CAMILA CRISTINA QUINELLO GOMES DE FARIA

Avaliação da resposta imune após estimulação de monócitos via *Toll-Like Receptor* 2 (TLR-2) em recém-nascidos a termo e pré-termo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências

Programa de Pediatria
Orientadora: Dra. Patricia Palmeira

São Paulo

2013

CAMILA CRISTINA QUINELLO GOMES DE FARIA

Avaliação da resposta imune após estimulação de monócitos via *Toll-Like Receptor* 2 (TLR-2) em recém-nascidos a termo e pré-termo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências

Programa de Pediatria
Orientadora: Dra. Patricia Palmeira

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Faria, Camila Cristina Quinello Gomes de
Avaliação da resposta imune após estimulação de monócitos via *Toll-Like Receptor* 2 (TLR-2) em recém-nascidos a termo e pré-termo / Camila Cristina Quinello Gomes de Faria. -- São Paulo, 2013.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Pediatria.
Orientadora: Patricia Palmeira.

Descritores: 1.*Toll-like receptor* 2 2.Imunidade inata 3.Recém-nascido prematuro 4.Monócitos 5.Peptídeos e proteínas de sinalização intracelular 6.Vias de sinalização 7.Fagocitose

USP/FM/DBD-251/13

Aos meus pais e irmã

Dedico esta tese aos meus pais Arly e Marlene e à minha irmã Carolina que sempre me apoiaram e me incentivaram a buscar a realização dos meus sonhos, mesmo que fosse necessário ficarmos distantes e que minha ausência perduraria por um longo período. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, pelo carinho e amor absoluto.

Agradecimento especial

À minha orientadora Dra. Patricia Palmeira por mais essa oportunidade oferecida, pela confiança depositada e, principalmente, agradeço pela disponibilidade, pela atenção, pelas conversas, pelos conselhos, por poder contar sempre com o seu apoio. Todos esses anos trabalhando juntas contribuíram decisivamente para o meu crescimento como profissional e como pessoa.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus por me guiar todos os dias, por me dar forças para superar todas as dificuldades e me manter forte para seguir em frente.

Este espaço é dedicado a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho. Não sendo possível citar a todos, há, no entanto, alguns a quem não posso deixar de manifestar o meu apreço e agradecimento sincero:

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

Às colegas do Laboratório LIM-36:
À Ana Lucia Silveira Lessa, pelo companheirismo e pela ajuda em todos esses anos dedicados ao nosso trabalho.
À Camila Rennó, pelo companheirismo, pela sua disponibilidade e contribuição durante o desenvolvimento do trabalho e, principalmente, pela paciência dedicada a mim nos vários momentos de tensão.
À Letícia Zicari Boneder, pela alegre convivência e companheirismo e que, mesmo permanecendo por pouco tempo em nosso laboratório, contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho.
À Laila Lima, pela dedicação e disponibilidade em todos os momentos, agradeço muito por toda a ajuda concedida.

À Claudia Zago pelos conselhos e ensinamentos em toda a parte experimental, especialmente na Citometria de Fluxo.
Agradeço a todos os integrantes do LIM-36, em especial à Fernanda Macaferri e à Jerusa Arantes pela ajuda diária.

Aos integrantes do Laboratório de Imunologia Humana: Otávio Cabral Marques e Josias Brito pela ajuda e ensinamentos para que o trabalho fosse iniciado.

Agradeço também às colegas do extinto Laboratório de Imunologia de Mucosas, Simone Corrêa da Silva, Elaine Cristina Cardoso e Christina Arslanian Kubo pela contribuição no início do trabalho.

A todos os profissionais do Centro Obstétrico do Hospital Universitário da USP, em especial ao Dr. Marco Antônio Cianciarullo e aos 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.

Às mães que cederam gentilmente as amostras de sangue de cordão umbilical para que fosse possível a realização deste trabalho.

Aos membros da Banca examinadora do Exame de Qualificação: Dr. Dewton de Moraes Vasconcelos, Dra. Milene Tino de Franco, Dr. Werther Brunow de Carvalho que aceitaram gentilmente meu convite e contribuíram de forma construtiva com sugestões para o melhor desenvolvimento do trabalho.

Ao estatístico Dr. Ulysses Doria Filho pela atenção na elaboração das análises estatísticas.

