeficiency virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
<b>HMC</b>	Hemocultura
<b>HTLV I/II</b>	<i>Human T lymphotropic virus type 1/2</i> (Vírus linfotrópico da célula T humana do tipo 1/2)
<b>ICAM-1</b>	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i> (Molécula 1 de adesão intercelular)
<b>IDO</b>	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i> (Indoleamina 2,3-dioxigenase)
<b>IG</b>	Idade gestacional
<b>IL</b>	Interleucina

<b>IFN</b>	Interferon
<b>ITU</b>	Infecção do trato urinário
<b>LFA-1</b>	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i> (Antígeno 1 associado à função leucocitária)
<b>LPAM-1</b>	<i>Lymphocyte Peyer's patch adhesion molecule 1</i> (Molécula 1 de adesão linfocitária às Placas de Peyer)
<b>MAdCAM-1</b>	<i>Mucosal addressin cell adhesion molecule 1</i> (Molécula 1 de adesão celular de adressina de mucosa)
<b>MBL</b>	<i>Mannose-binding lectin</i> (Lectina ligante de manose)
<b>MFI</b>	<i>Mean fluorescence intensity</i> (Média de intensidade de fluorescência)
<b>N</b>	Número amostral
<b>ND</b>	Não detectado
<b>NFAT</b>	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i> (Fator nuclear de células T ativadas)
<b>NICHD</b>	<i>National Institute of Child Health and Human Development</i> (Instituto Nacional de Saúde Infantil e Desenvolvimento Humano)
<b>NR</b>	Não realizado
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Tampão fosfato-salina)
<b>PCR</b>	Proteína C-reativa
<b>PT</b>	Pré-termo
<b>pTreg</b>	Treg derivada na periferia
<b>RN</b>	Recém-nascido
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>sIL-6R</b>	Receptor solúvel de IL-6
<b>SSC-H</b>	<i>Side-scatter</i> (Granulosidade)
<b>sTNF RI</b>	Receptor solúvel I de TNF
<b>sTNF RII</b>	Receptor solúvel II de TNF
<b>T</b>	Termo
<b>TCR</b>	<i>T cell receptor</i> (Receptor de célula T)
<b>TFG-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i> (Fator $\beta$ de transformação de crescimento)

<b>TNF</b>	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral)
<b>Treg</b>	Célula T reguladora
<b>tTreg</b>	Treg derivada do timo
<b>VCAM-1</b>	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> (Molécula 1 de adesão às células vasculares)
<b>VLA-4</b>	<i>Very late antigen 4</i> (Antígeno 4 de ativação tardia)

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Características das células T reguladoras derivadas do timo e induzidas na periferia.....	9
<b>Tabela 2</b> - Mecanismos de supressão das células T reguladoras.....	15
<b>Tabela 3</b> - Análise de prontuário das parturientes e seus respectivos recém-nascidos pré-termo pertencentes ao Grupo 1.....	33
<b>Tabela 4</b> - Análise de prontuário das parturientes e seus respectivos recém-nascidos pré-termo pertencentes ao Grupo 2.....	34
<b>Tabela 5</b> - Análise de prontuário das parturientes e seus respectivos recém-nascidos a termo pertencentes ao Grupo 3.....	34
<b>Tabela 6</b> - Dados dos prontuários das parturientes e seus respectivos recém-nascidos pré-termo do Grupo 1.....	35
<b>Tabela 7</b> - Dados dos prontuários das parturientes e seus respectivos recém-nascidos pré-termo do Grupo 2.....	36
<b>Tabela 8</b> - Dados dos prontuários das parturientes e seus respectivos recém-nascidos a termo.....	37
<b>Tabela 9</b> - Características demográficas e contagem de leucócitos totais dos grupos de recém-nascidos.....	38
<b>Tabela 10</b> - Dosagem de citocinas nas amostras de soro de recém-nascidos pré-termo do Grupo 1.....	39
<b>Tabela 11</b> - Dosagem de citocinas nas amostras de soro de recém-nascidos pré-termo do Grupo 2.....	39
<b>Tabela 12</b> - Dosagem de citocinas nas amostras de soro de recém-nascidos a termo do Grupo 3.....	40
<b>Tabela 13</b> - Análise da média do número absoluto e da frequência de linfócitos totais, de linfócitos TCD4 <sup>+</sup> e linfócitos TCD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD127 <sup>lo</sup> Foxp3 <sup>+</sup> nas amostras de sangue de cordão dos recém-nascidos dos Grupos 1, 2 e 3 e de sangue de adultos.....	45

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Concentrações séricas de IL-8, IL-6, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-2, IL-4 e IL-12p70 em amostras de soro provenientes do cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo e a termo saudáveis agrupados por tipo de parto.....	42
<b>Figura 2</b> - Estratégia de <i>gate</i> para a análise de células Treg no sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo e a termo saudáveis e no sangue periférico de adultos.....	43
<b>Figura 3</b> - Mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de <i>forkhead box P3</i> (Foxp3) em células Treg CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD127 <sup>lo</sup> Foxp3 <sup>+</sup> do sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo (Grupos 1 e 2) e a termo (Grupo 3) e de sangue de adultos, como controles.....	46
<b>Figura 4</b> - Porcentagem de células Treg CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD127 <sup>lo</sup> Foxp3 <sup>+</sup> em amostras de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos distribuídas de acordo com idade gestacional.....	47
<b>Figura 5</b> - Porcentagem de células Treg CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD127 <sup>lo</sup> Foxp3 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> nas amostras de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo (Grupos 1 e 2) e a termo (Grupo 3) e de sangue de adultos, como controles.....	48
<b>Figura 6</b> - Frequência de células Treg CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD127 <sup>lo</sup> Foxp3 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> nas amostras de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo (Grupos 1 e 2) e a termo (Grupo 3) e de sangue de adultos, como controles.....	49
<b>Figura 7</b> - Mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de CTLA-4 expresso em células Treg CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD127 <sup>lo</sup> Foxp3 <sup>+</sup> <i>naïve</i> (CD45RA <sup>+</sup> ) e de memória (CD45RA <sup>-</sup> ) das amostras de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo (Grupos 1 e 2) e a termo (Grupo 3) e de sangue de adultos, como controles.....	50
<b>Figura 8</b> - Células Treg CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> CD127 <sup>lo</sup> Foxp3 <sup>+</sup> expressando os receptores de <i>homing</i> para a mucosa intestinal $\alpha$ 4 $\beta$ 7 e $\alpha$ 4 $\beta$ 1 nas amostras de sangue de cordão dos RN dos Grupos 1, 2 e 3 e de sangue de adultos.....	51

## RESUMO

Guimarães CR. *Caracterização fenotípica da população de células T reguladoras em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos a termo e pré-termo* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A predisposição de recém-nascidos às doenças infecciosas é atribuída, em parte, a falta da memória imunológica pré-existente. Em recém-nascidos pré-termo, é presumido que o sistema imune seja menos desenvolvido ao nascimento, mas pouco se sabe sobre o tamanho e as características das subpopulações de linfócitos. Células T reguladoras (Treg) possuem papel crucial no controle do desenvolvimento de um sistema imune saudável incluindo a manutenção da autotolerância e, sua ausência, é responsável pela gama de manifestações inflamatórias e autoimunes observadas em pacientes com IPEX (*Immunodeficiency, Polyendocrinopathy and Enteropathy X-linked Syndrome*). Essas células são fenotipicamente caracterizadas pela presença do fator de transcrição Foxp3 (*forkhead box P3*) e pela alta expressão da cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2 (CD25), já que esta citocina é essencial para a geração, manutenção e funcionamento das células Treg. Pouco se sabe sobre a frequência destas células em recém-nascidos, particularmente em recém-nascidos muito prematuros ou moderados e recém-nascidos prematuros tardios, estudados como grupos separados. Resultados preliminares do nosso grupo revelaram uma maior capacidade dos recém-nascidos de produzir resposta pró-inflamatória em comparação aos adultos, a qual foi ainda mais acentuada pela diminuição da produção de IL-10, o que sugere uma função reguladora reduzida. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar fenotipicamente e quantificar a população de células Treg, por meio de citometria de fluxo, em sangue de cordão umbilical de 15 recém-nascidos pré-termo nascidos entre 30-33<sup>6</sup>/<sub>7</sub> semanas de gestação (Grupo 1), 19 recém-nascidos pré-termo nascidos entre 34-36<sup>6</sup>/<sub>7</sub> semanas de gestação (Grupo 2) e 20 recém-nascidos a termo nascidos entre 37-41 semanas de gestação (Grupo 3), todos clinicamente saudáveis e com peso adequado para a idade gestacional, em comparação com 26 adultos saudáveis. Os resultados demonstraram que existe uma correlação inversa entre a frequência de Treg e a idade gestacional, com frequências significativamente maiores de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup>Foxp3<sup>+</sup> no Grupo 1 quando comparado aos Grupos 2 e 3 e no Grupo 2 comparado ao Grupo 3, assim como frequências e números de Treg mais elevados em todos os recém-nascidos comparados aos adultos. Todos os recém-nascidos exibiram maior frequência de células Treg com fenótipo *naïve* comparados aos adultos. A expressão de CTLA-4 nas células Treg *naïve* foi reduzida nos dois grupos de pré-termo comparados aos grupos de recém-nascidos a termo e adultos, assim como nas células Treg de memória do Grupo 1 comparado aos demais grupos. As frequências de Tregs  $\alpha 4\beta 7^+$  e  $\alpha 4\beta 1^+$  foram maiores em ambos os grupos de pré-termo, mas significativamente diferentes somente no Grupo 1, quando comparado aos recém-nascidos a termo e adultos. Em conclusão, foram observadas altas frequências de células Treg em recém-nascidos pré-termo e a termo, e essas frequências mostraram correlação inversa com a idade gestacional. Essas células exibiram um perfil *naïve* quando comparadas às dos adultos, com alta expressão de CD45RA e  $\alpha 4\beta 7^+$  e menor expressão de CTLA-4, sugerindo uma menor função, particularmente em recém-nascidos muito prematuros.

Descritores: Linfócitos T Reguladores; Antígeno CTLA-4; Integrina Alfa4; Citometria de Fluxo; Recém-nascido Prematuro; Recém-nascido a Termo.

## ABSTRACT

Guimarães CR. *Phenotypic characterization of the population of regulatory T cells in umbilical cord blood from term and preterm newborns* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

The predisposition of newborn infants to infectious diseases is attributed, in part, to the lack of pre-existing immunological memory. In preterm newborns, it is assumed that the immune system is less developed at birth, but little is known about the size and characteristics of lymphocyte subpopulations. Regulatory T cells (Tregs) have a crucial role in controlling the development of a healthy immune system including the maintenance of self-tolerance and, their absence, is responsible for the range of inflammatory and autoimmune manifestations observed in patients with IPEX (Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked Syndrome). These cells are phenotypically characterized by the presence of the transcription factor Foxp3 (forkhead box P3) and by the high expression of the  $\alpha$  chain of the IL-2 receptor (CD25), as this cytokine is essential for the generation, maintenance and function of Treg cells. Little is known about the frequency of these cells in neonates, particularly in very and moderate preterm newborns and late preterm newborns studied as separate groups. Preliminary results from our group revealed greater ability of newborns to produce pro-inflammatory response compared to adults, which was further accentuated by the decreased production of IL-10, which suggests a reduced regulatory function. Thus, the aim of this study was to phenotypically characterize and quantify the population of Treg cells, by flow cytometry, in the cord blood of 15 preterm newborns born at 30-33<sup>6/7</sup> gestation weeks (Group 1), 19 preterm newborns born at 34-36<sup>6/7</sup> gestation weeks (Group 2) and 20 term newborns born at 37-41 gestation weeks (Group 3), all clinically healthy and adequate-for-gestational-age, compared to 26 healthy adults. The results demonstrated that there is an inverse correlation of the Treg frequency and gestational age, with significantly higher frequencies of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells in Group 1 compared to Groups 2 and 3 and in Group 2 compared to Group 3, as well as significantly higher Treg frequencies and numbers in all the neonates compared to the adults. All of the newborns exhibited increased Treg frequencies with a naive phenotype compared to the adults. CTLA-4 expression in the naive Tregs was decreased in both preterm groups compared with those from term newborns and adults, as well as in the memory Treg cells from Group 1 compared with the other groups. The frequencies of  $\alpha 4\beta 7^+$  and  $\alpha 4\beta 1^+$  Tregs were higher in both preterm groups, but significantly different only in Group 1, when compared with those from the term newborns and the adults. In conclusion, high frequencies of Tregs were observed in term and preterm newborns, and these frequencies showed an inverse correlation with gestational age. These cells exhibited a naive profile when compared with adults, with high expression of CD45RA and  $\alpha 4\beta 7^+$  and lower expression of CTLA-4, implying a decreased function, particularly in very preterm newborns.

Descriptors: T-Lymphocytes, Regulatory; CTLA-4 Antigen; Integrin alpha4; Flow Cytometry; Preterm Newborn; Term Newborn.



---

*INTRODUÇÃO*

## 1. INTRODUÇÃO

A proteção contra infecções na gestação é promovida por diversos fatores que atuam em conjunto. A cavidade uterina apresenta um sistema imune inato e um sistema efetor que mantêm a esterilidade, detectam infecção e, sob circunstâncias de invasão microbiana substancial, induzem a expressão de marcadores que podem acelerar a maturação dos pulmões e promover um parto prematuro, entregando o feto a um ambiente ameaçador (MARÓDI, 2006; PALMEIRA *et al.*, 2012).

O trabalho de parto se assemelha a uma resposta inflamatória que inclui secreção de citocinas/quimiocinas por células residentes e infiltração de células do sistema imune na interface materno-fetal. A ativação precoce destes processos inflamatórios leva ao trabalho de parto prematuro, o que pode resultar no nascimento prematuro, um importante determinante da mortalidade e morbidade neonatal. Portanto, a elucidação do processo de trabalho de parto a um nível celular e molecular é essencial para compreender a fisiopatologia da prematuridade (GOMEZ-LOPEZ *et al.*, 2014).

O conceito de prematuridade inclui todo recém-nascido (RN) vivo com menos de 37 semanas completas de gestação contadas a partir do primeiro dia do último período menstrual. A etiologia do parto prematuro espontâneo é multifatorial. Dentre os fatores responsáveis estão: ausência ou assistência pré-natal inadequada; ocorrência de parto prematuro e abortamento tardio anteriores; gestantes jovens e tardias; estresse materno; uso de drogas, tabagismo e alcoolismo; atividade física excessiva e condições inadequadas de trabalho; antecedentes ginecológicos de

malformações uterinas; e intercorrências durante a gestação, como gestação múltipla, rotura prematura das membranas, anomalias da placenta, infecções (genitais, urinárias), traumatismos e doenças sistêmicas (hipertensão arterial, diabetes). Apesar disso, a etiologia ainda é desconhecida em 50% dos casos (NORWITZ *et al.*, 1999).

No decorrer das duas últimas décadas, foi relatado um declínio na taxa global de mortalidade entre crianças abaixo de cinco anos de vida, porém um progresso mais lento foi alcançado na redução da mortalidade neonatal (primeiros 28 dias de vida completos). A porcentagem média de mortes neonatais em países em desenvolvimento é de 39%, sendo que, segundo a Organização Mundial de Saúde, a mais alta foi observada no Brasil, de 64%. O documento mostra que países que reduziram rapidamente a mortalidade infantil, como o Brasil, tendem a mostrar uma proporção crescente de mortes no período neonatal (WHO, 2014). No mundo, no ano de 2012, a mortalidade neonatal foi de 21 em cada 1000 nascidos vivos, sendo que no Brasil foi 14 em cada 1000 nascidos vivos (WHO, 2014).

Apesar de a sobrevida ter melhorado nos últimos anos, principalmente nos centros terciários, a prematuridade é a principal causa de morbidade e mortalidade neonatal, pois ocorre em 11% dos nascidos vivos no mundo e é responsável por 35% das mortes neonatais (BLENCOWE *et al.*, 2012; HOWSON *et al.*, 2012). A morbidade está diretamente relacionada aos distúrbios respiratórios e às complicações infecciosas e neurológicas em longo prazo em crianças, incluindo paralisia cerebral e atraso no desenvolvimento (SHAPIRO-MENDOZA; LACKRITZ, 2012).

As taxas de nascimento prematuro vêm aumentando em todo o mundo, principalmente à custa de RN prematuros tardios, os quais foram assim denominados

recentemente, em 2005, em um seminário organizado pelo Instituto Nacional de Saúde e Desenvolvimento Humano (NICHD). Uma proposta foi feita para substituir a terminologia vaga e imprecisa de “perto de termo” para “pré-termo tardio” para, assim, refletir a imaturidade fisiológica e de desenvolvimento deste grupo de RN (RAJU *et al.*, 2012). Foi estabelecido, então, que o RN pré-termo tardio é aquele que nasce com 34 semanas de gestação completas até 36 semanas e 6 dias, contadas após o primeiro dia do último período menstrual. Já o RN pré-termo moderado é aquele nascido entre 32 semanas de gestação completas e 33 semanas e 6 dias (GUASCH *et al.*, 2009; RYAN *et al.*, 2010).

O estudo desenvolvido por Shapiro-Mendoza e colaboradores (2008) descreve um risco 7 vezes maior de desenvolvimento de morbidades neonatais em prematuros tardios, em relação aos nascidos a termo. Já a incidência de eventos potencialmente fatais aparentes em prematuros tardios foi, pelo menos, 8 vezes maior do que em crianças nascidas a termo (HUNT, 2006).

A representação desproporcional de RN prematuros entre os óbitos neonatais relacionados à infecção pode ser decorrente de um sistema imune imaturo (WYNN *et al.*, 2009). A infecção é a principal causa de mortalidade entre as crianças nos primeiros dias de vida. O sistema imune adaptativo neonatal se apresenta inexperiente pela falta de estimulação antigênica durante a fase uterina, com pouca ou nenhuma memória imunológica. Essa incompetência imune leva a uma maior susceptibilidade a infecções clinicamente relevantes em neonatos e pode justificar uma demora no desenvolvimento de uma resposta imune específica. Porém, essa deficiência imunológica inerente do período neonatal não é necessariamente relativa ao número

de seus componentes, mas em como são regulados funcionalmente (GHAZAL *et al.*, 2013).

### **1.1 Imunidade Neonatal**

Neonatos prematuros possuem deficiências em ambas as imunidades, inata e adaptativa, assim como na interação entre esses dois sistemas (STRUNK *et al.*, 2011). Dentre os fatores inatos, em decorrência da menor disponibilidade de proteínas e peptídeos solúveis, como a lectina ligante de manose (MBL), lactoferrina e as defensinas e de uma resposta celular adequada, a capacidade de responder às infecções fica reduzida. Estes peptídeos e proteínas solúveis possuem capacidade de opsonizar os patógenos ou atuar em sua morte direta, por meio de suas propriedades antimicrobianas (MELVILLE; MOSS, 2013).

Outros fatores contribuem para uma eficiente função fagocítica, que incluem:

- (i) a presença de números adequados de monócitos e neutrófilos no sangue periférico;
- (ii) a habilidade para responder a sinais vindos dos sítios de inflamação; (iii) a migração para esses sítios e;
- (iv) a capacidade de ingerir e eliminar o microrganismo invasor (FILIAS *et al.*, 2011). É bem estabelecido que os neutrófilos apresentam deficiências quantitativas e qualitativas importantes ao nascimento. Os RN a termo e, particularmente, os pré-termo, dispõem de poucas células progenitoras de neutrófilos, o que pode resultar em grave deficiência para mobilizar números adequados de neutrófilos por ocasião de uma infecção. Os neutrófilos neonatais também

apresentam múltiplos defeitos funcionais, incluindo quimiotaxia, adesão e migração. (NUSSBAUM; SPERANDIO, 2011).

Ainda dentre os componentes solúveis, RN a termo se beneficiam da proteção complementar proporcionada pelos anticorpos IgG maternos transferidos através da placenta (SIMISTER, 2003). No entanto, prematuros extremos carecem substancialmente desses anticorpos, uma vez que a transferência placentária ocorre, em grande parte, durante o terceiro trimestre de gestação, principalmente após trinta e duas semanas de gestação (PALMEIRA *et al.*, 2012; VAN DEN BERG *et al.*, 2010). As concentrações de IgG aumentam com a idade gestacional, sendo assim, o RN prematuro possui baixos níveis de IgG materna circulante, levando a uma opsonização deficiente, o que ocasiona uma deficiência na fagocitose (HEININGER *et al.*, 2009; KÄLLMAN *et al.*, 1998; VAN DEN BERG *et al.*, 2011).

Considerados em conjunto, os mecanismos da imunidade inata desenvolvem-se mais cedo que a imunidade adaptativa e, entre os componentes da imunidade adaptativa (linfócitos T e B), é bem estabelecida a ausência de memória imunológica. Os RN apresentam deficiências na ativação de linfócitos T e na produção de citocinas, na interação entre os linfócitos T e B e na produção de imunoglobulinas pelas células B, cuja capacidade plena de formar anticorpos é a última a ser adquirida, o que só ocorre no final da infância ou começo da adolescência (MELVILLE; MOSS, 2013).

Recém-nascidos pré-termo e a termo apresentam uma deficiência funcional dos linfócitos T resultante de uma grande proporção de células T *naïve* circulantes (alta expressão de CD45RA e L-selectina) e uma baixa proporção de células T de memória

(WALKER *et al.*, 2011). Essa maior proporção de células T com fenótipo *naïve* é resultado de uma captação e apresentação de antígenos deficiente pelas células dendríticas (DC), o que é agravado pela redução da expressão de MHC de classe II nas células apresentadoras de antígenos (STRUNK *et al.*, 2011).