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

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

E, finalmente, agradeço aos meus amigos que sempre estiveram do meu lado e, mesmo a longas distâncias, nossa amizade se manteve intacta e meu silêncio nunca foi motivo para que me deixassem no esquecimento.
Muito obrigada!

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

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVOS 23

2.1 Objetivos específicos **23**

3. MATERIAIS E MÉTODOS 25

3.1 Ética **25**

3.2 Casuística **25**

3.2.1 Obtenção de amostras de sangue de cordão umbilical **25**

3.2.2 Amostras controle de sangue de adultos saudáveis **26**

3.3 Agonista do TLR-2 **27**

3.4 Dosagem de citocinas nas amostras de soro de cordão umbilical **27**

3.5 Estudo funcional dos monócitos **28**

3.5.1 Separação celular para a obtenção das células mononucleares do sangue **28**

3.5.2 Cultura de Monócitos **29**

3.6 Caracterização dos leucócitos do sangue de cordão **31**

umbilical por Imunofenotipagem

3.7 Análise da função fagocítica e *burst* oxidativo pelo método de DHR **34**

3.8 Análise da cascata de sinalização intracelular em cultura de monócitos **36**

3.8.1 Extração de proteínas totais **36**

3.8.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) **36**

3.8.3 Transferência das proteínas para nitrocelulose **37**

3.8.4 *Western blotting* **37**

3.8.5 *Phosflow* **38**

3.9 Análise Estatística **40**

4. RESULTADOS **43**

4.1 Análise do Grupo Amostral **43**

4.2 Dosagem de citocinas nas amostras de soro de cordão umbilical **51**

4.3 Estudo funcional dos monócitos **57**

4.4 Caracterização dos leucócitos do sangue total por Imunofenotipagem **62**

4.5 Análise da função fagocítica e *burst* oxidativo pelo método de DHR **71**

4.6 Análise da via de sinalização intracelular de TLR-2 em monócitos **77**

4.6.1 Extração de proteínas totais dos monócitos em cultura **77**

4.6.2 *Western blotting* **77**

4.6.3 *Phosflow* **79**

5. DISCUSSÃO 83

6. CONCLUSÕES 110

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 113

APÊNDICES

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

1G	Primeiro gemelar
2G	Segundo gemelar
AP-1	*Activator protein 1*
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
cAMP	(*Cyclic adenosine monophosphate*) adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
cDNA	DNA complementar
CO_2	Gás carbônico
DHR	Dihidrorodamina-123
DC	Célula dendrítica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DUM	Data da última menstruação
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERK	*Extracellular-signal-regulated kinases*
et al	E outros
Fe	Ferro
FSC	*Forward scatter*
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HLA-DR	*Human leukocyte antigens (HLA)-DR*
HIV	*Human immunodeficiency virus* (Vírus da imunodeficiência humana)
HOCl	Ácido hipocloroso
HTLV	*Human T lymphotropic virus type 1* (Vírus T-linfotrópico humano)

IFN-α	*Interferon-alfa*
IFN-β	*Interferon-beta*
IFN-γ	*Interferon-gama*
IgG	Imunoglobulina de classe G
IL-	Interleucina
IRAK	*IL-1 receptor associated kinase*
IKK	*IkappaB kinase*
IκB	*IkappaB protein*
JNK	*c-Jun N-terminal kinases*
kDa	*kilodalton*
LPS	Lipopolissacarídeo
LRRs	*Leucine-rich repeat* (Repetições Ricas em Leucina)
LTA	*Lipoteichoic acid* (Ácido lipoteicóico)
MAL	*MyD88-adaptor-like protein*
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
M_{ean}FI	*Mean fluorescence intensity* (Média de Intensidade de Fluorescência)
MFI	*Median fluorescence intensity* (Mediana de Intensidade de Fluorescência)
MHC	*Major Histocompatibility Complex* (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
MyD88	*Myeloid differentiation primary response gene (88)*
NADPH	*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NF-κB	*Nuclear factor-κB*
$O2^{\cdot -}$	Ânion superóxido
$OH^{\cdot}$	Radical hidroxila
PAMPs	*Pathogen Associated Molecular Patterns* (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Proteína C reativa
pg/ml	Picograma por mililitro
PMA	*Phorbol 12-myristate 13-acetate*
PRRs	*Pattern recognition receptors* (Receptores de Reconhecimento de Padrões)
PT	Pré-termo
RN	Recém-nascido
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	*Reactive Oxygen Species* (espécies reativas de oxigênio)
rpm	Rotações por minuto
SAPK	*Stress-activated protein kinase*
SDS-PAGE	*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	Peróxido dismutase
SSC	*Side scatter*
TAK-1	*Transforming growth factor b-activated kinase 1*
TBS	Tampão *Trizma-base*
Th1	*T helper type 1*
Th2	*T helper type 2*

Th17	*T helper type 17*
TIR	*Toll/IL-1-receptor homologous region*
TIRAP	*TIR-domain-containing adaptor protein*
TLR	*Toll-Like receptor*
TNF-α	*Tumor necrosis fator-alfa* (Fator de Necrose Tumoral-alfa)
TPL-2	*Protein tumor progression locus 2*
TRAF-6	*Tumour-necrosis-factor-receptor-associated factor-6*
UTIN	Unidades de Terapia Intensiva Neonatal
WHO	*World Health Organization*

RESUMO

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.**

O sistema imune neonatal tem sido considerado funcionalmente imaturo e recentes estudos sugerem que a suscetibilidade do neonato às infecções pode ser devido a alterações funcionais de células apresentadoras de antígenos que podem levar a deficiências secundárias nas respostas adaptativas. A ativação das células apresentadoras de antígenos é desencadeada pela estimulação de receptores, como os *Toll-like Receptors* (TLRs) e alterações na ativação desses receptores podem levar a uma subsequente redução da ativação de proteínas da via de sinalização intracelular e consequente alterações dos níveis das citocinas pró- e anti-inflamatórias, contribuindo assim, para uma resposta imune ineficiente do neonato. O *Toll-like receptor 2* (TLR-2) é um receptor essencial para o reconhecimento seletivo de vários antígenos bacterianos e virais, em especial, o peptideoglicano, que compreende cerca de 50% da parede celular de bactérias Gram-positivas, como os estafilococos, que são agentes infecciosos que prevalecem nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal. O objetivo deste estudo foi avaliar a ativação e resposta de monócitos de sangue do cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo saudáveis <34 semanas de gestação (Grupo 1), recém-nascidos pré-termo ≥ 34 e <37 semanas de gestação (Grupo 2) e recém-nascidos a termo (Grupo 3) e de adultos saudáveis, como controles, após a estimulação de TLR-2 *ex-vivo* com Pam3CSK4. Após a estimulação dos monócitos, foram determinados os níveis de expressão dos marcadores de ativação celular, os níveis das citocinas pró- e anti-inflamatórias e a expressão de moléculas

envolvidas na sinalização intracelular. A caracterização das populações leucocitárias, bem como a capacidade fagocítica de *Staphylococcus aureus* e geração de *burst* oxidativo por monócitos e neutrófilos foram analisados por Citometria de Fluxo. Os resultados demonstraram que as células dendríticas e monócitos de neonatos expressam TLR-2 em níveis semelhantes aos de adultos. A expressão adequada de TLR-2 sugere um reconhecimento antigênico eficiente que é refletido em uma ativação apropriada das moléculas da cascata de sinalização e uma potente produção de citocinas pró-inflamatórias, apesar da reduzida produção de IL-10. Fagócitos neonatais apresentaram capacidade fagocítica de *S. aureus* reduzida em relação aos adultos e geração do *burst* oxidativo semelhante entre os grupos, no entanto neonatos pré-termo apresentaram produção de peróxido de hidrogênio deficiente, o que poderia contribuir com uma reduzida morte intracelular deste microrganismo. Em conclusão, o recém-nascido não apresenta uma imaturidade funcional, mas sim, um desequilíbrio em sua resposta imune inata, com uma aparente menor produção de fatores anti-inflamatórios, o que pode levar a predisposição à sepse.

Descritores: *Toll-like receptor* 2; Imunidade inata; Recém-nascido prematuro; Monócitos; Peptídeos e proteínas de sinalização intracelular; Vias de sinalização; Fagocitose.