Os neonatos são vulneráveis às infecções devido a um desvio no padrão de resposta de linfócitos T CD4 para o fenótipo Th2, com baixa produção de citocinas importantes contra patógenos intracelulares (IL-12, IFN- $\gamma$ , IFN tipo I) em comparação aos adultos. Cabe lembrar que o IFN- $\gamma$  tem um papel fundamental na ativação de macrófagos, mecanismo crítico para a resistência a patógenos intracelulares, como micobactérias, toxoplasma e diversos fungos. Por outro lado, as funções Th2 já bem estabelecidas ao nascimento podem favorecer a sensibilização alérgica precoce (HARTEL *et al.*, 2005; MARODI, 2006).

Por fim, alguns timócitos autorreativos que deveriam ser eliminados durante a seleção negativa no timo podem se diferenciar em células T reguladoras (Treg), que são indispensáveis para a manutenção da tolerância imune e homeostase por suprimir uma aberrante ou excessiva resposta imune na periferia. A tolerância imunológica é uma característica fundamental do sistema imunológico projetada para preservar tecidos e células próprias, permitindo, ao mesmo tempo, respostas eficazes contra as infecções. Embora a maioria das células T autorreativas seja eliminada centralmente no timo, células T periféricas abrigam células T autorreativas que são mantidas em controle por um número de mecanismos imunorreguladores intrínsecos e extrínsecos, dentre os quais as células supressoras ou T reguladoras (Treg) desempenham um papel crucial (YADAV *et al.*, 2013).

## 1.2 Tolerância e Células T reguladoras

É bem estabelecido que a função crítica do sistema imunológico é discriminar o próprio do não próprio. A tolerância a antígenos próprios é um processo altamente regulado e, para mantê-la, o sistema imune deve ser capaz de distinguir linfócitos autorreativos e seu desenvolvimento. Há evidências substanciais de que células T autorreativas potencialmente patogênicas estão presentes no sistema imune normal e a supressão da ativação/expansão destas células mediada por células T é outro mecanismo essencial para a auto-tolerância. Células Treg são particularmente importantes e indispensáveis para a manutenção da homeostase imune e falhas no seu desenvolvimento e função são causas primárias de doenças autoimunes e inflamatórias (SESARMAN *et al.*, 2010; WING; SAKAGUCHI, 2010; SAKAGUCHI *et al.*, 2008; LI; BOUSSIOTIS, 2011).

A maioria de células Treg CD4<sup>+</sup> naturais especificamente expressam Foxp3, um fator de transcrição que é crucial para o seu desenvolvimento e função. Tregs CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> que constituem aproximadamente 10% das células T CD4<sup>+</sup>, são produzidas no timo como uma subpopulação de células T supressoras funcionalmente maduras. Em contrapartida, células Tregs também podem ser induzidas a partir de células T *naïve* antígeno-específicas, seguido de exposição antigênica sob condições particulares na periferia, especialmente no intestino e, nestas condições, são denominadas de células Tregs adaptativas ou induzidas (HORI *et al.*, 2003a; SUN *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturais no timo requer interações de alta afinidade entre o receptor de células T (TCR) e os complexos



de auto-peptídeos acoplados ao MHC de classe II apresentados pelas células do estroma do timo. Assim, elas são positivamente selecionadas durante o processo de seleção tímica, com relativa alta afinidade por antígenos próprios (SAKAGUCHI *et al.*, 2010; JOSEFOWICZ *et al.*, 2012).

Ao longo dos últimos anos, tornou-se claro que a maior população de células Treg é gerada no timo, o que favorece o termo Treg derivada do timo (tTreg) para esta população (SHEVACH; THROTON, 2014). As células tTreg CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> expressam constitutivamente a molécula CD25 (cadeia  $\alpha$  do receptor para interleucina 2 – IL-2) em níveis elevados. Essas células também compartilham um padrão de expressão similar de um número de moléculas de superfície de células T antígeno-ativadas, como por exemplo, altos níveis de proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4/CD152), baixos níveis de expressão da cadeia  $\alpha$  do receptor para IL-7 (CD127), cadeia  $\beta$  do receptor para IL-2 (CD122), CD44, antígeno 1 associado a função linfocitária (LFA-1/CD11a) e molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1/CD54). Em contraste com células T efetoras convencionais, células Treg Foxp3<sup>+</sup> raramente produzem IL-2 e outras citocinas inflamatórias incluindo IFN- $\gamma$  e IL-17. Uma vez ativadas, a capacidade inibitória das células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> não é antígeno-específica, o que significa uma supressão independente da especificidade das células T respondedoras (ITOH *et al.*, 1999; HILL *et al.*, 2007; YAMAGUCHI *et al.*, 2011).

É igualmente claro que uma percentagem desconhecida de Treg pode ser gerada a partir de células T Foxp3<sup>-</sup> convencionais em sítios periféricos. Foi proposto que essa população fosse denominada Treg derivada na periferia (pTreg) (ABBAS *et al.*, 2013). As pTreg, como seu próprio nome diz, são geradas na periferia após uma

variedade de estímulos antigênicos, em condições ditas tolerogênicas. Estas células são células T supressoras secundárias e se desenvolvem a partir de células CD4 convencionais, na presença do antígeno e citocinas reguladoras como TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-4, passando a expressar CD25 e Foxp3. Células pTreg exercem sua função através da liberação de citocinas inibitórias como IL-10 e TGF- $\beta$ . Vários tipos de células Treg periféricas têm sido descritos, incluindo Tr1, que produzem IL-10 e cuja função supressiva está bem documentada nas doenças alérgicas, autoimunes e transplantes alogênicos. Outros subtipos de Treg incluem: Th3 (produtoras de TGF- $\beta$ ), células T CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>, T CD8<sup>+</sup> supressora e T $\gamma\delta$  (YANG *et al.*, 2008; SAKAGUCHI, 2006; JOLUNEIT; SCHMITT, 2003; ZENG *et al.*, 2015).

A Tabela 1, a seguir, demonstra as características inerentes a cada subtipo de células T reguladoras.

**Tabela 1** - Características das células T reguladoras derivadas do timo e induzidas na periferia

	tTreg		pTreg
	nTreg	Tr1	Th3
<b>Fenótipo</b>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> , CD127 <sup>low</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> de precursores CD25 <sup>-</sup>
<b>Outros marcadores</b>	CTLA4 <sup>+</sup> , GITR <sup>+</sup> , FoxP3 <sup>+</sup>	CD25 <sup>low</sup> , CD45RB <sup>low</sup> , FoxP3 <sup>-</sup>	CD25 <sup>low</sup> , CD45RB <sup>low</sup> , FoxP3 <sup>+</sup>
<b>Supressão</b>	Dependente de contato, de granzima B, produz TGF- $\beta$	Através de citocinas, produz IL-10	Através de citocinas, produz TGF- $\beta$
<b>Papel <i>in vivo</i></b>	Supressão de células T autorreativas	Imunidade de mucosas, resposta inflamatória	Imunidade de mucosas, resposta inflamatória
<b>Expansão <i>in vitro</i></b>	Estimulação utilizando TCR/CD28 e IL-2	CD3, IL-10, ácido retinóico	CD3, TGF- $\beta$

A identificação de Foxp3 como um fator transcricional chave em Treg permitiu a determinação de um número de características imunológicas das células Treg derivadas do timo, incluindo suas funções, estabilidade e diferenciação. A transdução de Foxp3 suprime a produção de IL-2, porém regula positivamente a expressão de moléculas associadas às Treg, como CD25, CTLA-4 e um membro da superfamília do receptor para TNF (GITR) em células T convencionais. Estudos de *screening* genômico revelaram que Foxp3 regula positivamente e negativamente a expressão de centenas de genes por ligação direta em seu loci genômico, até mesmo regulando a expressão de si mesmo. A grande maioria das evidências experimentais indica que o Foxp3 facilita a diferenciação das células Treg e sua falta é responsável pela gama de manifestações inflamatórias e autoimunes observadas em camundongos deficientes de Foxp3 (*scurfy*) e em pacientes com IPEX (*Immunodeficiency, Poliendocrinopathy and enteropathy X-linked syndrome*), tais como enterite, diabetes mellitus tipo I, outras endocrinopatias autoimunes e citopenias (HORI *et al.*, 2003b; MARSON *et al.*, 2007; CARNEIRO-SAMPAIO; COUTINHO, 2015).

Múltiplos mecanismos de supressão mediados por células Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> foram propostos durante a última década. A função supressora das células Treg pode ser facilitada através da sua interação com células dendríticas (DC) ou células T efetoras diretamente. Linfócitos Treg inibem contatos estáveis entre células T *naïve* e DC (LI *et al.*, 2015). Células T antígeno-específicas necessitam de um contato prolongado com os epítomos apresentados pelas DC, porém, na presença de Treg, essas células não exibem períodos longos de contato. Assim como células T de memória respondem mais rapidamente do que células T *naïve*, células tTreg Foxp3<sup>+</sup>,

que já são apresentadas a antígenos no timo e na periferia, interagem com DC predominantemente e de forma mais rápida. Células Treg interagem predominantemente com DC apresentando antígenos e competem com células T *naïve* pela interação com essas células, principalmente em virtude da presença de moléculas de adesão como LFA-1 e ICAM-1 em níveis maiores do que as células T *naïve*. Além disso, a molécula LAG-3 (CD223), homóloga a CD4, que se liga ao MHC de classe II com maior afinidade, é mais expressa em Treg e contribui para a supressão mediada por estas células possivelmente por aumentar a interação DC-Treg e por transduzir um sinal inibitório nas DC após sua ligação ao MHC (LIANG *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2004; JONULEIT *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2015).

Uma vez que sinais coestimuladores transduzidos por CD28 são requeridos para ativação e proliferação de células T *naïve*, a inibição da sinalização por CD28 em células T respondedoras pela expressão de CTLA-4 em células Treg é o mecanismo central de supressão. Como essa molécula compartilha os ligantes CD80 e CD86 com o CD28, porém apresenta maior afinidade por ambos, CTLA-4, altamente expresso em Treg, bloqueia a coestimulação via CD28 em células T convencionais por competir com CD28 pelos ligantes CD80/CD86 na sinapse imunológica (WALKER, 2013). Um estudo recente mostrou que CD80 e CD86 podem ser capturados e degradados por Treg expressando CTLA-4, via trans-endocitose. Além disso, a expressão de CD80 e CD86 pelas DC pode ser reduzida por regulação da transcrição dependente da atuação do Foxp3 após a ligação entre CTLA-4 e CD80/CD86 (YOKOSUKA *et al.*, 2010; QURESHI *et al.*, 2011; DEJEAN *et al.*, 2009).

A interação de DC com o CTLA-4 em Treg promove a produção de IFN- $\gamma$ , que induzirá a produção da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO). A IDO é uma enzima que degrada o aminoácido essencial triptofano, sem o qual a ativação e proliferação de linfócitos T e, conseqüentemente, mecanismos a ele associados podem ser seriamente comprometidos. Os catabólitos gerados pela ação da enzima, como a quinurenina, que é liberada no microambiente, leva a supressão da célula T pela indução da apoptose. Estudos adicionais mostraram que a IDO pode induzir o fenótipo regulador em DC independente das suas funções catabolíticas. A sinalização por CTLA-4 também contribui para a conversão de células T *naïve* em células T Foxp3<sup>+</sup> dependente de TGF- $\beta$  (PALLOTTA *et al.*, 2011; ZHENG; RUDENSKY, 2007).

Uma característica fundamental de células tTreg é a baixa produção de IL-2 e sua alta expressão constitutiva do receptor de alta afinidade para IL-2, que é formado por 3 cadeias, cadeia  $\alpha$  (CD25), cadeia  $\beta$  (CD122) e cadeia  $\gamma$  (CD132). Células Treg, entretanto, são altamente dependentes da IL-2 exógena para sua proliferação e sobrevivência. Segundo Chen e Konkel (2015), é provável que os sinais provenientes da estimulação por IL-2 mantêm a viabilidade de células tTreg e protegem as células que expressam Foxp3 da apoptose. As células Treg são capazes de privar células T convencionais reativas a antígenos de IL-2, prevenindo sua ativação. A baixa produção de IL-2 e a absorção local dessa interleucina, em conjunto, podem conferir a Treg CD25<sup>+</sup> a atividade supressora. Essa competição pelos fatores de crescimento levaria células convencionais a apoptose por privação de citocinas. Como células Treg são dependentes de IL-2 para sobrevivência, mas também agem para inibir a produção desta interleucina pelas células T convencionais, a ativação e expansão de células Treg

e T convencionais podem ser balanceadas via IL-2 (FURTADO *et al.*, 2002; SOJKA *et al.*, 2008; SETOGUCHI *et al.*, 2005).

Outro mecanismo de supressão envolve o ATP, que pode ser liberado por células ativadas e por células danificadas, aumentando as reações imunes. O ATP extracelular tem papel importante no influxo de cálcio mediado por TCR, ativação de NFAT e produção de IL-2. Linfócitos Treg produzem ectoenzimas que reduzem as concentrações locais de ATP extracelular, como o CD39 e CD73, que são preferencialmente expressas em Treg e degradam o ATP para AMP, e o AMP para nucleosídeos, respectivamente (YIP *et al.*, 2009; BORSELLINO *et al.*, 2007).

O TGF- $\beta$  é uma citocina imunossupressora com funções pleiotrópicas. Está presente em altas concentrações na superfície de Treg, contribuindo com a atividade supressora e também atuando na indução de expressão deIDO pelas DC. Apesar destes achados, ainda é controversa a extensão da contribuição desta citocina para a supressão mediada por Treg. O Foxp3 permite uma maior sensibilidade de células Treg para o TGF- $\beta$ , pela regulação negativa da expressão do receptor antagonista dessa citocina, o Smad7 (PALLOTTA *et al.*, 2011; CHEN; KONKEL, 2015).

A IL-10 é outra citocina supressora produzida por várias populações celulares, incluindo Treg, e que induz células dendríticas tolerogênicas com funções reguladoras que, por sua vez, produzem IL-27, importante indutora da produção de IL-10 por células T convencionais. Esta interleucina pode promover também a diferenciação de células T *naïve* em células secretoras de IL-10. Embora a IL-10 seja abundantemente produzida por células T Foxp3<sup>+</sup> e T Foxp3<sup>-</sup> no intestino, células Treg isoladas do baço

produzem baixas concentrações desta citocina *in vitro*. Por outro lado, a IL-35 foi descrita mais recentemente como uma importante citocina imunossupressora, que contribui com a função supressora da Treg e que induz a diferenciação de células Tr35 (células secretoras de IL-35 Foxp3<sup>+</sup>) (TAKAHASHI *et al.*, 1998; COLLISON *et al.*, 2010).

Assumindo que células Treg utilizam os múltiplos mecanismos descritos acima para exercer sua atividade supressora, Yamaguchi e colaboradores (2011) propuseram dois modelos de atuação destas células, afirmados por Li e Boussiotis (2011): o primeiro atua em processos fisiológicos ou não inflamatórios, responsável por sustentar a autotolerância natural, e o segundo, que age em condições inflamatórias, na manutenção da homeostase imune nos sítios constantemente expostos a microrganismos invasores.

Dado que a ativação, proliferação e sobrevivência de células T convencionais requerem vários tipos de coestimulação em adição à estimulação antigênica via TCR, a privação dependente de Treg ou intervenção nos coestímulos pode atenuar ou suprimir essas respostas imunes. Os mecanismos de privação estão descritos na Tabela 2, a seguir, e incluem: i) a inibição da sinalização por CD28 (por competição dependente de LFA-1 de células Treg com células T *naïve* por interações físicas com DCs e pela regulação negativa da expressão de CD80/CD86 nas DC dependente de CTLA-4); ii) absorção de IL-2 via alta expressão de CD25 presente em Tregs e; iii) degradação de ATP dependente de CD39/CD73 (YAMAGUCHI *et al.*, 2011).

**Tabela 2** - Mecanismos de supressão das células T reguladoras

<b>Molécula</b>	<b>Função</b>
<b><i>Mecanismos de supressão dependentes de contato</i></b>	
CTLA-4	Suprime a função co-estimulatória das APCs
CD73-CD39	Hidroliza o ATP inflamatório extracelular
LAG3	Induz ou inibe a sinalização através de moléculas de MHC de classe II
Granzima A	Lise de células T convencionais
<b><i>Mecanismos de supressão mediados por citocinas</i></b>	
TGF- $\beta$ e LAP	Indução de Foxp3 em células T convencionais
IL-10	Atenua a função de células dendríticas Converte células T convencionais em células Tr1
Galectina 1	Impede o ciclo celular e promove apoptose em células T convencionais
CD25	Absorção de IL-2
IL-35	Induz a expressão de IL-35 em células convencionais

Fonte: Sakaguchi (2010).

Na ausência de Treg, células T *naïve* podem interagir repetidamente com DC, recebendo estímulo constante de CD28, IL-2 e ATP, que regulam positivamente a ativação dessas células e aumentam a expressão de CD80/CD86 nas APC. Tendo em vista que as células Treg não produzem IL-2 e necessitam dessa interleucina para própria sobrevivência, assim como precisam da sinalização por CD28, bloqueada pela mesma, para sua manutenção periférica, a atuação supressora destas células também controla seu próprio número, prevenindo o excesso de células e assegurando a eficácia



da resposta imune quando for requerida. A interrupção desse *feedback* pode, então, afetar a homeostase imunológica (GARBI; HAMMERLING, 2011).

Para a defesa eficaz do hospedeiro, no entanto, a supressão mediada por Treg deve ser revogada quando patógenos invadem transitoriamente o hospedeiro. Existem muitas manifestações em que a estimulação do TCR na presença de forte coestimulação via CD28 e/ou altas concentrações de IL-2 permite que as células T respondedoras superem a supressão pelas T reguladoras (TAKAHASHI *et al.*, 1998; THRNTON; SHEVACH, 1998).

A estimulação de receptores *Toll like* também bloqueia a função supressora das células Treg, em parte devido a IL-6 produzida pelas DC e também devido à maior expressão de CD80/CD86. Essa anulação temporária da supressão mediada por células Treg permite que o sistema imune responda aos patógenos de forma eficaz (ZHENG *et al.*, 2004; YAMAGUCHI *et al.*, 2011).

Enquanto uma atenuação temporária de supressão é necessária para montar uma resposta imune eficaz, células Treg devem recuperar o controle em condições altamente inflamatórias, a fim de evitar imunopatologias. Nestas condições, os mecanismos de privação fisiologicamente em operação são revogados por coestímulos abundantes; e células Treg, neste caso, produzem moléculas imunossupressoras para suprimir diretamente a ativação e a expansão de células T respondedoras. Isto é, além do mecanismo central de supressão, mecanismos de citotoxicidade ou de inativação operam adicionalmente, através da produção de IL-10, TGF- $\beta$ , IL-35, granzima,

perforina e cAMP, os quais são capazes de suprimir células T convencionais altamente ativadas (YAMAGUCHI *et al.*, 2011).

Além disso, como descrito acima, células Treg altamente ativas amplificam a sua expansão e capacidade supressora em um ciclo de regulação positiva através do aumento da expressão de IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35, e também induzem a diferenciação de células T *naïve* convencionais em células T secretoras destas citocinas para, efetivamente, conter a inflamação exacerbada (YAMAGUCHI *et al.*, 2011; SAKAGUCHI *et al.*, 2010).

Em suma, as células Treg alteram os mecanismos de supressão dependendo do microambiente local. Em um ambiente não-inflamatório a homeostase imune é mantida por essas células impedindo o coestímulo tanto de células T convencionais, como das próprias T reguladoras. No entanto, durante uma resposta inflamatória estes mecanismos que privam estão temporariamente anulados por uma abundância de estímulos. Neste caso, células Treg são capazes de restabelecer a supressão, aumentando rapidamente a sua própria função em um ciclo de *feedback* positivo via IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35 e é capaz de controlar células T convencionais por meio da produção dessas moléculas imunossupressoras (YAMAGUCHI *et al.*, 2011).

Receptores envolvidos no tráfego celular também são importantes para a migração e função das células Treg Foxp3<sup>+</sup>. Tem sido relatado que células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expressam altos níveis de CXCR4, CCR4, CCR5, CCR8, ligantes de E/P-selectina e CD103 ( $\alpha$ E integrina). Elas também expressam receptores de *homing* para ambientes linfoides, tais como CD62L, CCR7 e CXCR5. Várias subtipos de células T Foxp3<sup>+</sup> foram

descritos, que caracteristicamente expressam receptores de *homing* de acordo com o seu grau de diferenciação e ativação (LIM *et al.*, 2006).

Em doadores de sangue saudáveis, existem dados divergentes à respeito da porcentagem de células Treg. Foi descrito que as porcentagens médias de Treg  $CD4^+CD127^{low}CD25^+$  aumentam discretamente ao longo da vida, de 6,1% em sangue de cordão para 7,22% em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de adultos entre 20 e 25 anos, para 7,5% em PBMC de adultos acima de 60 anos. No entanto, a correlação exata entre o número de células Treg aumentado com a senescência imune ainda não está esclarecido (GREGG *et al.*, 2005). Sakaguchi e colaboradores (2010) revelaram que células Treg *naïve* no sangue periférico dentre as células T  $CD4^+$  diminuem com a idade, começando com níveis em torno de 4-10% no sangue de cordão, 1-4% em adultos jovens e 0,5-1,5% em idosos saudáveis. Entretanto, a células Treg efetoras aumentam com a idade começando com níveis em torno de 0-0,5% em sangue de cordão, 1-2,5% em adultos jovens e 1-4% em idosos saudáveis. Estas células, por sua vez, foram diferenciadas por marcadores de células Treg *naïve* –  $CTLA4^{lo}Ki-67^+CD45RA^+Foxp3^{lo}$  e de células Treg efetoras –  $CTLA4^{hi}CD45RA^-Foxp3^{hi}$  (MIYARA *et al.*, 2009).