SUMMARY

Faria CCQG. **Evaluation of the immune response after stimulation of monocytes via Toll-Like Receptor 2 (TLR-2) in preterm and term newborns [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.**

The neonatal immune system has been considered functionally immature and recent studies suggest that susceptibility of the neonate to infections may be due to functional alterations in antigen-presenting cells that can prompt to secondary deficiencies in adaptive responses. The activation of antigen-presenting cells is triggered by stimulation of receptors such as Toll-like receptors (TLRs) and changes in the activation of these receptors may lead to a subsequent reduction in the activation of intracellular signaling pathway proteins and consequent changes in pro- and anti-inflammatory cytokine levels, thus contributing to an inefficient immune response of the neonate. Toll-like Receptor 2 (TLR-2) is an essential receptor for the selective recognition of several bacterial and viral antigens, in particular, peptidoglycan, which comprises about 50% of the Gram-positive bacteria cell wall, such as staphylococci, which are infectious agents that prevail in Neonatal Intensive Care Units. The aim of this study was to evaluate the activation and response of monocytes derived from umbilical cord blood of healthy preterm newborns <34 weeks of gestation (Group 1), preterm newborns ≥34 and <37 weeks of gestation (Group 2) and term newborns (Group 3) and from healthy adults, as controls, after ex-vivo TLR-2 stimulation with Pam3CSK4. After monocyte stimulation, it was determined the expression levels of cellular activation markers, pro- and anti-inflammatory cytokine levels and the expression of molecules involved in downstream intracellular signaling. The characterization of leukocyte populations, as well as the phagocytic ability of

Staphylococcus aureus and generation of oxidative burst by monocytes and neutrophils were analyzed by flow cytometry. The results demonstrated that neonatal dendritic cells and monocytes express TLR-2 at similar levels to those of adults. The proper expression of TLR-2 suggests an efficient antigen recognition which is reflected in an appropriate activation of downstream signaling molecules and potent production of pro-inflammatory cytokines, in spite of the reduced production of IL-10. Neonatal phagocytes showed reduced phagocytic capacity of *S. aureus* compared to adults and similar generation of oxidative burst between groups, however preterm neonates showed deficient production of hydrogen peroxide, which could contribute to a reduced intracellular killing of this microorganism. In conclusion, the newborn does not present a functional immaturity, but an imbalance in its innate immune response, with an apparent lower production of anti-inflammatory factors, which can lead to a predisposition to sepsis.

Descriptors: Toll-like receptor 2; Immunity innate; Preterm newborn; Monocytes; Intracellular signaling peptides and proteins; Intracellular signaling; Phagocytosis.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Ao nascimento, o neonato apresenta uma maior suscetibilidade a agentes infecciosos devido à imaturidade funcional de seu sistema imune. Algumas funções são particularmente imaturas, enquanto outros aspectos são funcionais ao nascimento, mesmo em recém-nascidos extremamente prematuros (Levy, 2007).

Os neonatos, particularmente aqueles nascidos prematuros, são mais vulneráveis à morbidade e mortalidade devido a infecções. A imaturidade do sistema imune inato associada à necessidade de procedimentos médicos invasivos no contexto de um nascimento prematuro torna estas crianças altamente suscetíveis a patógenos neonatais comuns (Sharma et al., 2012).

Onze por cento de todos os bebês nascem prematuros (menos de 37 semanas de gestação), o que representa cerca de 12,9 milhões de crianças nascidas prematuramente a cada ano em todo o mundo (Beck et al., 2010). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 3,7 milhões de recém-nascidos com menos de 28 dias morreram em 2010, 37% dessas mortes foram em consequência de causas infecciosas (WHO, World Health Statistics: 2010). A incidência de sepse precoce em neonatos nascidos a termo é de 0,1%, enquanto em recém-nascidos pré-termo pode chegar a 0,4%. (Filias et al., 2011).

A incidência de infecção pode variar muito, dependendo da idade gestacional, com uma maior ocorrência de infecção grave e mortalidade nos primeiros 3 a 7 dias de vida em recém-nascidos prematuros de muito baixo peso ao nascimento (Lukacs et al., 2004; Wynn e Wong, 2010; Cuenca et al., 2013).

Bebês nascidos a termo se beneficiam de proteção suplementar proporcionada pelos anticorpos 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 (Palmeira et al., 2012; van den Berg et al., 2010).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo contra a invasão de patógenos e sua ativação é um passo essencial no desenvolvimento da imunidade adquirida antígeno-específica.

O sistema imune inato neonatal é marcado por defeitos quantitativos e qualitativos dos neutrófilos, redução dos níveis de moléculas do complemento, deficiente quimiotaxia e fagocitose durante os primeiros 2 meses de vida e a reduzida atividade da imunidade adaptativa é consequente da ausência de células T de memória e baixa produção de imunoglobulinas por células B (Peoples et al., 2009).

Após a atuação das barreiras físicas, químicas, biológicas e de componentes solúveis presentes no sangue ocorre a ativação das chamadas células apresentadoras de antígenos (APCs) “profissionais”. As APCs profissionais são assim denominadas por: (i) apresentarem

moléculas de MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe II, constitutivamente, na membrana celular; (ii) expressarem moléculas co-estimuladoras na sua superfície; (iii) por serem eficientes no processamento e apresentação de antígenos. Estas compreendem: células dendríticas (DCs), monócitos/macrófagos e linfócitos B (Trombetta e Mellman, 2005).

Após o reconhecimento dos patógenos, as APCs migram do tecido infectado para os linfonodos regionais, onde apresentam o antígeno capturado e processado em sua superfície, juntamente com o MHC de classe II para as células T CD4 *naïve* (Aderem e Ulevitch, 2000; Janeway e Medzhitov, 2002). Uma eficiente ativação de células T requer a ativação, principalmente, das células dendríticas, a qual envolverá a indução de moléculas co-estimuladoras tais como CD80, CD86 e CD40, bem como produção das citocinas IL-6, IL-12, IL-1β e TNF-α.

Atividade dos Monócitos Neonatais

Monócitos circulantes aparecem pela primeira vez no sangue fetal com aproximadamente 18 a 20 semanas de gestação e aumentam com a idade gestacional atingindo, ao nascimento, uma concentração superior à da maioria dos adultos. Os monócitos, ainda, sofrem diferenciação nos tecidos, onde se tornam macrófagos mononucleares ou células dendríticas (Pérez et al., 2010; Lewis e Wilson, 2011).

Os monócitos são originados da medula óssea de um progenitor mielóide comum compartilhado com neutrófilos, sendo liberados no

sangue periférico onde circulam por vários dias antes de migrarem para os tecidos e recompor a população de macrófagos teciduais. Sua morfologia, como monócitos maduros na circulação, é heterogênea e constitui cerca de 5 a 10% de todos os leucócitos do sangue periférico em humanos. São APCs variáveis no tamanho e na morfologia nuclear e apresentam diferentes graus de granulosidade (Gordon e Taylor, 2005).

A identificação inicial dos monócitos é feita pela expressão de grandes quantidades de CD14 em sua superfície, o qual faz parte do receptor para o lipopolissacarídeo bacteriano (Sanchez-Torres, et al., 2001).

Recentes estudos mostram que os monócitos podem ser divididos em duas subpopulações principais: células $CD14^{+}CD16^{-}$ e células $CD14^{+}CD16^{+}$. A primeira, denominada como "clássica", compreende 80 a 90% do total de monócitos. A segunda subpopulação, de monócitos $CD14^{+}CD16^{+}$, é denominada "inflamatória", por apresentar elevada capacidade de produzir altos níveis de citocinas inflamatórias, habilidade aumentada de apresentação antigênica, em razão da alta expressão de MHC de classe II e expressão de genes envolvidos na fagocitose mediada pelo receptor Fcγ (CD16), além de altos níveis de expressão de *Toll-like receptors* 2 e 4 (TLR-2 e TLR-4) (Ziegler-Heitbrock, 2007; Sohlberg et al., 2011; Gordon e Taylor, 2005).

Embora monócitos clássicos pareçam ser menos eficientes no processo de apresentação antigênica, eles exibem um papel essencial no desenvolvimento da imunidade inata (Pérez et al., 2010). Além de sua

atividade como APC, os monócitos apresentam uma função central na fagocitose, morte de microrganismos, produção de citocinas e indução de células efetoras (Unanue, 2002). Essas células interagem com linfócitos T *naïve* formando a "sinapse imunológica", o que leva à maturação e a geração de células T efetoras totalmente ativadas (Pérez et al., 2010).