Foi relatada uma alta proporção de células Treg  $CD4^+CD25^+$ , que expressam elevados níveis de mRNA de CTLA-4, GITR e Foxp3 em sangue de cordões umbilicais, que é particularmente acentuada em bebês prematuros, comparados aos neonatos a termo adequados para idade gestacional. No entanto, pouco se sabe sobre a expressão proteica destes marcadores e sua função, particularmente em recém-nascidos pré-termo. Além disso, foi demonstrado que o tipo de parto afeta o número

de células Treg presentes no sangue do cordão umbilical, sendo mais alto em recém-nascidos e suas mães após parto vaginal, sugerindo um fenômeno relacionado ao estresse (TAKAHATA *et al.*, 2004; CHANG *et al.*, 2005; YILDIRAN *et al.*, 2011).

### **Justificativa**

Os resultados observados do projeto do nosso grupo intitulado: “Avaliação da resposta imune neonatal: mecanismos básicos de ativação via receptores semelhantes ao *Toll* 2 e 4 (TLR-2 e 4) em diferentes células apresentadoras de antígenos de recém-nascidos a termo e pré-termo saudáveis e com sepse precoce e tardia”, demonstram níveis mais altos de produção de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por monócitos dos neonatos não estimulados (controle negativo) e estimulados com os agonistas de TLR-2 e TLR-4, Pam3CSK4 ou LPS O55, quando comparados aos adultos (FARIA, 2013; SILVEIRA-LESSA, 2014).

Esses dados sugerem que o bebê apresenta maior capacidade de desenvolver uma resposta pró-inflamatória, o que fica ainda mais acentuada pela aparente menor produção de IL-10 pelos RN, importante citocina anti-inflamatória, o que pode levar a um desequilíbrio na resposta imune e aumentar a susceptibilidade do neonato a desenvolver sepse. Particularmente, essa produção reduzida de IL-10 em neonatos, de acordo com outros trabalhos da literatura pode contribuir para o aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias em RN a termo e pré-termo (SCHULTZ *et al.*, 2002; YERKOVICH *et al.*, 2007; CORBETT *et al.*, 2010). A alta incidência de complicações graves durante o processo infeccioso em neonatos pode ser consequência da sua

incapacidade de controlar a inflamação (JONES *et al.*, 1996; CHHEDA *et al.*, 1996; SCHULTZ *et al.*, 2004).

Essas informações sugerem, portanto, um desequilíbrio da resposta imune neonatal. Como células T reguladoras também podem indiretamente inibir APC como resultado de sua interação com células T respondedoras e/ou através da produção e secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ , a inibição mediada por estas células pode constituir um mecanismo adicional de disfunção das APC.

Como células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> têm sido mostradas como importantes na regulação da tolerância a aloenxertos em modelo murino, um aspecto bem explorado na literatura é a função destas células em sangue de cordão umbilical como supressora ativa de respostas imunes alogênicas após transplante de sangue de cordão não relacionado, que é usado como uma fonte alternativa de células-tronco alogênicas (CHANG *et al.*, 2005).

Dentre a ampla gama de terapias baseadas em células, o uso do sangue de cordão umbilical como fonte de células imunomoduladoras para o tratamento de doenças autoimunes tem se tornado muito popular. A significativa população de células Treg do cordão pode, em teoria, limitar as respostas inflamatórias e suprimir células T efetoras que tem papel central em processos autoimunes mediados por células (ENDE *et al.*, 2004; HALLER *et al.*, 2007; VIENER *et al.*, 2007; VOLTARELLI *et al.*, 2007).

Deste modo, o sangue de cordão umbilical tem se tornado alvo de interesse na literatura para desenvolvimento de terapia celular contra uma gama de doenças,

inclusive doenças autoimunes, mas a caracterização fenotípica e o papel destas células no sistema imune do próprio recém-nascido ainda não foram bem elucidados, particularmente em RN pré-termo analisados de acordo com a idade gestacional. Considerando a importância destas células no controle da homeostase imune e seu papel no ambiente inflamatório, é de extrema importância a quantificação e caracterização da população de células T reguladoras no sangue do cordão umbilical de grupos bem definidos de recém-nascidos pré-termo e a termo saudáveis.

---

*OBJETIVOS*

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar fenotipicamente e quantificar a população de células T reguladoras em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo e a termo.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Avaliar a frequência e número de células T reguladoras em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo e a termo;

2.2.2. Analisar a expressão do marcador de células *naïve* CD45RA em células T reguladoras de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo e a termo;

2.2.3. Analisar a expressão do marcador de ativação CTLA-4 em células T reguladoras *naïve* e de memória de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo e a termo;

2.2.4. Analisar a expressão das integrinas  $\alpha 4\beta 7$  and  $\alpha 4\beta 1$  em células T reguladoras de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo e a termo.



*METODOLOGIA*

---

### **3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Aspectos Éticos**

A coleta teve início somente após aprovação do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPEsq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Número do parecer 80463, data 22/08/2012) e após apresentação minuciosa do projeto às parturientes doadoras, que assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e estiveram inteiramente de acordo em participar do trabalho. Todos os procedimentos não ultrapassaram os limites descritos de risco mínimo, de acordo com a regulamentação da convenção de Genebra para pesquisa com seres humanos, e do Conselho Nacional de Saúde.

#### **3.2. Casuística**

##### **3.2.1. Obtenção de amostras de sangue de cordão umbilical**

Foram coletadas 54 amostras de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos classificados em três grupos: 15 amostras de recém-nascidos classificados como muito/moderado pré-termo, com idade gestacional  $\geq 30$  e  $< 34$  semanas (Grupo 1); 19 amostras de recém-nascidos pré-termo tardio, com idade gestacional  $\geq 34$  e  $< 37$  semanas (Grupo 2) e; 20 amostras de recém-nascidos a termo  $\geq 37$  semanas (Grupo 3), todos clinicamente saudáveis e com peso adequado para a idade gestacional. A idade

gestacional foi determinada utilizando a data da última menstruação (DUM) e, quando não possível, considerando-se a ultrassonografia fetal realizada no primeiro trimestre. Na avaliação clínica da idade gestacional, na ausência da data da última menstruação e, quando surgiram dúvidas no exame de ultrassonografia, foi utilizado o método de Capurro (1978) para RN a termo e New Ballard (1991) para RN pré-termo.

Antes da coleta, foi realizada uma análise dos prontuários para escolha das possíveis doadoras, estabelecendo os seguintes critérios de inclusão: idade entre 18 e 35 anos; reações sorológicas negativas para HIV, CMV, hepatite, sífilis, toxoplasmose, rubéola e herpes.

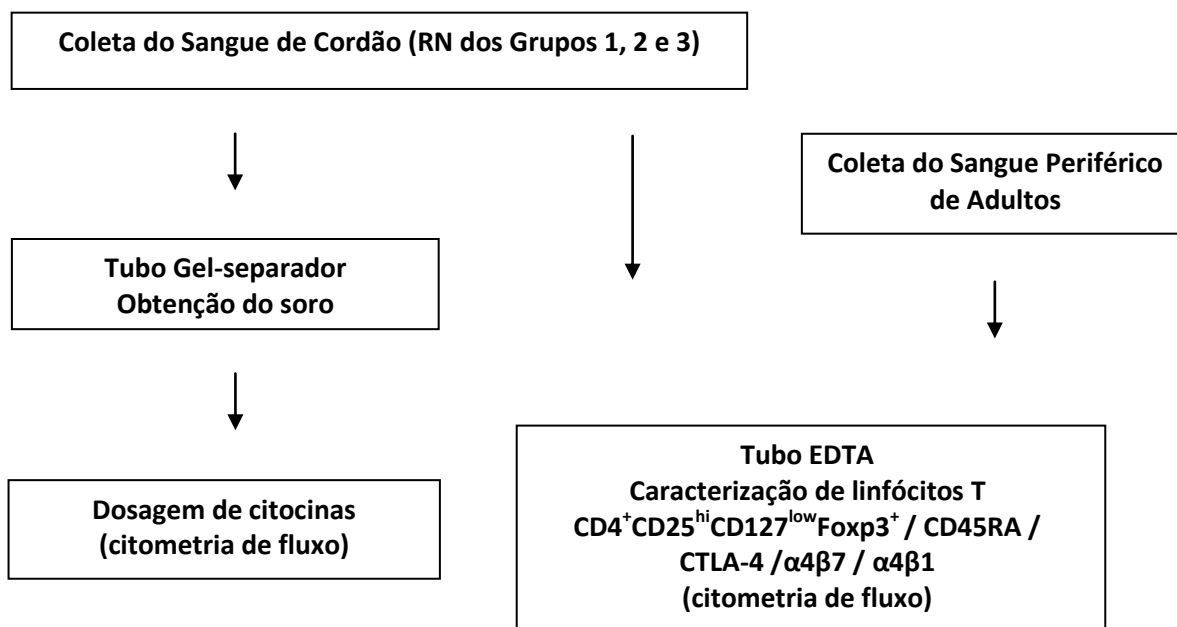
Foram estabelecidos como critérios de exclusão: má formação placentária, recém-nascidos com síndromes genéticas, evidências clínicas ou patológicas de corioamnionite, ou sinais clínicos ou laboratoriais de infecção (marcadores de infecção elevados como proteína C reativa, IL-8, IL-6; amniorrexe prematura > 18 horas e sepsis confirmada por hemocultura positiva).

A coleta foi realizada no Centro Obstétrico do Instituto Central do Hospital das Clínicas e do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Foram coletados de 2 a 5 ml de sangue de cordão umbilical do lado fetal da placenta imediatamente após o parto, por punção venosa do cordão umbilical em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para a avaliação de células T reguladoras por citometria de fluxo e em tubos contendo gel separador para obtenção do soro e análise de citocinas.

### 3.2.2. Obtenção de amostras de sangue periférico de adultos

Foram obtidas amostras de sangue periférico de 26 adultos saudáveis pertencentes ao grupo do laboratório que foram utilizadas para a padronização e controle dos testes realizados. Os critérios de seleção foram: adultos voluntários saudáveis dos sexos masculino e feminino, com reações sorológicas negativas para HIV, HTLV I/II, hepatites B e C, doença de Chagas e sífilis, e ausência de sintomas sugestivos de infecção no período da coleta. A coleta do sangue periférico de adultos foi somente realizada em tubos com EDTA.

### 3.3. Delineamento metodológico



**Quadro 1.** Fluxograma de desenvolvimento do protocolo experimental.

### 3.4. Dosagem de citocinas nas amostras de soro de cordão umbilical

Para auxiliar a identificação de amostras de sangue de cordão umbilical de RN a termo e pré-termo que apresentassem uma possível infecção, em associação com os dados do prontuário foram dosados os níveis basais das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-2, IL-4 e IL-17A nas amostras de soro por citometria de fluxo utilizando-se a técnica de CBA (Cytometric bead array, BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante.

Na técnica de CBA foram usadas amostras de soro adicionadas a um *pool* de *beads* de captura específicas para todas as citocinas citadas. Também foi acrescentado o reagente de detecção conjugado a PE. Esses mesmos reagentes foram adicionados às diluições seriadas dos padrões das citocinas. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente e protegidos da luz, todos os tubos foram lavados e analisados em citômetro de fluxo (LSR II Fortessa, BD Biosciences), de acordo com a intensidade de fluorescência de cada *bead* de captura para cada citocina. Foram salvos 2.000 eventos em P1. As concentrações dessas citocinas nas amostras foram determinadas através da mediana de intensidade de fluorescência e baseadas na curva padrão obtida para cada citocina.

### 3.5. Caracterização fenotípica dos linfócitos T reguladores

Após a coleta, os números absolutos de leucócitos do sangue de cordão umbilical e sangue periférico de adultos foram determinados pela contagem realizada

no contador automático de células (*Sysmex XP-300, Sysmex Corporation, Kobe, Japan*) e  $4 \times 10^6$  leucócitos/mL foram separados em tubo Falcon™ de 50ml.

Para a realização da fenotipagem sanguínea, as hemácias das amostras de sangue colhidas em tubo contendo EDTA foram lisadas com *Lysing Buffer* (BD Pharm Lyse™), incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugadas a 1400 rpm por 5 minutos a 4°C, desprezando-se o sobrenadante. Após o procedimento descrito acima, foram realizadas 2 lavagens com *Staining Buffer* (PBS 7,4 acrescido de 1% de SFB e 0,1% de azida sódica) e centrifugação a 1400 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas no volume de *Staining Buffer* adequado para que em cada poço da microplaca com fundo em “U” contivesse  $2 \times 10^6$  células em 100µl de *Staining Buffer*. Foi feita nova centrifugação, o sobrenadante desprezado e as células ressuspensas em 100 µl de *Staining Buffer*. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais reativos com CD4 marcado com V500 (clone RPA-T4), CD25 marcado com APC-Cy7 (clone M-A251), CD127 marcado com Pacific Blue (clone HIL-7R-M21), CTLA-4 marcado com PE-Cy5 (clone BNI3), CD45RA marcado com FITC (clone L48), α4 marcado com APC (clone 9F10), β1 marcado com PE-Cy5 (clone MAR4), e β7 marcado com PE-Cy5 (clone FIB504), todos obtidos da BD Biosciences. A placa permaneceu incubada por 30 minutos a 4°C e na ausência de luz. Em seguida, 100µl de *Staining Buffer* por poço foram adicionados, a placa centrifugada a 1400 rpm por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante desprezado. Foi feita uma nova lavagem com *Staining Buffer* nas mesmas condições da centrifugação anterior.

Para as marcações intracelulares de Foxp3, após a marcação extracelular foram adicionados 100 µl de *Cytofix/Cytoperm* por poço e a placa foi incubada por 30

minutos a 4°C na ausência de luz. Após este período, a placa foi centrifugada a 1400 rpm por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante desprezado. Foram feitas 2 lavagens com *Staining Buffer* e, após esse processo, foram adicionados 130 µl de PBS acrescido de paraformaldeído a 1% e Tween-20 a 0,5% em cada poço e a placa incubada por 30 minutos em temperatura ambiente na ausência de luz. Foram adicionados 100µl/poço de PBS gelado para parar a reação e a placa foi centrifugada a 1400 rpm por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante desprezado. Foram adicionados 100µl da suspensão do anticorpo anti-Foxp3 marcado com PE (clone PCH101, eBioscience, San Diego, CA, USA). O controle negativo da reação foi realizado com as mesmas marcações extracelulares, porém com o controle isotípico marcado com PE (clone eBR2a, eBioscience) no lugar do anticorpo anti-Foxp3. A placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente no escuro. Nos 30 minutos restantes dessa reação, o anticorpo anti-CTLA-4 foi adicionado para marcação intracelular. Depois de 2 etapas de lavagens, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200 µl de *Staining Buffer*.

Foi realizada a aquisição das amostras no citômetro de fluxo LSR II Fortessa (BD Biosciences) utilizando o software FACSDiva (BD Biosciences). A análise foi feita no *software FlowJo* (TreeStar, Ashland, OR, USA). O *gate* de linfócitos foi feito baseado nas características de tamanho e granulosidade (FSC-A x SSC-H) e a população de células CD4<sup>+</sup> foi determinada dentro desse *gate*. Aproximadamente 20.000 células por amostra foram adquiridas no *gate* de linfócitos CD4<sup>+</sup>. As células T reguladoras, definidas por TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup>Foxp3<sup>+</sup>, foram analisadas no *gate* de CD4<sup>+</sup> e os resultados expressos em porcentagem (frequência) e número absoluto de células Treg. Os números absolutos das populações de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup>Foxp3<sup>+</sup> foram

calculados pela multiplicação da porcentagem indicada na citometria de fluxo e o número absoluto de linfócitos que, por sua vez, foram determinados pelo número de leucócitos totais, avaliados pelo contador automático de células. A média da intensidade de fluorescência (MFI) de FoxP3 dentro da população de células Treg e o MFI de CTLA-4 em células Treg *naïve* (CD45RA<sup>+</sup>) e de memória (CD45RA<sup>-</sup>) foram determinados para todas as amostras.

### **3.6. Análise estatística**

No presente trabalho, além da análise estatística descritiva para calcular médias, medianas e desvios-padrão, para os resultados com distribuição normal, a análise entre dois grupos foi feita pelo teste t de Student não pareado, ou para comparações múltiplas, o ANOVA seguido pelo teste de Tukey; para o restante, foram utilizados os testes não paramétricos Mann-Whitney para as análises entre dois grupos diferentes, e Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn para comparações múltiplas. A análise estatística e gráfica foi realizada no GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, LaJolla, CA, USA). Um limite de significância de 0,05 foi utilizado para todos os testes.



---

*RESULTADOS*

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise do grupo amostral

Os critérios de exclusão das amostras de sangue de cordão umbilical que exibiram sinais de infecção foram definidos pelo estado clínico do neonato, dosagem de proteína C reativa, mães com sinais indicativos de infecção amniótica e trabalho de parto prolongado ou algum outro diagnóstico que poderia ocasionar resultados errôneos e falso-positivos em decorrência de um estado de ativação prévio do sistema imune. As **Tabelas 3, 4, 5, 6, 7 e 8** contêm as informações relevantes dos RN e suas mães.

**Tabela 3** - Análise de prontuário das parturientes e seus respectivos recém-nascidos pré-termo pertencentes ao Grupo 1

RN PT	IG (sem)	Tipo de parto	Peso RN (g)	Apgar (1'/5')	Doença materna	Bolsa rota >18h
1PT	32 <sup>6</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	950	8/10	Presente <sup>1,2,3</sup>	Não
4PT	33 <sup>5</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	1390	9/10	Presente <sup>2</sup>	Não
5PT	30 <sup>0</sup> / <sub>7</sub>	Normal	1500	9/10	Ausente	Não
7PT	32 <sup>5</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	1590	7/8	Ausente	Sim
14PT	33 <sup>2</sup> / <sub>7</sub>	Normal	1965	8/9	Presente <sup>2</sup>	Não
15PT	31 <sup>6</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	1920	8/9	Ausente	Não
20PT	33 <sup>4</sup> / <sub>7</sub>	Normal	1925	4/5	Ausente	Não
25PT	32 <sup>3</sup> / <sub>7</sub>	Normal	2135	6/7	Ausente	Não
26PT	32 <sup>3</sup> / <sub>7</sub>	Normal	2190	8/9	Ausente	Não
27PT	31 <sup>1</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	1790	7/7	Ausente	Não
28PT	31 <sup>3</sup> / <sub>7</sub>	Normal	1230	8/8	Ausente	Não
29PT	32 <sup>3</sup> / <sub>7</sub>	Normal	1550	7/9	Ausente	Não
33PT	32 <sup>1</sup> / <sub>7</sub>	Normal	1735	6/8	Ausente	Não
34PT	32 <sup>3</sup> / <sub>7</sub>	Normal	1805	5/8	Ausente	Não
35PT	31 <sup>1</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	1680	9/9	Presente <sup>4</sup>	Não

RN: recém-nascido; PT: pré-termo; IG: idade gestacional em semanas; g: gramas; <sup>1</sup>: Hipertensão Arterial Crônica; <sup>2</sup>: Doença Hipertensiva Específica da Gestação; <sup>3</sup>: Cardiopatia; <sup>4</sup>: Diabetes Gestacional.

**Tabela 4** - Análise de prontuário das parturientes e seus respectivos recém-nascidos pré-termo pertencentes ao Grupo 2

RN PT	IG (sem)	Tipo de parto	Peso RN (g)	Apgar (1'/5')	Doença materna	Bolsa rota >18h
2PT	34 <sup>5</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	2050	8/9	Presente <sup>2,5</sup>	Sim
3PT	36 <sup>0</sup> / <sub>7</sub>	Normal	2650	9/10	Ausente	Sim
6PT	35 <sup>2</sup> / <sub>7</sub>	Normal	1420	7/9	Ausente	Não
8PT	35 <sup>2</sup> / <sub>7</sub>	Normal	2090	9/10	Presente <sup>1,2,6</sup>	Não
11PT	36 <sup>4</sup> / <sub>7</sub>	Normal	2340	9/10	Presente <sup>3</sup>	Não
12PT	34 <sup>1</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	1960	7/9	Presente <sup>7</sup>	Não
13PT	34 <sup>1</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	1270	7/9	Presente <sup>7</sup>	Não
16PT	34 <sup>5</sup> / <sub>7</sub>	Normal	2550	8/9	Presente <sup>8</sup>	Não
17PT	36 <sup>0</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	2295	3/7	Ausente	Não
18PT	34 <sup>1</sup> / <sub>7</sub>	Normal	2260	9/10	Presente <sup>3</sup>	Não
19PT	36	Normal	3250	9/9	Ausente	Não
22PT	34 <sup>5</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	2070	9/9	Ausente	Não
23PT	34 <sup>5</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	2435	8/9	Ausente	Não
24PT	34 <sup>2</sup> / <sub>7</sub>	Normal	1735	8/9	Ausente	Não
30PT	36	Normal	2660	9/9	Ausente	Não
31PT	36	Normal	2267	8/9	Ausente	Não
32PT	34 <sup>4</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	3170	8/9	Ausente	Não
36PT	35 <sup>6</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	1895	8/9	Ausente	Não

RN: recém-nascido; PT: pré-termo; IG: idade gestacional em semanas; g: gramas;<sup>1</sup>: Hipertensão Arterial Crônica; <sup>2</sup>: Doença Hipertensiva Específica da Gestação; <sup>3</sup>: Cardiopatia; <sup>5</sup>: Asma; <sup>6</sup>: Diabetes Mellitus; <sup>7</sup>: Epilepsia; <sup>8</sup>: Hipertireoidismo.