O reconhecimento do peptídeo associado a moléculas de MHC na superfície das APCs profissionais se dá através do TCR. Este reconhecimento dos peptídeos+MHC pelo TCR promove uma ativação destes linfócitos devido à fosforilação das tirosinas na cadeia citoplasmática da molécula CD3 e leva à transdução de sinais que culminam em ativação de diversos genes, como por exemplo, o gene da IL-2 (Janeway, 2001). Esse reconhecimento inicial gera um sinal que só é suficiente para ativar completamente os linfócitos de memória, pois a expansão clonal de linfócitos T *naïve* requer também outro sinal. Este segundo sinal é emitido pelas APCs e se dá através do reconhecimento de moléculas co-estimuladoras por moléculas ligantes correlacionadas nos linfócitos T, como: (i) CD80 e CD86 – CD28; (ii) CD2 – CD58; (iii) CD40L - CD40; (iv) ICAM - LFA-1. A emissão deste segundo sinal desencadeia a sinapse imunológica. O termo sinapse imunológica foi cunhado para denominar o ponto de contato entre os linfócitos T e as APCs (Banchereau e Steinman, 1998; Mahnke et al, 2002).

Existem diferenças quantitativas e qualitativas entre monócitos e APCs de recém-nascidos e adultos. Diferenças qualitativas em

monócitos são evidentes no útero, a fenotipagem de monócitos circulantes neonatais ou fetais no terceiro trimestre de gestação, realizada por citometria de fluxo, revela que os níveis de expressão de moléculas de MHC classe II são reduzidos, contribuindo potencialmente para uma atividade deficiente como célula apresentadora de antígenos (Jones et al., 2002).

Toll-Like Receptors

A ativação das APCs é desencadeada por receptores expressos na superfície ou em compartimentos intracelulares destas células e de outras células do sistema imune, denominados Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs, do inglês *Pattern recognition receptors*), que têm a capacidade de discriminar entre os microrganismos e o próprio, pois reconhecem padrões moleculares presentes nos patógenos (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*), encontrados em uma ampla variedade de microrganismos e ausentes em nosso organismo (Akira et al., 2006; Aderem e Ulevitch, 2000; Banchereau e Steinman, 1998; Janeway e Medzhitov, 2002).

Entre os mais importantes da família de PRRs estão os *Toll-like Receptors* (TLR) que reconhecem, com seletividade, um grande número de variados e complexos PAMPs (Arancibia et al., 2007). O descobrimento dos *Toll-like* receptors e seu papel crucial no reconhecimento de patógenos virais, bacterianos, parasitários e fúngicos estabeleceu definitivamente a imunidade inata como um elo

entre a detecção e reconhecimento dos micróbios e a ativação do sistema imune adaptativo.

Toll-like receptors desempenham um papel importante no reconhecimento de patógenos e início das respostas inflamatória e imune. Sua estimulação por produtos microbianos leva à ativação de vias sinalizadoras que resultam na ativação de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias (Janeway e Medzhitov, 2002).

TLRs são proteínas que possuem um domínio intracelular altamente conservado, conhecido como TIR (*Toll/IL-1-receptor homologous region*), envolvido na interação proteína-proteína, o qual é necessário para iniciar a via de sinalização intracelular. O domínio extracelular, com repetições ricas em leucina (LRRs, *Leucine-rich repeat*), está relacionado ao reconhecimento do ligante. As LRR variam entre os diferentes TLRs, embora a forma como eles possam discriminar entre os diferentes PAMPs ainda permanece obscura (Arancibia et al., 2007).

Em mamíferos existem, pelo menos, 10 membros da família de TLR capazes de reconhecer componentes específicos conservados entre microrganismos. TLR 1, 2, 4, 5 e 6 estão presentes na membrana plasmática e TLR 3, 7, 8 e 9 estão localizados em compartimentos intracelulares (Angelone et al., 2006; Beutler, 2005). Quanto ao TLR-10, este é encontrado nos linfócitos B e em células dendríticas, porém, a sua localização na célula e seu ligante microbiano específico ainda é desconhecido (Lewis e Wilson, 2011).

Em particular, o *Toll-like receptor* 2 desempenha uma função central no reconhecimento de bactérias Gram-positivas através do reconhecimento de variadas PAMPs na parede celular, incluindo ácido lipoteicóico, lipoproteínas, peptideoglicano, glicosilfosfatidinositol em parasitas, além de espécies de *Clamydia e Candida* e hemaglutininas virais, entre outros (Mogensen, 2009; Gay e Gangloff, 2007; Takeda et al., 2003; Akira, 2003; Kumar et al., 2009; Vadillo e Pelayo, 2012).