**Tabela 5** - Análise de prontuário das parturientes e seus respectivos recém-nascidos a termo pertencentes ao Grupo 3

RN T	IG (sem)	Tipo de parto	Peso RN (g)	Apgar (1'/5')	Doença materna	Bolsa rota >18h
3T	39 <sup>0</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	3920	10/10	Ausente	Não
4T	38 <sup>2</sup> / <sub>7</sub>	Normal	3580	8/8	Ausente	Não
5T	38 <sup>5</sup> / <sub>7</sub>	Normal	3327	9/10	Ausente	Não
6T	38 <sup>6</sup> / <sub>7</sub>	Normal	3720	9/10	Ausente	Não
7T	40 <sup>3</sup> / <sub>7</sub>	Normal	3280	9/10	Presente <sup>9</sup>	Não
8T	38 <sup>1</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	3400	10/10	Presente <sup>1,6</sup>	Não

9T	39 <sup>1</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	3210	8/8	Ausente	Não
10T	37 <sup>5</sup> / <sub>7</sub>	Normal	3145	9/10	Ausente	Não
11T	39 <sup>0</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	3290	8/9	Ausente	Não
12T	38 <sup>4</sup> / <sub>7</sub>	Normal	3100	9/10	Ausente	Não
13T	39 <sup>6</sup> / <sub>7</sub>	Normal	3360	10/10	Ausente	Não
14T	37 <sup>0</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	3000	8/9	Presente <sup>3</sup>	Não
15T	40 <sup>1</sup> / <sub>7</sub>	Normal	3490	10/10	Presente <sup>10</sup>	Não
16T	37 <sup>5</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	2850	9/10	Ausente	Não
17T	37 <sup>1</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	4310	8/9	Presente <sup>6,11</sup>	Não
18T	39 <sup>0</sup> / <sub>7</sub>	Normal	2860	8/9	Presente <sup>1</sup>	Não
19T	38 <sup>5</sup> / <sub>7</sub>	Normal	2805	9/10	Ausente	Não
20T	40 <sup>3</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	4555	9/9	Ausente	Não
21T	40 <sup>5</sup> / <sub>7</sub>	Cesárea	3465	8/9	Ausente	Não
22T	41 <sup>1</sup> / <sub>7</sub>	Normal	3550	8/9	Ausente	Não
23T	40 <sup>1</sup> / <sub>7</sub>	Normal	3610	9/9	Presente <sup>4</sup>	Não
24T	39 <sup>1</sup> / <sub>7</sub>	Normal	3580	9/9	Ausente	Não

RN: recém-nascido; T: termo; IG: idade gestacional em semanas; g: gramas; <sup>1</sup>: Hipertensão Arterial Crônica; <sup>3</sup>: Cardiopatia; <sup>6</sup>: Diabetes Mellitus; <sup>9</sup>: Hipertensão Arterial Sistêmica; <sup>10</sup>: Síndrome Nefrótica; <sup>11</sup>: Hipotireoidismo.

**Tabela 6** - Dados dos prontuários das parturientes e seus respectivos recém-nascidos pré-termo do Grupo 1

RN PT	Morbidade Materna			Exame laboratorial (RN)			
	ITU	SGB	<i>E. coli</i>	PCR 1º dia	PCR 2º dia	PCR 3º dia	HMC
1PT	NR	NR	NR	<10	≥10	NR	Negativa
4PT	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
5PT	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
7PT	Ausente	Ausente	NR	NR	<10	NR	Negativa
14PT	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
15PT	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
20PT	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
25PT	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
26PT	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
27PT	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
28PT	Ausente	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR

<b>29PT</b>	Ausente	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR
<b>33PT</b>	Ausente	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR
<b>34PT</b>	Ausente	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR
<b>35PT</b>	Ausente	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR

NR: recém-nascido; PT: pré-termo; ITU: infecção do trato urinário; SBG: *Streptococcus* do grupo B; *E. coli*: *Escherichia coli*; PCR: proteína C reativa; HMC: Hemocultura; NR: não realizada.

**Tabela 7** - Dados dos prontuários das parturientes e seus respectivos recém-nascidos pré-termo do Grupo 2

RN PT	Morbidade Materna			Exame laboratorial (RN)			
	ITU	SBG	<i>E. coli</i>	PCR 1º dia	PCR 2º dia	PCR 3º dia	HMC
<b>2PT</b>	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<b>3PT</b>	Ausente	NR	NR	<10	NR	NR	Negativa
<b>6PT</b>	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<b>8PT</b>	Ausente	Ausente	NR	<10	≥10	≥10	Negativa
<b>11PT</b>	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<b>12PT</b>	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<b>13PT</b>	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<b>16PT</b>	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<b>17PT</b>	Ausente	Ausente	NR	<10	<10	NR	Negativa
<b>18PT</b>	Ausente	Ausente	NR	<10	<10	NR	Negativa
<b>19PT</b>	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<b>22PT</b>	Ausente	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR
<b>23PT</b>	Ausente	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR
<b>24PT</b>	Ausente	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR
<b>30PT</b>	Ausente	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR
<b>31PT</b>	Ausente	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR
<b>32PT</b>	Ausente	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR
<b>36PT</b>	Ausente	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR

NR: recém-nascido; PT: pré-termo; ITU: infecção do trato urinário; SBG: *Streptococcus* do grupo B; *E. coli*: *Escherichia coli*; PCR: proteína C reativa; HMC: Hemocultura; NR: não realizada.

**Tabela 8** - Dados dos prontuários das parturientes e seus respectivos recém-nascidos a termo

RN T	Morbidade Materna			Exame laboratorial (RN)			
	ITU	SGB	<i>E. coli</i>	PCR 1º dia	PCR 2º dia	PCR 3º dia	HMC
3T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
4T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
5T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
6T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
7T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
8T	Negativo	Positivo	NR	NR	NR	NR	NR
9T	Negativo	NR	NR	NR	NR	NR	NR
10T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
11T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
12T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
13T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
14T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
15T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
16T	NR	Positivo	NR	NR	NR	NR	NR
17T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
18T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Negativa
19T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
20T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
21T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
22T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
23T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
24T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

RN: recém-nascido; T: termo; ITU: infecção do trato urinário; SGB: *Streptococcus* do grupo B; *E. coli*: *Escherichia coli*; PCR: proteína C reativa; HMC: Hemocultura; NR: não realizada.

A **Tabela 9**, a seguir, mostra as características demográficas e contagem de leucócitos totais dos 54 RN que foram utilizados no presente trabalho e divididos em 3 grupos: Grupo 1 ( $\geq 30$  e  $< 34$  semanas), Grupo 2 ( $\geq 34$  e  $< 37$  semanas) e Grupo 3 ( $\geq 37$  semanas). Esses grupos foram divididos de acordo com a classificação proposta por

Engle (2006) e foram significativamente diferentes em relação à idade gestacional, peso e Apgar em 1 minuto.

**Tabela 9** - Características demográficas e contagem de leucócitos totais dos grupos de recém-nascidos

	Grupo 1 (G1)	Grupo 2 (G2)	Grupo 3 (G3)	Valor de <i>p</i>		
	[N=15]	[N=19]	[N=20]	G1 x G2	G1 x G3	G2 x G3
<b>Peso (g)<sup>a</sup></b>	1690 ± 335,1	2268 ± 513,1	3445 ± 451,9	<i>p</i> <0,001	<i>p</i> <0,0001	<i>p</i> <0,0001
<b>IG (semanas)<sup>a</sup></b>	32 <sup>2</sup> / <sub>7</sub> ± 1 <sup>0</sup> / <sub>7</sub>	35 <sup>2</sup> / <sub>7</sub> ± 0 <sup>6</sup> / <sub>7</sub>	39 <sup>0</sup> / <sub>7</sub> ± 1 <sup>1</sup> / <sub>7</sub>	<i>p</i> <0,0001	<i>p</i> <0,0001	<i>p</i> <0,0001
<b>Apgar 1 min</b>	7 ± 1	8 ± 1	9 ± 1	<i>p</i> <0,05	<i>p</i> <0,01	<i>p</i> <0,05
<b>Apgar 5 min</b>	8 ± 1	9 ± 1	9 ± 1	<i>p</i> <0,05	<i>p</i> <0,05	-
<b>Parto Normal</b>	9 (60)/	11 (57,9)/	12 (60)/	-	-	-
<b>/ Cesárea<sup>b</sup></b>	6 (40)	8 (42,1)	8 (40)	-	-	-
<b>Número de Leucócitos<sup>a</sup></b>	10,6 ± 3,9	9,9 ± 2,3	14,2 ± 4,8	-	<i>p</i> <0,05	<i>p</i> <0,01

<sup>a</sup>Média ± desvio padrão

<sup>b</sup>Número (porcentagem)

#### 4.2. Dosagem de citocinas nas amostras de soro de cordão umbilical

Os resultados das dosagens de citocinas nas amostras de soro de cordão umbilical estão demonstrados nas **Tabelas 10, 11 e 12**.

**Tabela 10** - Dosagem de citocinas nas amostras de soro de recém-nascidos pré-termo do Grupo 1

Citocinas (pg/ml)									
	IL-8	IL-6	IL-12	IL-1 $\beta$	IL-10	TNF- $\alpha$	IL-2	IL-4	IL-17A
1PT	96,1	9,3	0,3	1,3	0,7	0,4	2,8	0,3	ND
4PT	39,5	17,8	0,1	0,9	1,0	0,8	ND	ND	ND
5PT	32,8	20,4	0,4	0,6	1,9	1,4	ND	0,1	18,2
7PT	17,0	10,8	0,5	0,4	4,1	ND	ND	0,3	65,5
14PT	26,7	2,2	ND	ND	0,8	0,6	1,2	1,0	12,9
15PT	12,6	1,6	0,7	ND	0,3	0,3	1,4	ND	ND
20PT	5000	5000	0,2	165,2	12,7	11,0	4,3	4,6	16,7
25PT	5000	268,0	1,2	238,6	3,6	10,3	3,2	4,5	122,3
26PT	5000	226,1	0,7	258,6	3,9	1,4	3,0	4,0	164,0
27PT	88,7	3,0	1,3	0,7	1,8	0,95	2,3	1,4	126,3
28PT	959,6	526,7	ND	11,6	4,5	1,0	1,8	2,5	141,0
29PT	787,4	292,6	2,5	1,7	3,5	1,3	2,6	2,2	125,1
33PT	441,4	305,6	3,7	4,6	9,1	1,2	3,3	3,5	223,5
34PT	200,8	36,3	2,2	19,6	2,7	1,4	1,8	2,2	123,9
35PT	482,7	599,7	1,2	8,8	1,8	1,3	0,3	0,6	ND
Med	64,1	28,3	0,7	1,7	2,7	1,2	1,8	1,4	65,5
P	24,3-261,0	7,7-295,9	0,2-1,3	0,6-19,6	1,0-4,1	0,6-1,4	0,3-3,0	0,3-3,5	0-126,3

PT: pré-termo; ND: não detectado; NR: não realizado; Med: mediana; P: percentis 25% e 75%.

**Tabela 11** - Dosagem de citocinas nas amostras de soro de recém-nascidos pré-termo do Grupo 2

Citocinas (pg/ml)									
	IL-8	IL-6	IL-12	IL-1 $\beta$	IL-10	TNF- $\alpha$	IL-2	IL-4	IL-17A
2PT	78,5	13,6	0,5	4,3	1,2	1,2	ND	ND	ND
3PT	14,5	4,0	0,3	0,5	0,3	0,1	NR	NR	NR
6PT	30,8	7,5	0,3	0,8	0,1	0,1	NR	NR	NR
8PT	16,0	2,6	0,1	1,8	1,1	ND	1,9	2,4	21,9
11PT	1835,7	50,3	0,4	6,7	2,4	53,2	1,4	1,9	10,3
12PT	16,0	3,4	ND	ND	1,3	0,4	3,1	2,0	10,9
13PT	24,6	3,6	0,7	ND	1,5	ND	ND	ND	ND
16PT	18,6	4,3	1,2	6,1	0,5	0,8	ND	0,6	4,9
17PT	21,3	2,1	1,1	0,4	ND	ND	0,4	1,0	45,7
18PT	21,2	11,0	0,8	0,7	0,7	0,2	0,4	0,2	25,8
19PT	22,7	16,3	ND	0,5	5,0	2,05	3,5	3,3	11,4
21PT	20,0	5,1	0,7	1,1	3,4	2,0	4,3	4,3	19,3
22PT	47,1	9,0	0,5	0,7	3,4	1,4	3,1	2,6	15,0



<b>23PT</b>	35,2	5,3	0,2	0,1	3,3	1,0	4,0	3,8	94,4
<b>24PT</b>	4496,2	22,0	0,5	52,4	2,9	7,4	3,3	3,2	157,2
<b>30PT</b>	10,9	2,6	0,4	1,9	2,1	1,1	2,5	2,7	12,05
<b>31PT</b>	16,9	9,1	1,6	2,3	2,1	1,2	3,1	3,6	11,7
<b>32PT</b>	16,8	6,1	0,7	2,8	2,7	2,1	3,3	3,6	16,7
<b>36PT</b>	20,5	12,7	1,6	0,2	1,4	0,4	ND	ND	ND
<b>Med</b>	21,1	6,1	0,5	0,8	1,5	1,0	2,5	2,4	12,0
<b>P</b>	16,8-35,2	3,6-12,7	0,3-0,8	0,4-2,8	0,7-2,9	0,1-2,0	0,2-3,3	0,4-3,4	7,6-23,8

PT: pré-termo; ND: não detectado; NR: não realizado; Med: mediana; P: percentis 25% e 75%.

**Tabela 12** - Dosagem de citocinas nas amostras de soro de recém-nascidos a termo do Grupo 3

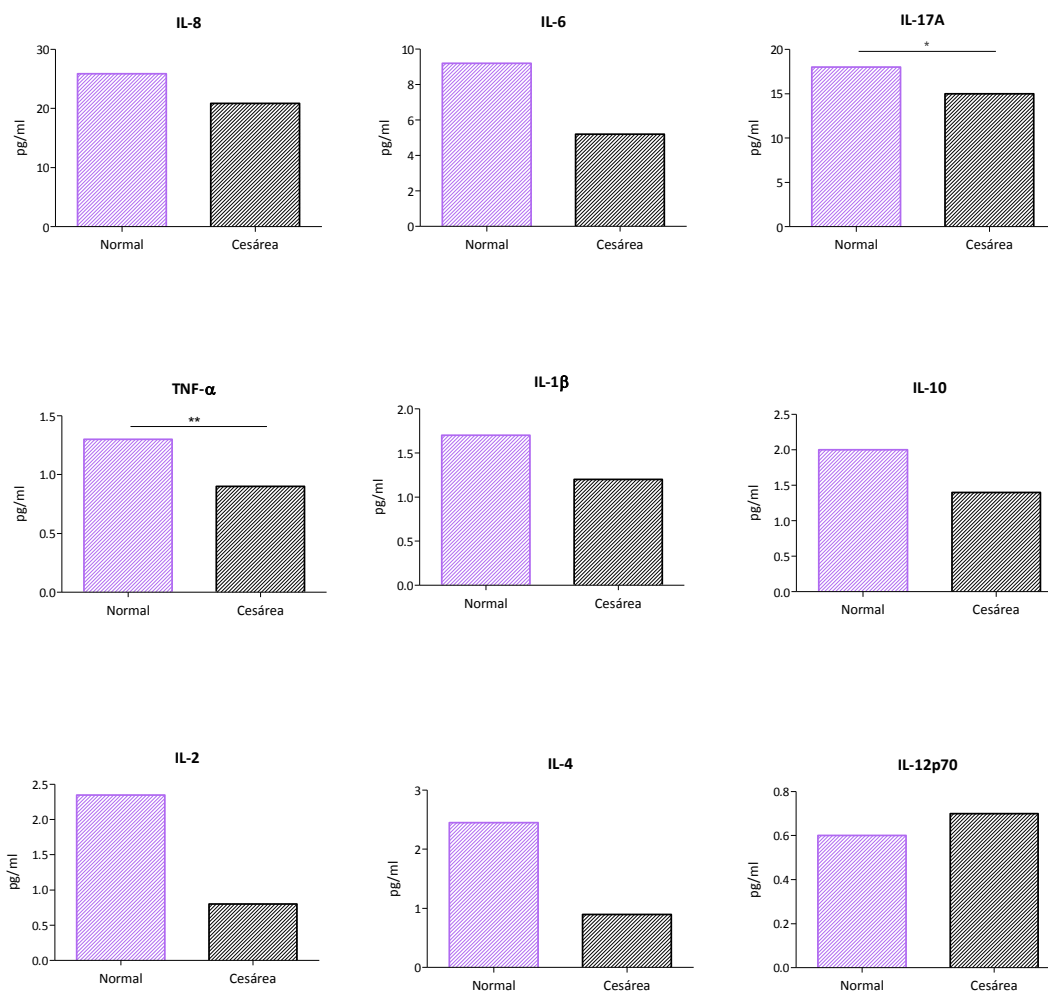
	Citocinas (pg/ml)								
	IL-8	IL-6	IL-12	IL-1 $\beta$	IL-10	TNF- $\alpha$	IL-2	IL-4	IL-17A
<b>3T</b>	92,9	4,1	1,0	1,6	1,7	2,9	1,2	0,8	8,3
<b>4T</b>	52,8	1,0	1,3	10,0	1,0	1,9	4,0	1,9	5,6
<b>5T</b>	119,6	9,3	ND	0,3	0,7	3,9	2,2	1,7	19,4
<b>6T</b>	210,7	4,1	ND	4,2	0,4	1,6	2,7	3,2	11,4
<b>7T</b>	25,0	4,7	2,0	2,7	0,2	0,8	2,9	3,2	16,0
<b>8T</b>	363,9	1,7	ND	2,4	0,8	6,8	NR	NR	NR
<b>9T</b>	16,0	13,1	ND	1,6	0,9	ND	ND	ND	31,2
<b>10T</b>	19,2	7,0	1,8	1,4	0,6	1,3	2,9	3,2	16,0
<b>11T</b>	16,7	2,7	0,3	1,8	1,4	1,5	2,9	4,1	13,0
<b>12T</b>	16,2	4,9	0,5	1,2	1,0	1,9	0,1	0,4	ND
<b>13T</b>	20,9	16,0	0,9	0,9	0,8	0,6	3,2	3,7	17,3
<b>14T</b>	16,8	4,4	1,4	1,3	0,9	1,0	3,3	4,5	18,0
<b>15T</b>	18,1	4,3	0,3	1,2	41,2	1,9	2,5	3,1	100,4
<b>16T</b>	19,8	39,2	1,6	0,9	1,9	0,2	NR	NR	NR
<b>17T</b>	24,7	5,2	0,2	0,6	0,5	0,4	0,1	0,2	22,5
<b>18T</b>	17,5	1,0	0,7	1,2	1,1	1,7	3,3	4,9	155,7
<b>19T</b>	24,7	5,2	0,2	0,6	0,5	0,4	ND	ND	2,4
<b>20T</b>	9,5	1,3	0,9	0,4	1,4	0,4	ND	0,4	ND
<b>21T</b>	13,8	5,2	1,3	3,4	3,0	2,3	0,2	ND	16,2
<b>22T</b>	17,1	16,9	1,5	1,7	2,1	1,1	0,2	0,2	50,5
<b>23T</b>	12,6	14,0	ND	7,6	4,5	0,9	0,7	1,6	3,5
<b>24T</b>	10,8	4,9	0,7	1,8	2,7	1,0	ND	0,7	31,8
<b>Med</b>	17,8	4,9	0,7	1,5	1,0	1,2	1,7	1,6	16,1
<b>P</b>	16,0-24,9	4,1-8,7	0,2-1,3	1,0-2,4	0,6-2,0	0,6-1,9	0,1-2,9	0,2-3,2	6,3-29,0

T: termo; ND: não detectado; NR: não realizado; Med: mediana; P: percentis 25% e 75%.

As amostras marcadas em azul e itálico indicam que estas foram excluídas. Apesar de não apresentarem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, foi comprovada infecção por *Streptococcus* do grupo B no momento do parto e, portanto, as amostras 8T e 16T foram excluídas da nossa casuística, a fim de evitar possíveis interferências nas análises e resultados posteriores. Algumas amostras, principalmente do Grupo 1, apresentaram níveis mais altos das citocinas IL-8 e IL-6 em relação as outras amostras, porém, como não foram encontrados indícios de infecção nos prontuários maternos e dos RN, essas amostras foram incluídas nas análises.

A **Figura 1**, a seguir, mostra a relação entre os níveis de citocinas e o tipo de parto. Os dados estão apresentados pela mediana das amostras agrupadas por tipo de parto, normal ou cesárea.

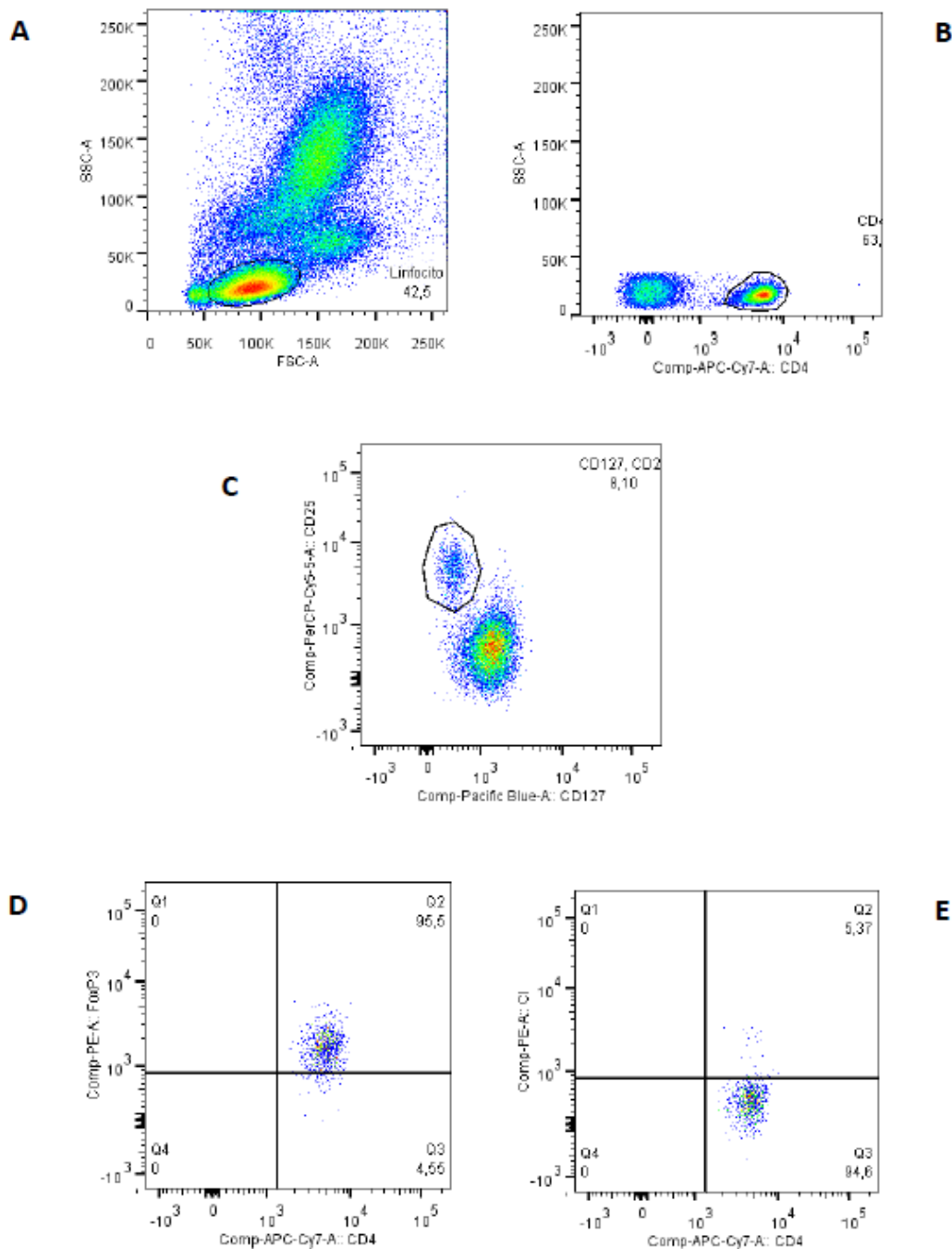
Nossos dados mostram níveis significativamente mais elevados das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-17A, citocina predominantemente secretada pelas células Th17 que apresentam inúmeras funções imunomoduladoras e induzem a produção da IL-1, IL-6, TNF e quimiocinas (HARRINGTON *et al.*, 2005; ANNUNZIATO *et al.*, 2008) no parto normal comparado à cesárea. As concentrações de IL-8, IL-6 e IL-10 não dependeram do tipo de parto e os RN de parto vaginal (n = 32) apresentaram concentrações equivalentes dessas citocinas quando comparados com os nascidos por cesárea (n = 22), embora uma tendência a concentrações mais elevadas de IL-8 e IL-6 foi encontrada no parto vaginal ( $p = 0,0535$  e  $p = 0,0538$ , respectivamente).



**Figura 1** - Concentrações séricas de IL-8, IL-6, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-2, IL-4 e IL-12p70 em amostras de soro provenientes do cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo e a termo saudáveis agrupados por tipo de parto. Parto normal (n = 32); Cesárea (n = 22). \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ .

#### 4.3. Caracterização fenotípica das células T reguladoras nas amostras de sangue de cordão umbilical

A caracterização dos linfócitos T reguladores foi realizada com 15 amostras de sangue de cordão umbilical de RN do Grupo 1, 19 amostras do Grupo 2, 20 amostras do Grupo 3 e 26 amostras de sangue periférico de adultos. A fenotipagem das amostras foi feita por citometria de fluxo e o procedimento para analisá-las, conforme os marcadores de interesse, está descrito na **Figura 2**.



**Figura 2** - Estratégia de *gate* para a análise de células Treg no sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo e a termo saudáveis e no sangue periférico de adultos. As células TCD4<sup>+</sup> foram identificadas no *gate* de CD4<sup>bright</sup> (**B**) e dentro da população total de linfócitos com base no tamanho (*forward scatter*, FSC) e granulosidade celular (*side scatter*, SSC) (**A**). As células Treg foram identificadas dentro do *gate* CD4<sup>+</sup> com base na elevada expressão de CD25 e a baixa ou nula expressão de CD127 (**C**). **D**: Os linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup> foram considerados Treg baseados na marcação intracelular do fator de transcrição *forkhead box P3* (Foxp3) (**Q2**); **E**: O controle negativo foi constituído pela mesma amostra incubada com os mesmos anticorpos extracelulares e o controle isotípico de IgG anti-mouse marcado com PE (**Q2**).

Na **Tabela 13** estão representados os resultados do número absoluto e da frequência de linfócitos totais, de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e de linfócitos Treg nas amostras de sangue de cordão umbilical dos RN dos Grupos 1, 2 e 3 e de sangue de adultos, após a determinação da significância estatística entre os grupos de estudo, por meio do teste ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

Os resultados mostraram que as frequências de linfócitos totais e de células T *helper* CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> foram significativamente mais elevadas em ambos os grupos de pré-termo em comparação com o grupo de adultos e não houve diferenças estatisticamente significativas quando comparados com os nascidos a termo, embora uma tendência para uma frequência diminuída da população de linfócitos totais no grupo a termo foi evidenciada.

Quando os números absolutos dessas células foram analisados, números estatisticamente mais elevados de linfócitos totais e de células T *helper* foram encontrados nos três grupos de RN em comparação com os adultos (ANOVA,  $p < 0,0001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente).

A **Tabela 13** também mostra a frequência e número de células Treg dentro da população TCD4<sup>+</sup>. Uma maior frequência de células Treg no sangue do cordão umbilical dos RN do Grupo 1 foi detectada quando comparados aos RN do Grupo 2 ( $p < 0,05$ ) e aos nascidos a termo ( $p < 0,0001$ ). O Grupo 2, por sua vez, mostrou uma frequência significativamente aumentada, quando comparado ao Grupo 3 ( $p < 0,01$ ) e este último grupo mostrou uma frequência mais elevada do que os adultos ( $p < 0,05$ ). Além disso, os adultos apresentaram porcentagens significativamente reduzidas quando comparados com ambos os grupos de RN pré-termo ( $p < 0,0001$ ).

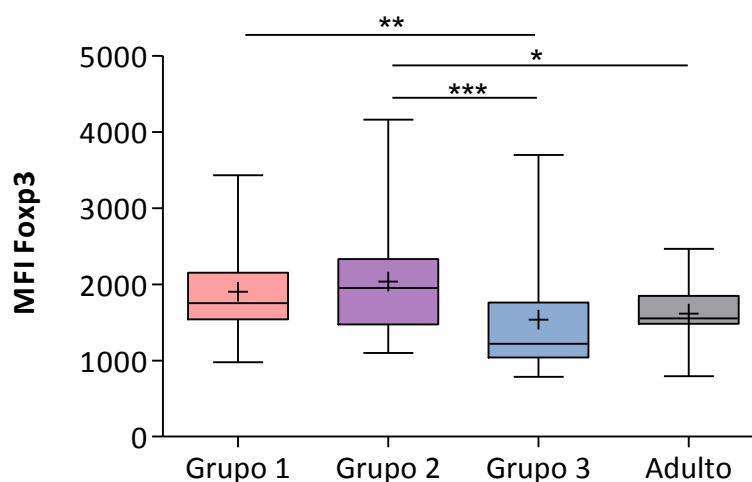
**Tabela 13** - Análise da média do número absoluto e da frequência de linfócitos totais, de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup>Foxp3<sup>+</sup> nas amostras de sangue de cordão dos recém-nascidos dos Grupos 1, 2 e 3 e de sangue de adultos

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Adulto	Valor de p		
	[N=15]	[N=19]	[N=20]	[N=26]	Média ± DP		
					G1 x G2	G1 x G3	G2 x G3
<b>Linfócitos</b>							
Número (/μl)	4416 ± 1933 <sup>†</sup>	4193 ± 1306 <sup>†</sup>	4302 ± 1231 <sup>†</sup>	2419 ± 913	-	-	-
Frequência (%)	43,9 ± 15,5 <sup>*</sup>	42,7 ± 11,1 <sup>*</sup>	34,8 ± 13,4	33,7 ± 10,6	-	-	-
<b>Linfócitos TCD4<sup>+</sup></b>							
Número (/μl)	1972 ± 1125 <sup>†</sup>	1709 ± 621 <sup>†</sup>	1767 ± 656 <sup>†</sup>	848 ± 338	-	-	-
Frequência (%)	43,8 ± 13,6 <sup>*</sup>	44,6 ± 12,6 <sup>ξ</sup>	40,0 ± 11,1	36,5 ± 5,4	-	-	-
<b>Linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup>Foxp3<sup>+</sup></b>							
Número (/μl)	77 ± 35 <sup>†</sup>	69 ± 39 <sup>†</sup>	44 ± 24 <sup>†</sup>	12 ± 9	-	p<0,01	p<0,05
Frequência (%)	5,0 ± 1,5 <sup>†</sup>	3,8 ± 1,7 <sup>†</sup>	2,4 ± 1,1 <sup>*</sup>	1,6 ± 1,0	p<0,05	p<0,0001	p<0,01

Estatisticamente diferente do grupo de adultos (<sup>†</sup>p < 0,0001; <sup>ξ</sup>p < 0,01; <sup>\*</sup>p < 0,05).

Devido ao elevado número de leucócitos, uma característica do período neonatal, números aumentados de células Treg foram encontrados nos três grupos de RN em comparação com os adultos. Observou-se também maior número de células Treg nos Grupos 1 ( $p < 0,01$ ) e 2 ( $p < 0,05$ ) em comparação ao Grupo 3 (Tabela 13).

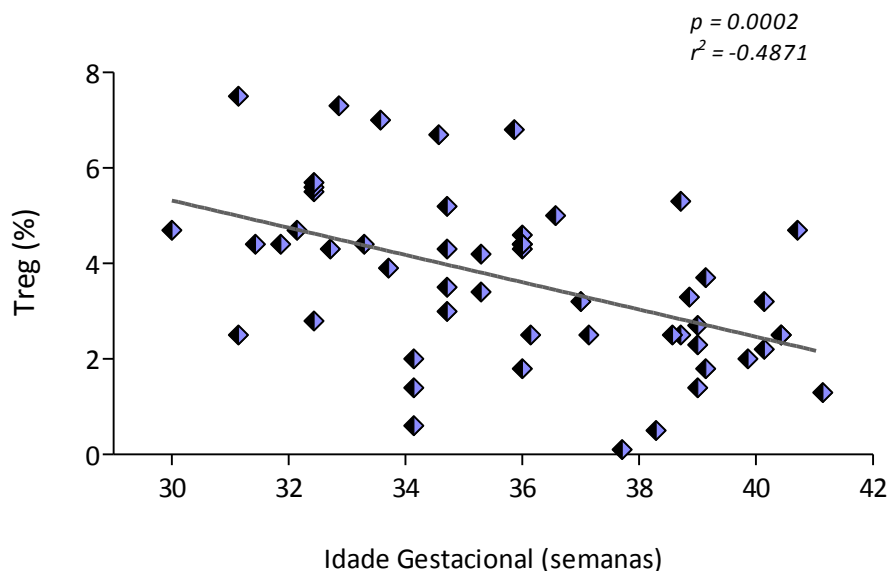
A análise da média da intensidade de fluorescência de Foxp3 pode ser observada na Figura 3 e os resultados seguiram a mesma tendência em relação à proporção de células Treg. O Grupo 3 apresentou um MFI de Foxp3 significativamente menor que ambos os grupos de RN pré-termo ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) e equivalente ao dos adultos, e o Grupo 2 mostrou um MFI significativamente maior em relação aos adultos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3** - Mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de *forkhead box P3* (Foxp3) em células Treg  $CD4^+CD25^{hi}CD127^loFoxp3^+$  do sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo (Grupos 1 e 2) e a termo (Grupo 3) e de sangue de adultos, como controles. Os valores de  $p$  foram calculados pelo teste U de Mann-Whitney. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

A análise da correlação entre a frequência de linfócitos T reguladores e a idade gestacional dos RN está representada na Figura 4, onde pode ser observada uma

correlação inversa entre os parâmetros analisados, ou seja, quanto maior a idade gestacional, menor a frequência de linfócitos Treg F<sub>oxp3</sub><sup>+</sup>.



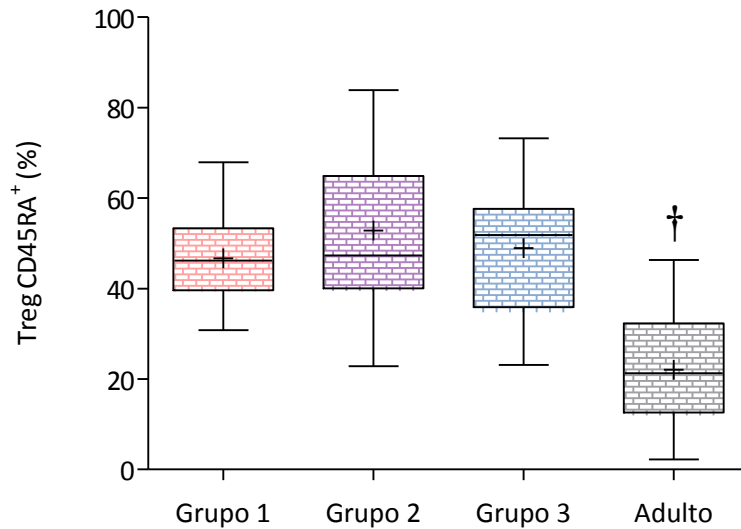
**Figura 4** - Porcentagem de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup>F<sub>oxp3</sub><sup>+</sup> em amostras de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos distribuídas de acordo com idade gestacional. Os recém-nascidos apresentaram idade gestacional variando de 30 a 41 semanas de gestação. A correlação de Pearson e análise de regressão linear confirmou uma correlação inversa entre as porcentagens de Treg e a idade gestacional.

#### 4.4. Expressão de CD45RA em células Treg neonatais

Na **Figura 5**, está representada a média da frequência de células Treg expressando o marcador de fenótipo *naïve*, CD45RA. A análise da frequência desse marcador resultou em uma média  $\pm$  desvio padrão de  $46,7 \pm 9,5$  para o Grupo 1; Grupo 2:  $52,8 \pm 17,4$ ; Grupo 3:  $48,9 \pm 13,9$  e Adulto  $22,1 \pm 12,2$  do total de linfócitos Treg.

Os resultados revelaram que os 3 grupos de RN apresentam uma frequência significativamente maior da expressão de CD45RA quando comparados aos adultos. A maior expressão desse marcador indica uma maior frequência de células fenotipicamente *naïve* dentro da população de linfócitos T reguladores neonatais.

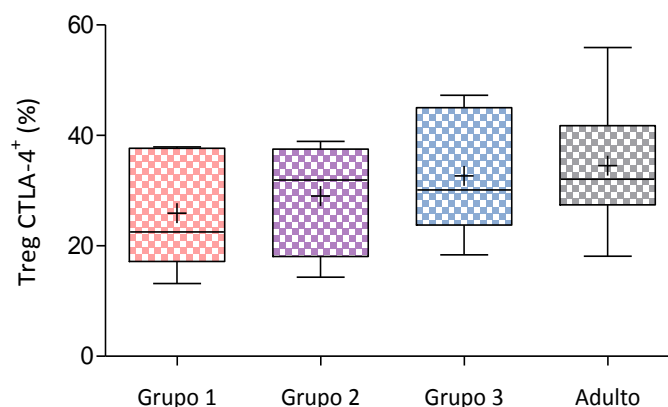




**Figura 5** - Porcentagem de células Treg  $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}Foxp3^+CD45RA^+$  nas amostras de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo (Grupos 1 e 2) e a termo (Grupo 3) e de sangue de adultos, como controles. Os valores de  $p$  foram calculados pelo teste t de Student não pareado. †:  $p < 0,0001$ .

#### 4.5. Expressão de CTLA-4 em células Treg neonatais

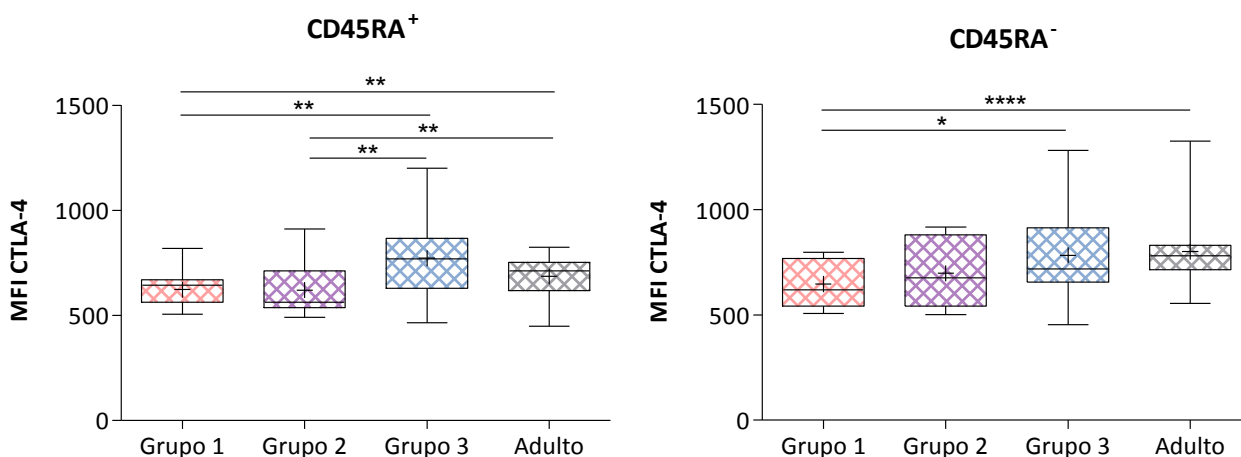
Em decorrência da menor expressão de CTLA-4 na superfície das células Treg, além da marcação extracelular desta molécula, foi realizada a marcação intracelular. A **Figura 6** descreve a mediana da frequência de células T  $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}Foxp3^+$  expressando intra e extracelularmente o marcador característico de linfócitos Treg, CTLA-4. A análise da frequência desse marcador resultou em uma média  $\pm$  desvio padrão de  $25,9 \pm 10,6$  para o Grupo 1; Grupo 2:  $29,0 \pm 9,8$ ; Grupo 3:  $32,6 \pm 10,8$  e grupo de adultos:  $34,5 \pm 10,3$  do total de linfócitos Treg, não resultando em diferenças estatísticas entre os grupos, apesar de ter sido observado um aumento da frequência de acordo com a idade gestacional.



**Figura 6** - Frequência de células Treg  $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}Foxp3^+CTLA-4^+$  nas amostras de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo (Grupos 1 e 2) e a termo (Grupo 3) e de sangue de adultos, como controles.

Estes resultados nos levou a pesquisar a expressão de CTLA-4, representada pela análise do MFI desse marcador, em populações de células Treg *naïve* ( $CD45RA^+$ ) e de memória ( $CD45RA^-$ ), analisadas separadamente como duas populações diferentes, as quais podemos observar na **Figura 7**. De fato, a expressão de CTLA-4 na população de Treg *naïve*  $CD45RA^+$  foi significativamente menor nos RN pré-termo dos Grupos 1 e 2, quando comparados aos nascidos a termo e aos adultos. Em relação à população de células Treg de memória ( $CD45RA^-$ ), também observou-se uma diminuição significativa da expressão de CTLA-4 apenas no Grupo 1 quando comparado aos grupos de RN a termo e adultos.

Interessante notar que a comparação da expressão de CTLA-4 nas populações de Treg  $CD45RA^+$  e  $CD45RA^-$  dentro de cada grupo revelou maior expressão de CTLA-4 nas células Treg de memória,  $CD45RA^-$ , apenas no grupo de adultos ( $p < 0,001$ ) e expressão similar de CTLA-4 quando células Treg  $CD45RA^+$  e  $CD45RA^-$  foram comparadas dentro de cada grupo neonatal.

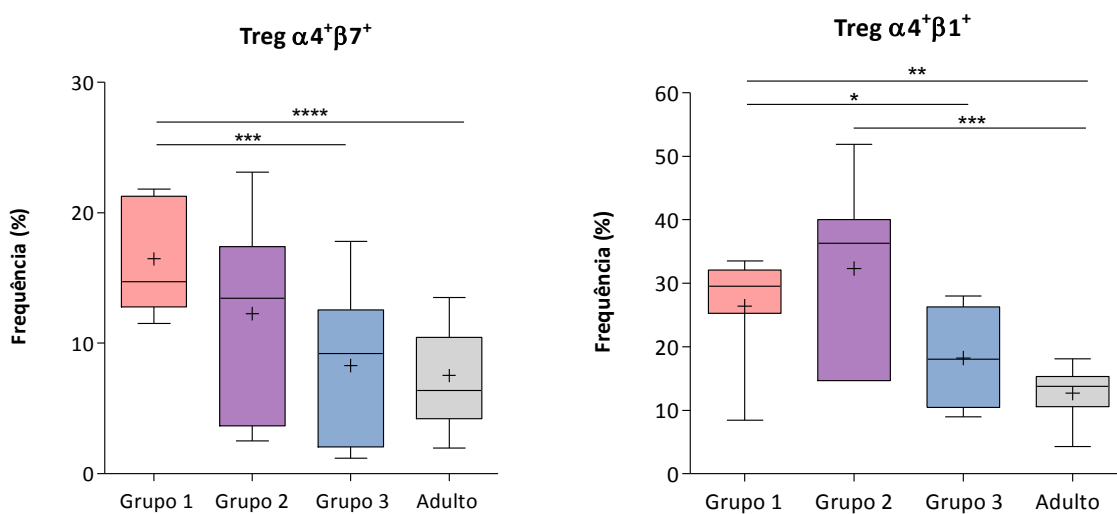


**Figura 7** - Mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de CTLA-4 expresso em células Treg  $CD4^+CD25^{hi}CD127^loFoxp3^+naïve$  ( $CD45RA^+$ ) e de memória ( $CD45RA^-$ ) das amostras de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo (Grupos 1 e 2) e a termo (Grupo 3) e de sangue de adultos, como controles. Os valores de  $p$  foram calculados pelo teste de Mann-Whitney. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ .

#### 4.6. Expressão dos marcadores de *homing* $\alpha4\beta7$ e $\alpha4\beta1$ em células Treg neonatais

Em seguida, foi realizada a análise das células Treg de RN pré-termo e a termo quanto ao perfil de expressão dos marcadores de migração celular  $\alpha4\beta7$  e  $\alpha4\beta1$ . Na **Figura 8**, está representada a frequência de células Treg neonatais expressando os receptores de *homing*  $\alpha4\beta7$  e  $\alpha4\beta1$ . As frequências de células Treg  $\alpha4\beta7^+$  foram maiores em ambos os grupos de RN pré-termo, mas significativamente diferente apenas no Grupo 1 quando comparado aos RN a termo e adultos. As frequências de células Treg  $\alpha4\beta1^+$  seguiram a mesma tendência, mas foi ainda verificada uma maior frequência destas células no Grupo 2 quando comparado aos adultos.

A análise de correlação de Pearson revelou uma tendência para uma correlação inversa entre o percentual de células Treg  $\alpha 4\beta 7^+$  e a idade gestacional ( $r = -0,2468$ ,  $p = 0,0573$ ), entretanto, não foi detectada nenhuma correlação significativa entre o percentual de células Treg  $\alpha 4\beta 1^+$  e a idade gestacional.



**Figura 8** - Células Treg  $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}Foxp3^+$  expressando os receptores de *homing* para a mucosa intestinal  $\alpha 4\beta 7$  e  $\alpha 4\beta 1$  nas amostras de sangue de cordão dos RN dos Grupos 1, 2 e 3 e de sangue de adultos. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ .

---

*DISCUSSÃO*

## 5. DISCUSSÃO

O estabelecimento de valores normais de referência de células T reguladoras em recém-nascidos e como elas são numérica e proporcionalmente afetadas pela prematuridade fornece a base para posteriores investigações sobre a atividade funcional dessas células. Vários autores descrevem os valores de referência para as subpopulações de leucócitos de RN a termo saudáveis (VAN GENT *et al.*, 2009), porém poucos analisaram os mesmos parâmetros em RN pré-termo (QUINELLO *et al.*, 2014; CORREA-ROCHA *et al.*, 2012).

Nosso trabalho evidenciou diferenças significativas entre os grupos de RN quando os parâmetros peso e idade gestacional foram comparados. Esses dados mostram a importância da divisão detalhada dos RN em diferentes grupos, já que essas diferenças também podem ser vistas na análise dos resultados de imunofenotipagem, assim como no número de leucócitos circulantes, provavelmente refletindo fases dinâmicas de desenvolvimento, onde a diferença de apenas alguns dias no período gestacional já mostra um diferente grau de maturação (MILCIC, 2010). Na análise da frequência de células TCD4<sup>+</sup>, a qual exclui a influência da leucocitose característica desse grupo etário, ambos os grupos de RN pré-termo mostraram altas porcentagens dessas células quando comparados com os adultos e possuem frequências equivalentes aos RN a termo, apesar deste grupo apresentar uma tendência a uma menor porcentagem dessa população quando comparado aos grupos de pré-termo. Esses resultados são consistentes com dados recentes sugerindo que

esses RN a termo, que estão prontos para deixar o ambiente protetor do útero, apresentam a necessidade de mobilizar um maior número de células para os linfonodos periféricos a fim de responder aos possíveis agentes infecciosos (PEOPLES *et al.*, 2009).

Devido ao papel fisiológico das citocinas como marcadoras de infecção, a avaliação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e IL-8 e citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, mostrou ser potencialmente útil para o diagnóstico precoce de sepse (NG; LAM, 2010). A análise das citocinas pró e anti-inflamatórias obtidas das amostras de sangue de cordão foram consideradas dentro da normalidade para todos os neonatos incluídos em nossa casuística (PROKESOVÁ *et al.*, 2006; RIZOS *et al.*, 2005; SANTANA *et al.*, 2001). Rizos e colaboradores (2005) encontraram níveis mais elevados dessas citocinas no parto normal em comparação à cesárea, pois a liberação de citocinas e mediadores inflamatórios pode ocorrer em outras situações não patológicas, como a gravidez e o parto, e não apenas em infecções. A relação estabelecida entre os níveis de citocinas inflamatórias com tipo de parto mostrou que o parto vaginal está fortemente ligado à estimulação de uma rede de citocinas, refletindo diretamente nos altos níveis encontrados no soro materno e no soro de cordão umbilical durante o parto, bem como nas amostras neonatais durante os primeiros dias de vida. Esses resultados reforçam a sugestão de que o próprio parto a termo, sendo um processo inflamatório, promoveria a ativação da resposta imune neonatal, ocasionando um aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias durante os primeiros dias de vida. Reforçando ainda esta ideia, Rizos e colaboradores (2005) constataram a presença dos receptores solúveis de citocinas, sIL-6R, sTNFR1 e

sTNFR<sub>II</sub>, em concentrações elevadas nas amostras neonatais, o que denota um mecanismo regulatório de proteção para a mãe e para o neonato contra a função sistêmica das citocinas durante o trabalho de parto e na vida neonatal precoce. No presente trabalho, a análise da comparação das concentrações das citocinas IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10, separadas por tipo de parto, não revelou diferenças significativas, apesar de não podermos descartar a possível influência do pequeno número amostral de RN, já que foi detectada uma tendência a níveis mais elevados principalmente de IL-8 e IL-6 no parto vaginal.

Esse estudo mostrou um aumento significativo da população de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CCD127<sup>lo</sup>FoxP3<sup>+</sup> nos três grupos de RN em comparação aos adultos, tanto em número absoluto, quanto em frequência e, interessantemente, a frequência dessas células diminui na medida em que a idade gestacional aumenta. Esses resultados estão diretamente relacionados à correlação inversa entre a proporção de células T reguladoras e a idade gestacional, evento também evidenciado por outros autores (LUCIANO *et al.*, 2014; CORREA-ROCHA *et al.*, 2012).

De fato, tem sido observado que a contagem absoluta e a porcentagem de células Treg em RN pré-termo e a termo são maiores do que as descritas para crianças e adultos (RADSTAKE *et al.*, 2009). Existe uma população abundante de células Treg no feto humano, que compreende uma porcentagem significativamente maior das células TCD4<sup>+</sup> periféricas (aproximadamente 15%) do que é encontrado em crianças e adultos saudáveis (5%) (TAKAHATA *et al.*, 2004). Foi relatado que as células T fetais e adultas são populações diferentes que surgem a partir de células tronco hematopoiéticas distintas de acordo com as diferentes fases de desenvolvimento do sistema imune. A



propensão para as células TCD4<sup>+</sup> fetais se diferenciarem em Treg após estimulação, evidenciada pelo aumento da expressão de Foxp3 e CD25, sugere que no início da vida, a diferenciação dessas células pode favorecer uma população cujo papel é o de promover tolerância a antígenos próprios (e potencialmente estranhos, notadamente aloantígenos maternos) encontrados durante o desenvolvimento (MOLD *et al.*, 2010). Esses dados podem explicar a presença de altos níveis de linfócitos T reguladores nos neonatos e a correlação negativa entre a frequência destas células e a idade gestacional. A presença de valores elevados de células Treg em prematuros poderia desempenhar um papel protetor na tolerância materno-fetal, mas também pode ter um efeito secundário, por meio do qual células Treg inibem a sobrevivência e proliferação de linfócitos e outras células do sistema imune (CORREA-ROCHA *et al.*, 2012).

A inibição da resposta imune antimicrobiana mediada por Treg poderia levar a um *clearance* ineficaz dos patógenos, resultando em uma inflamação crônica decorrente da infecção persistente. Por outro lado, Tregs participam na regulação da resposta imune impedindo, assim, a ativação imune exacerbada e potencialmente prejudicial. O pool de células Treg de RN prematuros pode ser alterado pela baixa idade gestacional, exposição pré-natal à inflamação e corioamnionite (LUCIANO *et al.*, 2014). No entanto, os critérios de exclusão utilizados no presente trabalho e já discutidos anteriormente, foram escolhidos para tentar reduzir ao máximo a exposição pré-natal à inflamação e corioamnionite, com o intuito de trabalharmos com uma casuística saudável.

Tem sido discutido que a presença de níveis reduzidos de citocinas reguladoras, em conjunto com a diminuição da média de intensidade de fluorescência (MFI) de FoxP3 em células Treg do sangue de cordão umbilical de filhos de mães alérgicas, indica uma menor eficiência funcional destas células (GEORGESON *et al.*, 2001; BERRINGTON *et al.*, 2005). O mau funcionamento das células Treg no sangue do cordão umbilical de crianças de mães alérgicas poderia ser compensado parcialmente por um aumento do número dessas células em comparação com o grupo saudável. No entanto, enquanto uns trabalhos não encontraram diferenças significativas no MFI de FoxP3 entre crianças de alto e baixo risco (RINDSJÖ *et al.*, 2010), outros estudos apontam para a diminuição da função das células Treg com base na intensidade de expressão do FoxP3 (SCHAUB *et al.*, 2008; SMITH *et al.*, 2008; STEINBORN *et al.*, 2010). Esses resultados controversos poderiam ser explicados por um baixo número de indivíduos incluídos nos estudos (SMITH *et al.*, 2008) ou por diferentes métodos utilizados para a quantificação de FoxP3 (HRDÝ *et al.*, 2012; RINDSJÖ *et al.*, 2010). Com base nesses dados, realizamos a análise do MFI de Foxp3 nas nossas amostras e, assim como os resultados referentes ao número e frequência de células Treg já descritos em nosso estudo, foi observado um maior MFI de Foxp3 nas Tregs de RN pré-termo em relação aos de termo e, além disso, altos níveis de expressão de Foxp3 no Grupo 2 em relação aos adultos que, baseado em alguns estudos da literatura, implicaria em uma maior função dessas células em RN pré termo.

Resultados conflitantes nas frequências de Treg podem refletir uma variação nas estratégias de formação dos *gates* utilizados nas análises de citometria, diferentes marcadores de Treg testados, diferentes fluorocromos conjugados aos anticorpos

monoclonais e também os diferentes grupos étnicos analisados. Todas estas incoerências podem levar a conclusões ambíguas, pois linfócitos Treg representam uma população heterogênea de células e muitos problemas metodológicos surgem no decurso do seu estudo. Diferentes estratégias de *gate* utilizadas para a quantificação de Treg, tais como  $CD4^+CD25^+$  (TAKAHATA *et al.*, 2004),  $CD4^+CD25^{high}$  (BERRINGTON *et al.*, 2005; SCHAUB *et al.*, 2008),  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$  (SMITH *et al.*, 2008),  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  (MITTAG *et al.*, 2005),  $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$  (SCHOBBER *et al.*, 2014) podem influenciar nas frequências encontradas dessas células (HRDÝ *et al.*, 2012).

De acordo com Sakaguchi e colaboradores (2010) e Myiara e colaboradores (2009), a população de células T  $Foxp3^+$  possui heterogeneidade em seu fenótipo e função, incluindo células com capacidade supressora e não supressora. As células T  $CD4^+Foxp3^+$  podem ser separadas em três subpopulações funcional e fenotipicamente distintas, baseadas na expressão de Foxp3, de marcadores de superfície celular, função proliferativa em estado fisiológico, capacidade de secreção de citocinas, repertório de TCR e atividade supressora *in vitro*. Essas três populações compreendem: (1) células Treg *naïve*  $CTLA-4^-CD25^{++}CD45RA^+FOXP3^{lo}$ ; (2) células Treg efetoras  $CTLA-4^+CD25^{+++}CD45RA^-FOXP3^{hi}$  e; (3) células não Treg  $CTLA-4^+CD25^+CD45RA^-FOXP3^{lo}$  secretoras de citocinas. Nessas três subpopulações  $Foxp3^+$ , o grau de expressão desse marcador é diretamente proporcional à expressão de CD25. Diante disso, podemos supor que o aumento desses marcadores está relacionado com o grau de ativação e potencial de supressão adquirido pelas células Treg.

De acordo com nossos dados, podemos supor que as subpopulações descritas acima podem fazer parte de um processo de maturação celular envolvendo a ativação das células T reguladoras, já que células Treg *naïve*, após estimulação, aumentam sua expressão de Foxp3, do receptor para IL-2 e adquirem capacidade de proliferação celular. Confirmando essa suposição, Miyara e colaboradores (2009) determinaram que a maior parte de células Treg efetoras Foxp3<sup>hi</sup> é proveniente de uma recente ativação e vigorosa proliferação de células Treg *naïve* e apenas uma minoria de células ativadas pode se desenvolver a partir de células não-Treg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> *in vivo*.

É descrito que células Treg de sangue de cordão são essencialmente células *naïve* que expressam o marcador de células T *naïve* CD45RA (TAKAHATA *et al.*, 2004). Em nosso trabalho, foram verificadas frequências significativamente maiores de células Treg expressando o marcador CD45RA nos 3 grupos de RN em relação aos adultos. Estudos recentes mostraram que a expressão dos marcadores CD45RA ou CD45RO, que são mutuamente exclusivos em células T, assim como em células Foxp3<sup>+</sup>, são particularmente úteis na marcação dessa população quando combinados com a expressão de CD25 e/ou Foxp3 (SAKAGUCHI *et al.*, 2010). É sugerido que o sangue de cordão umbilical contém células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> como uma população funcionalmente madura com fenótipo *naïve* e, apesar da frequência mais elevada no sangue do cordão, essas células não necessariamente possuem uma maior atividade supressora quando comparadas com as de adultos. Apesar do CD45RA ser um marcador de fenótipo *naïve* em células T, que não sofreram estímulo via TCR para maturação, estudos anteriores mostraram que células Treg precisam ser estimuladas continuamente para manter-se na periferia. Desta forma, apesar de expressarem

CD45RA, essas células não podem ser consideradas estritamente células T *naïve* (SAKAGUCHI *et al.*, 2010). Além disso, a presença de ambos os tipos de células Treg, *naïve* e de memória, com atividades supressoras equivalentes em diferentes estágios do desenvolvimento humano também já foi demonstrada (VALMORI *et al.*, 2005).

A interação entre as células Treg e células dendríticas (DC) *in vivo* envolve a molécula co-estimuladora CTLA-4, cuja expressão é induzida pela ativação celular (VIGNALI *et al.*, 2008). O uso de anticorpos imunobloqueadores anti-CTLA-4 ou em células Treg CTLA-4-deficientes, a supressão de células T efectoras mediada por células Treg via DC é reduzida (ODERUP *et al.*, 2006). Em adultos, a maioria das células Treg expressa CTLA-4 intracelularmente, o que foi provado ser essencial para que as Treg controlem a ativação e expansão de outras células (CUROTTO DE LAFAILLE *et al.*, 2009). Tem sido demonstrado que a interação do CTLA-4 com as moléculas coestimuladoras CD80 e/ou CD86 em DC inibe o acúmulo do fator primário de crescimento de células T, IL-2. Além disso, independente do subtipo de linfócito T que promove esta ligação, ocorre a regulação negativa da expressão de CD80 e/ou CD86 (via endocitose) nas DCs, o que inibirá a ativação e diferenciação das células T (SANTNER-NANAN *et al.*, 2008; JUNGE *et al.*, 2007). Foi também observado que as células Treg podem condicionar as DC a expressar indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), uma potente molécula reguladora que é conhecida por induzir a produção de metabólitos pró-apoptóticos pelo catabolismo do triptofano, resultando na supressão de células T efectoras dependente da interação entre CTLA-4 e CD80 e/ou CD86 (VIGNALI *et al.*, 2008).

A ausência de diferenças estatísticas nas frequências de células Treg CTLA-4<sup>+</sup> dentre os nossos grupos de estudo implica diferenças na maturação dessas células entre recém-nascidos e adultos onde, em neonatos, há uma predominância de células Treg *naïve*. Diante disso, a análise do MFI de CTLA-4 realizada separadamente em populações de Treg *naïve* e de memória revelou uma diminuição da expressão de CTLA-4 em células Treg *naïve* dos RN pré-termo quando comparados com os nascidos a termo e adultos, e menor expressão de CTLA-4 em células Treg de memória no Grupo 1. Interessantemente, apenas o grupo de adultos mostrou um aumento da expressão de CTLA-4 entre células *naïve* e de memória, sugerindo uma mudança no grau de maturação destas células. Foi demonstrado que a expressão de CTLA-4 é diretamente relacionada com a reserva intracelular desse marcador, pois células *naïve* possuem reserva desse marcador muito menor que as células de memória e, portanto, a reserva pode se esgotar bem mais rapidamente, levando assim a um declínio na expressão de CTLA-4 na superfície celular (JAGO *et al.*, 2004). Isto sugere uma deficiência das células *naïve* em produzir CTLA-4 e implica em uma menor função destas células, particularmente no período neonatal.

Tem sido demonstrado que as células Treg são também importantes na regulação da atividade de células T em tecidos periféricos e em locais com respostas imunes em atividade, assim como foi demonstrado que a maioria das células Treg em sangue de cordão umbilical e de crianças até 18 meses de idade expressam  $\alpha 4\beta 7$  e, possivelmente, migram para tecidos linfoides secundários no intestino, revelando a importância desse órgão como sítio primário da exposição antigênica para células T ao nascimento e no início da vida (GRINDEBACKE *et al.*, 2009). Entretanto, aos 3 anos de

idade, os linfócitos Treg sofrem um processo de maturação, com a redução da expressão de  $\alpha 4\beta 7$  e aumento da expressão de CCR4. De acordo com estudos preliminares, foi evidenciado que células T  $CD45RA^+FoxP3^+$  em sangue de cordão umbilical expressam  $\alpha 4\beta 7$ , enquanto células T  $CD45RA^-FoxP3^+$  expressam CCR4 (HIRAHARA *et al.*, 2006; LIM *et al.*, 2006). Sendo assim, de acordo com esses resultados, há um consenso de que o fenótipo de *homing* celular pode ser usado como um marcador de diferenciação de células Treg  $CD4^+CD25^+$  pois, à medida que o receptor de *homing* celular muda de  $\alpha 4\beta 7$  para CCR4, isso coincide com a diferenciação de fenótipo *naïve* para de memória (RABE *et al.*, 2011).

Apesar de  $\alpha 4\beta 1$  não ser importante para mediar o recrutamento de linfócitos T para o trato gastrointestinal sob condições não inflamatórias, na doença de Crohn ativa, o aumento de VCAM-1 nas células endoteliais pode contribuir para o recrutamento de leucócitos para o intestino sob condições inflamatórias, pela sua interação com  $\alpha 4\beta 1$  (KURMAEVA *et al.*, 2014).

Verificou-se que a deleção da integrina  $\alpha 4$ , mas não da integrina  $\beta 1$ , em células T, atenua significativamente o desenvolvimento de colite em ratos e reduz o acúmulo de células T no cólon. Esses achados murinos também se correlacionam com uma redução no acúmulo de células T  $CD4^+$  em biópsias intestinais humanas de pacientes com a doença de Crohn ou em fluido cerebrospinal de pacientes com esclerose múltipla tratados com Natalizumab, um anticorpo monoclonal que bloqueia a integrina  $\alpha 4$  e, assim, interfere no *homing* celular mediado pela integrina  $\alpha 4\beta 7$  para o intestino, assim como no *homing* dependente da integrina  $\alpha 4\beta 1$  para o cérebro (KURMAEVA *et al.*, 2004). Entretanto, como VLA-4 está presente em todos os leucócitos, com exceção

dos neutrófilos, o bloqueio de VLA-4 pode não só interferir em mecanismos autoimunes, mas também na vigilância imunológica do organismo, já que aumentos significativos dos linfócitos T e B circulantes foram detectados depois da administração de Natalizumab, o que sugere uma interrupção no tráfego linfocitário.

Por outro lado, foi observada uma relativa diminuição nos linfócitos Treg circulantes, que poderiam estar sendo recrutados para o sistema nervoso central durante a inflamação e poderiam modular a função das células efectoras neste local. Apesar disso, foi descrito que Natalizumab não afetou a já presente reduzida função supressora das células Treg em pacientes com esclerose múltipla. A função supressora reduzida é provavelmente decorrente de uma maior proliferação dessas células nestes pacientes em comparação com indivíduos saudáveis, já que está descrito que células Treg em proliferação apresentam menor atividade supressora (PUTZKI *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2006).

De acordo com essas afirmações, já foi demonstrada uma migração mais eficiente para o intestino mediada pela quimiocina CCL25 pelas células Treg de sangue de cordão umbilical comparadas com as de adulto que, por outro lado, parecem migrar mais eficientemente por meio do ligante de CCR4, CCL22, demonstrando que células Treg de neonatos apresentam um padrão característico de *homing* para o intestino e corrobora com a noção de que o intestino é um órgão central no desenvolvimento da tolerância (GRINDEBACKE *et al.*, 2009).

Apesar disso, os estudos acima não analisaram sangue de cordão umbilical de RN pré-termo como um grupo isolado e, portanto, nosso estudo mostra, pela primeira



vez, uma frequência ainda maior de células Treg  $\alpha 4\beta 7^+$  em RN pré-termo quando comparados aos RN a termo, indicando um fenótipo mais imaturo no primeiro grupo. A tendência da correlação inversa encontrada entre células Treg  $\alpha 4\beta 7^+$  e a idade gestacional também favorece essa ideia. Em discordância com outros estudos, a ausência de diferença estatística entre células Treg  $\alpha 4\beta 7^+$  de RN a termo e adultos observada em nosso estudo pode ser explicada pelo fato de que o marcador CD25 foi utilizado, ao invés de FoxP3, como marcador de células Treg em um dos trabalhos (GRINDEBACKE *et al.*, 2009) e, no outro,  $\alpha 4\beta 7^+$  foi analisado em células T CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> e CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> separadamente (LIM *et al.*, 2006). Além disso, a diminuição da frequência de células Treg  $\alpha 4\beta 7^+$  e  $\alpha 4\beta 1^+$  encontrada em RN a termo comparados aos pré-termo, corrobora com a baixa frequência de células TCD4<sup>+</sup> também encontrada no grupo de RN a termo, o que pode sugerir uma migração prévia dessas células para tecidos linfoides secundários, pois a expressão de receptores de *homing* são frequentemente regulados negativamente quando as células alcançam o tecido alvo (GRINDEBACKE *et al.*, 2009).

Em conclusão, foram observadas frequências de células T reguladoras inversamente correlacionadas com a idade gestacional, resultando em altas frequências dessas células em RN pré-termo e a termo comparados aos adultos. No entanto, essas células possuem um perfil *naïve* com alta expressão de CD45RA e  $\alpha 4\beta 7/\alpha 4\beta 1$  e baixa expressão de CTLA-4, especialmente no grupo de RN muito pré-termo, o que sugere uma diminuição da função dessas células, particularmente na prematuridade.

---

*CONCLUSÕES*

## 6. CONCLUSÕES

1. Recém-nascidos pré-termo e a termo apresentaram valores elevados de células T reguladoras em relação aos adultos e a frequência dessas células mostrou correlação inversa com a idade gestacional;
2. Frequências significativamente maiores de células T reguladoras com fenótipo *naïve* foram observadas em recém-nascidos a termo e pré-termo em relação aos adultos;
3. Uma menor expressão de CTLA-4 foi detectada em células T reguladoras *naïve* em ambos os grupos de RN pré-termo e em células Treg de memória apenas nos RN muito prematuros ou moderados (Grupo 1) em comparação aos RN a termo e adultos;
4. Recém-nascidos pré-termo mostraram frequências mais elevadas de células T reguladoras expressando as integrinas envolvidas no *homing* intestinal  $\alpha 4\beta 7$  e  $\alpha 4\beta 1$  quando comparados aos recém-nascidos a termo.

Recém-nascidos pré-termo apresentaram proporções e números mais elevados de células T reguladoras em relação aos nascidos a termo e adultos, com frequências inversamente proporcionais à idade gestacional. No entanto, essas células exibiram um perfil distinto quando comparadas às dos adultos, com alta expressão do marcador de células *naïve* CD45RA e do marcador de *homing* intestinal  $\alpha 4\beta 7^+$  e menor expressão de CTLA-4, sugerindo um fenótipo funcionalmente imaturo, particularmente em recém-nascidos muito prematuros.

*REFERÊNCIAS*

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, Jiang S, Kuchroo VK, Mathis D, Roncarolo MG, Rudensky A, Sakaguchi S, Shevach EM, Vignali DA, Ziegler SF. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol.* 2013;14(4):307-8.
2. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol.* 2008;20:1361-8.
3. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman BL, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr.* 1991;119(3):417-23.
4. Berrington JE, Barge D, Fenton AC, Cant AJ, Spickett GP. Lymphocyte subsets in term and significantly preterm UK infants in the first year of life analysed by single platform flow cytometry. *Clin Exp Immunol.* 2005;140(2):289-92.
5. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, Adler A, Vera Garcia C, Rohde S, Say L, Lawn JE. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet.* 2012;379:2162–72.
6. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Höpner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Röttschke O, Falk K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3<sup>+</sup> Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* 2007;110(4):1225-32.
7. Capurro H, Konichezky S, Fonseca D, Caldeyro-Barcia R. A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. *J Pediatr.* 1978;93(1):120-2.
8. Carneiro-Sampaio M, Coutinho A. Early-onset autoimmune disease as a manifestation of primary immunodeficiency. *Front Immunol.* 2015;6:185.
9. Chang CC, Satwani P, Oberfield N, Vlad G, Simpson LL, Cairo MS. Increased induction of allogeneic-specific cord blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T (Treg) cells: a comparative study of naïve and antigenic-specific cord blood Treg cells. *Exp Hematol.* 2005;33:1508-20.
10. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naïve T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003;198(12):1875-86.
11. Chen W, Konkel JE. Development of thymic Foxp3(+) regulatory T cells: TGF-β matters. *Eur J Immunol.* 2015;45(4):958-65.

12. Chheda S, Palkowetz KH, Garofalo R, Rassin DK, Goldman AS. Decreased interleukin-10 production by neonatal monocytes and T cells: relationship to decreased production and expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and its receptors. *Pediatr Res*. 1996;40:475-83.
13. Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, Finkelstein D, Forbes K, Workman CJ, Brown SA, Rehg JE, Jones ML, Ni HT, Artis D, Turk MJ, Vignali DA. IL-35 mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol*. 2010;11(12):1093-101.
14. Corbett NP, Blimkie D, Ho KC, Cai B, Sutherland DP, Kallos A, Crabtree J, Rein-Weston A, Lavoie PM, Turvey SE, Hawkins NR, Self SG, Wilson CB, Hajjar AM, Fortuno ES 3rd, Kollmann TR. Ontogeny of Toll-like receptor mediated cytokine responses of human blood mononuclear cells. *PLoS One*. 2010;5:e15041.
15. Correa-Rocha R, Pérez A, Lorente R, Ferrando-Martínez S, Leal M, Gurbindo D, Muñoz-Fernández MÁ. Preterm neonates show marked leukopenia and lymphopenia that are associated with increased regulatory T-cell values and diminished IL-7. *Pediatr Res*. 2012;71(5):590-7.
16. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*. 2009;30(5):626-35.
17. Dejean AS, Beisner DR, Ch'en IL, Kerdiles YM, Babour A, Arden KC, Castrillon DH, DePinho RA, Hedrick SM. Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. *Nat Immunol*. 2009;10(5):504-13.
18. Ende N, Chen R, Reddi AS. Effect of human umbilical cord blood cells on glycemia and insulinitis in type 1 diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;325:665-9.
19. Engle WA. A Recommendation for the Definition of "Late Preterm" (Near-Term) and the Birth Weight–Gestational Age Classification System. *Semin Perinatol*. 2006;30:2-7.
20. Faria CCQG. *Avaliação da resposta imune após estimulação de monócitos via Toll-Like Receptor 2 (TLR-2) em recém-nascidos a termo e pré-termo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.
21. Filias A, Theodorou GL, Mouzopoulou S, Varvarigou AA, Mantagos S, Karakantza M. Phagocytic ability of neutrophils and monocytes in neonates. *BMC Pediatr*. 2011;11:29.
22. Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med*. 2002;196(6):851-7.
23. Garbi N, Hammerling GJ. Co-stimulation by dendritic cells maintains the peripheral pool of Tregs. *Eur J Immunol*. 2011;41(2):282-5.

24. Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Kovács A, Kovács L, László A. Natural killer cell cytotoxicity is deficient in newborns with sepsis and recurrent infections. *Eur J Pediatr*. 2001;160(8):478-82.
25. Ghazal P, Dickinson P, Smith CL. Early life response to infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2013;26(3):213-8.
26. Gomez-Lopez N, StLouis D, Lehr MA, Sanchez-Rodriguez EN, Arenas-Hernandez M. Immune cells in term and preterm labor. *Cell Mol Immunol*. 2014;11(6):571-81.
27. Gregg R, Smith CM, Clark FJ, Dunnion D, Khan N, Chakraverty R, Nayak L, Moss PA. The number of human peripheral blood CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol*. 2005;140:540-6.
28. Grindebacke H, Stenstad H, Quiding-Järbrink M, Waldenström J, Adlerberth I, Wold AE, Rudin A. Dynamic development of homing receptor expression and memory cell differentiation of infant CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells. *J Immunol*. 2009;183(7):4360-70.
29. Guasch XD, Torrent FR, Martínez-Nadal S, Cerén CV, Saco MJ, Castellví PS. Late preterm infants: a population at underestimated risk. *An Pediatr (Barc)*. 2009;71:291-98.
30. Haller M, Viener H, Brusko T, Wasserfall C, McGrail K, Staba S, Cogle C, Atkinson M, Schatz D. Insulin requirements, HbA1c, and stimulated C-peptide following autologous umbilical cord blood transfusion in children with type 1 diabetes (Abstract). *Diabetes*. 2007;56(Suppl. 1):A82.
31. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6:1123-32.
32. Hartel C, Adam N, Strunk T, Temming P, Muller-Steinhardt M, Schultz C. Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood. *Clin Exp Immunol*. 2005;142:446-53.
33. Heininger U, Riffelmann M, Leineweber B, Wirsing von Koenig CH. Maternally derived antibodies against *Bordetella pertussis* antigens pertussis toxin and filamentous hemagglutinin in preterm and full term newborns. *Pediatr Infect Dis*. 2009;28:443-45.
34. Hill JA, Feuerer M, Tash K, Haxhinasto S, Perez J, Melamed R, Mathis D, Benoist C. Foxp3 transcription factor dependent and independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity*. 2007;27(5):786-800.
35. Hirahara K, Liu L, Clark RA, Yamanaka K, Fuhlbrigge RC, Kupper TS. The majority of human peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells bear functional skin-homing receptors. *J Immunol*. 2006;177(7):4488-94.
36. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003a;299(5609):1057-61.

37. Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *Adv Immunol.* 2003b;81:331-71.
38. Howson CP, Kinney MV, Lawn JE. Born too soon: The Global Action Report on Preterm Birth. Geneva: March of Dimes, PMNCH, Save the Children and WHO. (2012).
39. Hrdý J, Kocourková I, Prokešová L. Impaired function of regulatory T cells in cord blood of children of allergic mothers. *Clin Exp Immunol.* 2012;170(1):10-7.
40. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI, Powell JD, Pardoll DM, Drake CG, Vignali DA. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 2004;21(4):503-13.
41. Hunt CE. Ontogeny of autonomic regulation in late preterm infants born at 34-37 weeks postmenstrual age. *Semin Perinatol.* 2006;30:73-6.
42. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S. Thymus and autoimmunity: production of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol.* 1999;162(9):5317-26.
43. Jago CB, Yates J, Câmara NO, Lechler RI, Lombardi G. Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets. *Clin Exp Immunol.* 2004;136(3):463-71.
44. Jones CA, Cayabyab RG, Kwong KYC, Stotts C, Wong B, Hamdan H, Minoo P, DeLemos RA. Undetectable interleukin (IL)-10 and persistent IL-8 expression early in hyaline membrane disease: a possible developmental basis for the predisposition to chronic lung inflammation in preterm newborns. *Pediatr Res.* 1996;39:966-75.
45. Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol.* 2001;22:394.
46. Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol.* 2003;171(12):6323-7.
47. Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Ann Rev Immunol.* 2012;30:531-64.
48. Junge S, Kloeckener-Gruissem B, Zufferey R, Keisker A, Salgo B, Fauchere JC, Scherer F, Shalaby T, Grotzer M, Siler U, Seger R, Güngör T. Correlation between recent thymic emigrants and CD31<sup>+</sup> (PECAM-1) CD4<sup>+</sup> T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *Eur J Immunol.* 2007;37(11):3270-80.
49. Källman J, Schollin J, Schalèn C, Erlandsson A, Kihlström E. Impaired phagocytosis and opsonisation towards group B streptococci in preterm neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 1998;78:46-50.
50. Kumar M, Putzki N, Limmroth V, Remus R, Lindemann M, Knop D, Mueller N, Hardt C, Kreuzfelder E, Grosse-Wilde H. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2006;180(1-2):178-84.



51. Kurmaeva E, Lord JD, Zhang S, Bao JR, Keivil CG, Grisham MB, Ostanin DV. T cell-associated  $\alpha 4\beta 7$  but not  $\alpha 4\beta 1$  integrin is required for the induction and perpetuation of chronic colitis. *Mucosal Immunol.* 2014;7(6):1354-65.
52. Li L, Boussiotis VA. Molecular and functional heterogeneity of T regulatory cells. *Clin Immunol.* 2011;141(3):244-52.
53. Li Z, Li D, Tsun A, Li B. FOXP3<sup>(+)</sup> regulatory T cells and their functional regulation. *Cell Mol Immunol.* 2015;12(5):558-65.
54. Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, Flores M, Li N, Schweighoffer E, Greenberg S, Tybulewicz V, Vignali D, Clynes R. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene3 engagement of MHC class II. *J Immunol.* 2008;180(9):5916-26.
55. Lim HW, Broxmeyer HE, Kim CH. Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol.* 2006;177(2):840-51.
56. Luciano AA, Arbona-Ramirez IM, Ruiz R, Llorens-Bonilla BJ, Martinez-Lopez DG, Funderburg N, Dorsey MJ. Alterations in regulatory T cell subpopulations seen in preterm infants. *PLoS One.* 2014;9(5):e95867.
57. Maródi L. Innate cellular immune responses in newborns. *Clin Immunol.* 2006;118:137-44.
58. Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, MacIsaac KD, Levine SS, Fraenkel E, von Boehmer H, Young RA. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T cell stimulation. *Nature.* 2007;445(7130):931-5.
59. Melville JM, Moss TJM. The immune consequences of preterm birth. *Frontier in neuroscience.* 2013;7:1-9.
60. Milcic TL. The complete blood count. *Neonatal Netw.* 2010;29:109-15.
61. Mittag A, Lenz D, Gerstner AO, Sack U, Steinbrecher M, Kokschi M, Raffael A, Bocsi J, Tárnok A. Polychromatic (eight-color) slide-based cytometry for the phenotyping of leukocyte, NK, and NKT subsets. *Cytometry A.* 2005;65:103-15.
62. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, Mathian A, Nakahata T, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, Amoura Z, Gorochov G, Sakaguchi S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 2009;30(6):899-911.
63. Mold JE, Venkatasubrahmanyam S, Burt TD, Michaëlsson J, Rivera JM, Galkina SA, Weinberg K, Stoddart CA, McCune JM. Fetal and adult hematopoietic stem cells give rise to distinct T cell lineages in humans. *Science.* 2010;330(6011):1695-9.
64. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact dependent immunosuppression by CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Expl Med.* 2001;194(5):629-44.

65. Ng PC, Lam HS. Biomarkers for late-onset neonatal sepsis: cytokines and beyond. *Clin Perinatol*. 2010;37(3):599-610.
66. Norwitz E, Robinson JN, Challis JRG. The control of labor. *N Engl J Med*. 1999; 341(0):660-6.
67. Nussbaum C, Sperandio M. Innate immune cell recruitment in the fetus and neonate. *J Reprod Immunol*. 2011;90(1):74–81.
68. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*. 2006;118(2):240-9.
69. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, Servillo G, Brunacci C, Calvitti M, Bicciato S, Mazza EM, Boon L, Grassi F, Fioretti MC, Fallarino F, Puccetti P, Grohmann U. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol*. 2011;12(9):870–8.
70. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa NA, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG Placental Transfer in Healthy and Pathological Pregnancies. *Clin Develop Immunol*. 2012;2012:985646.
71. Peoples JD, Cheung S, Nesin M, Lin H, Tatad AM, Hoang D, Perlman JM, Cunningham-Rundles S. Neonatal cord blood subsets and cytokine response to bacterial antigens. *Am J Perinatol*. 2009;26(9):647-57.
72. Prokesová L, Lodinová-Zádníková R, Zizka J, Kocourková I, Novotná O, Petrásková P, Sterzl I. Cytokine levels in healthy and allergic mothers and their children during the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol*. 2006;17:175-83.
73. Putzki N, Baranwal MK, Tettenborn B, Limmroth V, Kreuzfelder E. Effects of natalizumab on circulating B cells, T regulatory cells and natural killer cells. *Eur Neurol*. 2010;63(5):311-7.
74. Quinello C, Silveira-Lessa AL, Ceccon ME, Cianciarullo MA, Carneiro-Sampaio M, Palmeira P. Phenotypic differences in leucocyte populations among healthy preterm and full-term newborns. *Scand J Immunol*. 2014;80(1):57-70.
75. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Baker J, Jeffery LE, Kaur S, Briggs Z, Hou TZ, Futter CE, Anderson G, Walker LS, Sansom DM. Transendocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell extrinsic function of CTLA4. *Science*. 2011;332(6029):600–3.
76. Rabe H, Lundell AC, Andersson K, Adlerberth I, Wold AE, Rudin A. Higher proportions of circulating FOXP3<sup>+</sup> and CTLA-4<sup>+</sup> regulatory T cells are associated with lower fractions of memory CD4<sup>+</sup> T cells in infants. *J Leukoc Biol*. 2011;90(6):1133-40.
77. Radstake TR, van Bon L, Broen J, Wenink M, Santegoets K, Deng Y, Hussaini A, Simms R, Cruikshank WW, Lafyatis R. Increased frequency and compromised

- function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGF beta expression. *PLoS ONE*. 2009;4:e5981.
78. Raju TNK. Developmental physiology of late and moderate prematurity. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2012;17:126-31.
  79. Rindsjö E, Joerink M, Johansson C, Bremme K, Malmström V, Scheynius A. Maternal allergic disease does not affect the phenotype of T and B cells or the immune response to allergens in neonates. *Allergy*. 2010;65(7):822-30.
  80. Rizos D, Protonotariou E, Malamitsi-Puchner A, Trakakis E, Sarandakou A, Salamalekis E. Inflammatory cytokines and their soluble receptors during delivery and early life. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2005;84:817-8.
  81. Ryan WL, Mounira H, Candice CS, Clint MC, David FL, Emily AD. Late preterm birth. *Rev Obstet Gynecol*. 2010;3:10-9.
  82. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):490-500.
  83. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-87.
  84. Sakaguchi S. Regulatory T cells. *Springer Semin Immunopathol*. 2006;28(1):1-2.
  85. Santana C, Guindeo MC, González G, García-Muñoz F, Saavedra P, Doménech E. Cord blood levels of cytokines as predictors of early neonatal sepsis. *Acta Paediatr*. 2001;90:1176-81.
  86. Santner-Nanan B, Seddiki N, Zhu E, Quent V, Kelleher A, Fazekas de St Groth B, Nanan R. Accelerated age-dependent transition of human regulatory T cells to effector memory phenotype. *Int Immunol*. 2008;20(3):375-83.
  87. Schaub B, Liu J, Höppler S, Haug S, Sattler C, Lluís A, Illi S, von Mutius E. Impairment of T-regulatory cells in cord blood of atopic mothers. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:1491-9.
  88. Schober L, Radnai D, Spratte J, Kisielewicz A, Schmitt E, Mahnke K, Fluhr H, Uhlmann L, Sohn C, Steinborn A. The role of regulatory T cell (Treg) subsets in gestational diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol*. 2014;177(1):76-85.
  89. Schultz C, Rott C, Temming P, Schlenke P, Möller JC, Bucsky P. Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants. *Pediatr Res*. 2002;51:317-22.
  90. Schultz C, Temming P, Bucsky P, Göpel W, Strunk T, Härtel C. Immature anti-inflammatory response in neonates. *Clin Exp Immunol*. 2004;135:130-6.
  91. Sesarman A, Vidarsson G, and Sitaru C. The neonatal Fc receptor as therapeutic target in IgG-mediated autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67:2533-50.
  92. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by interleukin (IL)2 and induction of autoimmune disease by IL2 neutralization. *J Exp Med*. 2005;201(5):723-35.

93. Shapiro-Mendoza CK, Lackritz EM. Epidemiology of late and moderate preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2012;17:120-5.
94. Shapiro-Mendoza CK, Tomashek KM, Kotelchuck M, Barfield W, Nannini A, Weiss J, Declercq E. Effect of late-preterm birth and maternal medical conditions on newborn morbidity risk. *Pediatrics.* 2008;121:e223-32.
95. Shevach EM, Thornton AM. tTregs, pTregs, and iTregs: Similarities and differences. *Immunol Rev.* 2014;259(1):88–102.
96. Silveira-Lessa AL. *Avaliação dos mecanismos básicos de ativação via receptores semelhantes ao Toll 4 (TLR-4) em monócitos de recém-nascidos a termo e pré-termo* [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.
97. Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine.* 2003;21:3365-9.
98. Smith M, Tourigny MR, Noakes P, Thornton CA, Tulic MK, Prescott SL. Children with egg allergy have evidence of reduced neonatal CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup>CD127<sup>(lo/-)</sup> regulatory T cell function. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:1460-6.
99. Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology.* 2008;124(1):13-22.
100. Steinborn A, Engst M, Haensch GM, Mahnke K, Schmitt E, Meuer S, Sohn C. Small for gestational age (SGA) neonates show reduced suppressive activity of their regulatory T cells. *Clin Immunol.* 2010;134(2):188-97.
101. Strunk T, Currie A, Richmond P, Simmer K, Burgner D. Innate immunity in human newborn infants: prematurity means more than immaturity. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011;24(1):25–31.
102. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 Treg cells via retinoic acid. *J Exp Med.* 2007;204(8):1775-85.
103. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/ suppressive state. *Internat Immunol.* 1998;10(12):1969-80.
104. Takahata Y, Nomura A, Takada H, Ohga S, Furuno K, Hikino S, Nakayama H, Sakaguchi S, Hara T. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naïve phenotype and specific expression of forkhead Box p3 (Foxp3) gene. *Exp Hematol.* 2004;32:622-9.
105. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol.* 2008;9(3):239-44.
106. Thornton AM, Shevach EM. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998;188(2):287-96.

107. Valmori D, Merlo A, Souleimanian NE, Hesdorffer CS, Ayyoub M. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *J Clin Invest.* 2005;115(7):1953-62.
108. van den Berg JP, Westerbeek EA, Berbers GA, van Gageldonk PG, van der Klis FR, van Elburg RM. Transplacental transport of IgG antibodies specific for pertussis, diphtheria, tetanus, *Haemophilus influenzae* type b, and Neisseria meningitidis serogroup C is lower in preterm compared with term infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29:801-5.
109. van den Berg JP, Westerbeek EAM, vander Klis FRM, Berbers GAM, van Elburg RM. Transplacental transport of IgG antibodies to preterm infants: a review of the literature. *Early Hum Dev.* 2011;87:67-72.
110. van Gent R, van Tilburg CM, Nibbelke EE, Otto SA, Gaiser JF, Janssens-Korpela PL, Sanders EA, Borghans JA, Wulffraat NM, Bierings MB, Bloem AC, Tesselaar K. Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments. *Clin Immunol.* 2009;133:95-107.
111. Viener H, Brusko T, Wasserfall C, McGrail K, Staba S, Cogle CA, MA, Schatz D, Haller M. Changes in regulatory T cells following autologous umbilical cord blood transfusion in children with type 1 diabetes (Abstract). *Diabetes.* 2007;56(Suppl.1):A83.
112. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):523-32.
113. Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F, Coutinho M, Malmegrim KC, Foss-Freitas MC, Simões BP, Foss MC, Squiers E, Burt RK. Autologous non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA.* 2007;297:1568-76.
114. Walker JC, Smolders MA, Gemen EF, Antonius TA, Leuvenink J, de Vries E. Development of lymphocyte subpopulations in preterm infants. *Scand J Immunol.* 2011;73:53-8.
115. Walker LSK. Treg and CTLA-4: Two intertwining pathways to immune tolerance. *J Autoimmun.* 2013;45(100): 49-57.
116. WHO, UNICEF. Fulfilling the Health Agenda for Women and Children. The 2014 Report.2014.  
[http://www.countdown2015mnch.org/documents/2014Report/The2014report/Part\\_1\\_\(i-iv\\_1-13\)\\_final.pdf](http://www.countdown2015mnch.org/documents/2014Report/The2014report/Part_1_(i-iv_1-13)_final.pdf)
117. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self-tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2010;11(1):7-13.
118. Wynn JL, Neu J, Moldawer LL, Levy O. Potential of immunomodulatory agents for prevention and treatment of neonatal sepsis. *J Perinatol.* 2009;29:79-88.
119. Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3<sup>(+)</sup> regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol.* 2011;23(6):424-30.

120. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, Shah B, Chang SH, Schluns KS, Watowich SS, Feng XH, Jetten AM, Dong C. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*. 2008;29:44-56.
121. Yerkovich ST, Wikström ME, Suriyaarachchi D, Prescott SL, Upham JW, Holt PG. Postnatal development of monocyte cytokine responses to bacterial lipopolysaccharide. *Pediatr Res*. 2007;62:547-52.
122. Yildiran A, Yurdakul E, Guloglu D, Arsan S, Arikan M, Cengiz L, Tezcan S, İkinçiogullari A. The Effect of Mode of Delivery on T Regulatory (Treg) Cells of Cord Blood. *Indian J Pediatric*. 2011;78(10):1234-8.
123. Yip L, Woehrle T, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, Inoue Y, Ferrari V, Insel PA, Junger WG. Autocrine regulation of Tcell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J*. 2009;23(6):1685-93.
124. Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-Sogawa K, Zeng H, Hashimoto-Tane A, Yagita H, Tokunaga M, Saito T. Spatiotemporal basis of CTLA4 costimulatory molecule mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity*. 2010;33(3):326-39.
125. Zeng H, Zhang R, Jin B, Chen L. Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(5):566-71.
126. Zheng Y, Manzotti CN, Liu M, Burke F, Mead KI, Sansom DM. CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J Immunol*. 2004;172(5):2778-84.
127. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol*. 2007;8(5):457-62.

---

*ANEXOS*

## **Anexo I. APROVAÇÃO DA CAPPESQ**



### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS EM SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL DE RECÉM-NASCIDOS A TERMO E PRÉ-TERMO  
**Pesquisador Responsável:** Patrícia Palmeira **Versão:** 2  
**Pesquisador Executante:** Camila Rennó Guimarães **CAAE:** 05064212.7.0000.0068  
**Co-autores:** Cláudia Augusta Zago, Magda Carneiro-Sampaio  
**Finalidade Acadêmica:** Mestrado  
**Instituição:** HCFMUSP  
**Departamento:** PEDIATRIA

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Registro on-line:** 9353

**Número do Parecer:** 80463

**Data da Relatoria:** 22/08/2012

**Apresentação do Projeto:** Já relatado no primeiro parecer

**Objetivo da Pesquisa:** Idem

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:** Idem

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:** Respostas e correções adequadas aos comentários do primeiro parecer.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:** Inclusão do TCLE do grupo controle.

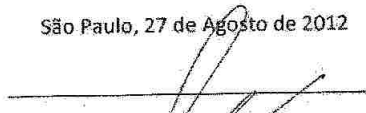
**Recomendações:** Aprovação

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:** Aprovação

**Situação do Parecer:** Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:** Não

São Paulo, 27 de Agosto de 2012

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme  
Coordenador  
Comissão de Ética para Análise de  
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

## PROJETO DE PESQUISA

---

**Título:** CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS EM SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL DE RECÉM-NASCIDOS A TERMO E PRÉ-TERMO

**Área Temática:**

**Pesquisador:** Patricia Palmeira

**Versão:** 2

**Instituição:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**CAAE:** 05064212.7.0000.0068

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

---

**Número do Parecer:** 80463

**Data da Relatoria:** 22/08/2012

**Apresentação do Projeto:**

Já relatado no primeiro parecer

**Objetivo da Pesquisa:**

Idem

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Idem

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Respostas e correções adequadas aos comentários do primeiro parecer

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Inclusão do TCLE do grupo controle

**Recomendações:**

Aprovação

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovação

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 23 de Agosto de 2012

---

Assinado por:  
Luiz Eugênio Garcez Leme

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

**MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME: .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: .M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : .....SEXO: M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

**DADOS SOBRE A PESQUISA**

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS EM SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL DE RECÉM-NASCIDOS A TERMO E PRÉ-TERMO**

PESQUISADOR: PATRICIA PALMEIRA

CARGO/FUNÇÃO: PESQUISADORA CIENTÍFICA      INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 18195/01-D

UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA – LIM-36

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO                          RISCO MÉDIO   

RISCO BAIXO                                   RISCO MAIOR   

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 ANOS.

## **HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

- 1. Justificativa e os objetivos da pesquisa:** convidamos a senhora para fazer parte desta pesquisa, que tem por objetivo avaliar no sangue do cordão umbilical de seu bebê as células T reguladoras que possuem papel importante no controle da inflamação e, sua falta, é responsável por muitas doenças. Esta pesquisa é importante, pois a criança recém-nascida tem facilidade de adquirir infecções principalmente porque suas defesas costumam ser inferiores à de crianças de maior idade. Caso a senhora autorize por escrito, será colhido 10ml de sangue do cordão umbilical. O sangue será colhido utilizando seringa e agulha esterilizada, descartáveis, usadas uma única vez, e os profissionais que farão esta coleta estarão usando luvas também descartáveis. Caso a senhora não queira participar da pesquisa, você tem todo o direito de se recusar, e isto não vai mudar em nada o tratamento do seu filho neste hospital. Caso comece na pesquisa e depois queira desistir, o tratamento do seu filho também vai continuar igual.
- 2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:** Será colhido 10ml de sangue da veia umbilical direto da placenta que foi retirada de seu corpo na sala de parto da maternidade. Será quantificado no sangue do cordão umbilical do seu bebê as células T reguladoras. As coletas serão feitas apenas para o presente estudo.
- 3. Desconfortos e riscos esperados:** O sangue de cordão umbilical será colhido da veia do cordão umbilical após a retirada da placenta, logo após o parto, sem dor ou desconforto algum para a senhora ou para seu bebê.
- 4. Benefícios que poderão ser obtidos:** Trata-se de um estudo experimental testando a hipótese de que bebês recém-nascidos a termo e prematuros apresentam números de células T reguladoras diferentes. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.
- 5. Garantia de acesso** em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o **Dra. Patricia Palmeira** que pode ser encontrada na Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 647. São Paulo, SP. Telefone(s) (11) 3069-8782. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: [cappesq@hcnet.usp.br](mailto:cappesq@hcnet.usp.br)
- 6. É garantida a liberdade** da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 7. Direito de confidencialidade** – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

8. **Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas**, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
9. **Despesas e compensações:** não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
10. **Compromisso do pesquisador de utilizar os dados** e o material coletado somente para esta pesquisa.
11. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Caracterização fenotípica da população de células T reguladoras em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos a termo e pré-termo**”. Eu discuti com a pesquisadora Patricia Palmeira sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

-----

Assinatura da testemunha

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

*(Somente para o responsável do projeto)*

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.



-----

Assinatura do responsável pelo estudo

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**FICHA DE ANAMNESE DAS PARTURIENTES**

O OK

<b>GRUPO:</b>	Pré-termo abaixo de 34 semanas ( )	PT < 34
	Pré-termo acima de 34 semanas ( )	PT < 37
	Termo ( )	T
<b>HC</b>		
Caso nº		Caso nº:
Data do atendimento:		DataA:
Data do nascimento:		DataNasc:

**Identificação**

<b>Dados Maternos</b>					
Nome:					Iniciais:
Endereço					
Nº	Complemento		Bairro:		
CEP			Telefone:		
Gestação	(1)	(2)	(3) dias	(+ de 3)	Gesta
Idade gestacional (IG)	__ . __ / 7		00.0/7 (ignorada)		IG:
Método IG	(1) USG 1º trim	(2) DUM	(3) Capurro		Método IG:
	(4) N.Ballard		(5) Desconhecido		

**Morbidades maternas**

<b>Morbidades maternas</b>					
Circlagem	(0) Ausente	(1) Presente			Circlagem:
<b>Infecção:</b>	(0) Ausente	(1) Presente	(2) Não pesquisado		Infecção:
ITU	(0) Ausente	(1) Presente	(2) Não pesquisado		ITU:
SGB	(0) Ausente	(1) Presente	(2) Não pesquisado		SGB:
E. coli	(0) Ausente	(1) Presente	(2) Não pesquisado		E. coli:
Outras Especificar	(0) Ausente	(1) Presente	(2) Não pesquisado		Outros

<b>Sorologias</b>					
Sífilis/ VDRL	(0) Não reagente	(1) Reagente	Título:		Sifilis/VD
Sífilis/TPPA	(0) Não reagente	(1) Reagente	(2) Não pesquisado		Sifilis/TP
Sífilis/FTA-Abs	(0) Não reagente	(1) Reagente	(2) Não pesquisado		Sifilis/Ft
HIV	(0) Não reagente	(1) Reagente	(2) Não pesquisado		HIV:
CMV - IgG	(0) Não reagente	(1) Reagente	(2) Não pesquisado		CMV/IgG
CMV - IgM	(0) Não reagente	(1) Reagente	(2) Não pesquisado		CMV/IgM
Rubéola - IgG	(0) Não reagente	(1) Reagente	(2) Não pesquisado		Rubéola/IgG
Rubéola - IgM	(0) Não reagente	(1) Reagente	(2) Não pesquisado		Rubeola/IgM
Toxo - IgG	(0) Não reagente	(1) Reagente	(2) Não pesquisado		Toxo/IgG
Toxo - IgM	(0) Não reagente	(1) Reagente	(2) Não pesquisado		Toxo/IgM
Teste de avidéz	(0) Alta	(1) Baixa	(2) Indeterminado		Toxo/avidéz
Hepatite C	(0) Não reagente	(1) Reagente	(2) Não pesquisado		HVC:
Hepatite B	(0) Não reagente	(1) Reagente	(2) Não pesquisado		HVB
HBsAg	(0) Não reagente	(1) Reagente	(2) Não pesquisado		HBsAg
Anti-Hbs	(0) Não reagente	(1) Reagente	(2) Não pesquisado		Anti-Hbs
HBeAg	(0) Não reagente	(1) Reagente	(2) Não pesquisado		HBeAg
Anti-Hbe	(0) Não reagente	(1) Reagente	(2) Não pesquisado		Anti-Hbe
Anti-Hbc	(0) Não reagente	(1) Reagente	(2) Não pesquisado		Anti-Hbc

**Dados Intraparto**

Outros Citar	(0) Não reagente	(1) Reagente		
<b>Doenças Maternas</b>				
Hipertireoidismo	(0) Ausente	(1) Presente		Hipert:
Hipotireoidismo	(0) Ausente	(1) Presente		Hipot:
Diabete Melito	(0) Ausente	(1) Presente		DM:
Diabete gestacional	(0) Ausente	(1) Presente		DG:
Pneumonias	(0) Ausente	(1) Presente		PN:
Tuberculose	(0) Ausente	(1) Presente		Tb:
Febre Reumática	(0) Ausente	(1) Presente		FR:
Doença de Chagas	(0) Ausente	(1) Presente		Chagas:
Hipertensão Arterial Aguda	(0) Ausente	(1) Presente		HASa
Hipertensão Arterial Crônica	(0) Ausente	(1) Presente		HASc
Lúpus Eritematoso Sistêmico	(0) Ausente	(1) Presente		LES:
Artrite Reumatóide	(0) Ausente	(1) Presente		AR
Polimiosite/Dermatomiosite	(0) Ausente	(1) Presente		P/D
Poliarterite Nodosa	(0) Ausente	(1) Presente		Pnodo
Outras Doenças auto-ímmunes Citar	(0) Ausente	(1) Presente		Autoimune
Alergias	(0) Ausente	(1) Presente	Qual?	Alergia
Tabagismo	(0) Ausente	(1) Presente	nº de cigarros	Tabaco
Álcool	(0) Ausente	(1) Presente	nº doses	Álcool
Drogas ilícitas	(0) Ausente	(1) Presente	Qual?	Drogas
Medicamentos: Citar:	(0) Não	(1) Sim	Quais?	Medicamentos
Corticóides	(0) Não	(1) Sim		Corticoide

**Recém-nascidos**

<b>Dados Intraparto</b>				
Tipo de parto	(0) normal	(1) fórcepe	(2) cesárea	
Profilaxia SBG	(0) não realizada	(1) Adequada	(2) Inadequada	
Profilaxia HIV	(0) não realizada	(1) Realizada	(2) não se aplica	
Antibioticoterapia				
Pré-parto	(0) não realizada	(1) Realizada		
Intraparto	(0) não realizada	(1) Realizada		
<b>Recém-nascidos</b>				
Peso de Nascimento (PN):	PN:			
Gênero	(1) Masc	(2) Fem	(3) Indeterm	Gênero:
Apgar:	Apgar1:			Apgar1:
	Apgar5:			Apgar5:
<b>Classificação RN:</b>				
Clas.IG	(1) Pré-termo	(2) Termo	(3) Pós-termo	Clas.IG
Clas.T	(1) PIG	(2) AIG	(3) GIG	Clas.T
Clas.Peso	(1) Normal	(2) BP	(3) MBP	Clas.Peso
<b>Risco Infecioso</b>	(0) Não	(1) Sim		
Bolsa Rota > 18 horas	(0) Não	(1) Sim		



Quadro laboratorial

ITU materna	(0) Não	(1) Sim	
Febre Materna	(0) Não	(1) Sim	
Corioamnionite	(0) Não	(1) Sim	
<b>Procedimentos</b>			
Procedimento cirúrgico	(0) Não	(1) Sim	Cirurgia:
Hemorragia Intracraniana	(0) Não	(1) Sim	HIC:
Drogas vasoativas	(0) Não	(1) Sim	Drogas vasoativas:
Uso de hemoderivados	(0) Não	(1) Sim	Hemoderivados:
Concentrado de hemácias	(0) Não	(1) Sim	Hemácia:
Plasma fresco congelado	(0) Não	(1) Sim	Plasma:
Concentrado de plaquetas	(0) Não	(1) Sim	Plaquetas:
Gamaglobulina EV	(0) Não	(1) Sim	Gamaglob.:
Estimulador de colônias (granulócitos neutrófilos)	(0) Não	(1) Sim	Granulokine:

	Hb	HT	Leucócitos	Neutrófilos	INN	Plaquetas
HMG	1º exame					
Leucócitos	(1) > 20.000 / mm <sup>3</sup>	(2) Entre 20.000 e 5.000 / mm <sup>3</sup>	(3) < 5.000 / mm <sup>3</sup>			
Neutrófilos	(1) > 1750 / mm <sup>3</sup>		(2) < 1750 / mm <sup>3</sup>			
INN	(1) > 0,2		(2) < 0,2			
Plaquetas	(1) > 150.000 / mm <sup>3</sup>		(2) < 150.000 / mm <sup>3</sup>			

	Hb	HT	Leucócitos	Neutrófilos	INN	Plaquetas
HMG	2º exame					
Leucócitos	(1) > 20.000 / mm <sup>3</sup>	(2) Entre 20.000 e 5.000 / mm <sup>3</sup>	(3) < 5.000 / mm <sup>3</sup>			
Neutrófilos	(1) > 1750 / mm <sup>3</sup>		(2) < 1750 / mm <sup>3</sup>			
INN	(1) > 0,2		(2) < 0,2			
Plaquetas	(1) > 150.000 / mm <sup>3</sup>		(2) < 150.000 / mm <sup>3</sup>			

PCR	1º dia	Data:
	2º dia	Data:
	3º dia	Data:
PCR1	(1) ≥ 10 mg/L	(2) < 10 mg/L (3) Não colhida
PCR2	(1) ≥ 10 mg/L	(2) < 10 mg/L (3) Não colhida
PCR3	(1) ≥ 10 mg/L	(2) < 10 mg/L (3) Não colhida
HMC	(0) Negativa	(1) Positiva (2) Não colhida

Agente (HMC-AE)

LCR	(0) Normal	(1) Alterado	(2) Não colhido
LCR	Leucócitos	Neutrófilos	linfócitos
Glicemia	Proteínas		Glicose
Leucócitos	(1) > 20 leucócitos / mm <sup>3</sup>		(2) < 20 leucócitos / mm <sup>3</sup>
Neutrófilos	(1) > 20%		(2) < 20 %
Proteínorraquia	RNT:	(1) > 100 mg%	(2) < 100 mg%
	RN PT	(1) > 120 mg%	(2) < 120 mg%
Glicorraquia	(1) < 75% da glicemia		(2) > 75% da glicemia
Bacterioscopia	(0) Negativa		(1) Positiva
Cultura	(0) Negativa	(1) Positiva	(3) Não colhido
LCR-AE			

Urocultura	(0) Negativa	(1) Positiva	(2) Não colhida
	Método	(1) PSP	(2) Sondagem (3) Saco coletor
Urocultura-AE			
Evolução:	Alta hospitalar	(0) Não	(1) Sim
	Data da alta		Alta:
	Óbito	(0) Não	(1) Sim
	Data do óbito		Data Alta
			Óbito
			Data Óbito

Diagnósticos:

---



---



---



---



---



---



---



---



---



---

**Diagnóstico**