A diversidade de ligantes reconhecidos pelo TLR-2 é possível por que esse receptor pode reconhecer ligantes em associação a TLRs estruturalmente próximos a ele, como o TLR-1 e TLR-6. A principal consequência dessa cooperação é o aumento do repertório de especificidades de ligantes (Kumar et al., 2009). Os heterodímeros de TLR-2/1 são capazes de reconhecer triacil lipopeptídeo derivado de bactérias Gram-negativas e a β-defensina-3, peptídeo antimicrobiano capaz de ativar monócitos e células dendríticas (Funderburg et al., 2007), além de um agonista sintético conhecido como Pam3CSK4. A associação entre TLR-2/6 permite o reconhecimento de diacil lipopeptídeo e ácido lipoteicóico (LTA) presentes em bactérias e zymosan, presente em fungos (Akira et al., 2006).

A importância de TLR-2 na defesa contra bactérias Gram-positivas é comprovada em vários estudos que mostraram uma maior susceptibilidade ao desafio com *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* em camundongos deficientes de TLR-2 em

comparação aos camundongos selvagens (Echchannaoui et al., 2002; Mancuso et al., 2004; Takeuchi et al., 2000).

A ativação da cascata de sinalização via TLR se inicia a partir de um estímulo por uma PAMP apropriada, provocando o recrutamento e associação das moléculas adaptadoras TIRAP (*TIR-domain-containing adaptor protein*, também conhecida como *MyD88-adaptor-like protein*, MAL) e MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) através da interação domínio TIR-TIR (**Figura 1**) (Ulrichts e Tavernier, 2008). Uma vez que a MyD88 se liga a cauda do receptor, ocorre o recrutamento e ativação de membros da família IRAK (*IL-1 receptor associated kinase*). IRAK-4 é recrutado, ativado e, em seguida, IRAK-1/2 são sequencialmente fosforilados, sendo IRAK-4, particularmente importante por ser indispensável na indução da resposta a IL-1 e outros ligantes de TLR. Em seguida, IRAK-1 e IRAK-2 são associadas ao TRAF-6 (*tumour-necrosis-factor-receptor-associated factor-6*) que age como uma ligase de ubiquitina e, junto com o complexo enzimático de ubiquitinação catalisa a síntese de cadeias poliubiquitinadas em sua própria molécula e em outros substratos, incluindo membros do complexo IKK (*IkappaB kinase*) e IκB (*IkappaB protein*). Um papel central nos eventos de sinalização da cascata é o recrutamento da TAB-2 (Proteína 2 ligante de TAK-1, *Transforming growth factor b-activated kinase 1*) e TAB-3 que se associam ao TRAF-6 ubiquitinado, o qual se liga a TAK-1 levando a sua ativação. TAK-1, então, estimula a ativação de duas vias distintas, uma envolvendo o complexo IKK e outra, a via da

MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*). Na primeira via, a ativação de TAK-1 leva a ativação do complexo IKK, composto pelas quinases IKKα e IKKβ, bem como a IKKγ (NEMO) resultando na fosforilação de IKKα e IKKβ que, por sua vez, estimulam a fosforilação da proteína IκB (Mogensen, 2009). Após sua fosforilação, IκB é ubiquitinado e degradado no proteassomo, permitindo a ativação e translocação de NF-κB (*nuclear factor-κB*) para o núcleo da célula, onde se liga a sítios κB presentes em promotores e intensificadores de uma ampla gama de genes pró-inflamatórios, que são, então, transcritos (Mogensen, 2009; Vadillo e Pelayo, 2012).

Na segunda via, TAK-1 fosforila membros da família MAPK (MKK) incluindo MKK3, 4, 6, e 7. MKK3/6 fosforilam e ativam a proteína p38, enquanto que MKK4/7 ativam a JNK (*c-Jun N-terminal kinases*). A molécula TPL-2 (*Protein tumor progression locus 2*), membro da família MKK, medeia a ativação de ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase 1/2*) pela mesma via. Por fim, essas vias de sinalização levam a ativação do fator de transcrição AP-1 (*Activator protein 1*), o qual contribui com a regulação da produção das citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, assim como a proliferação e sobrevida celular (Mogensen, 2009; Yamamoto e Takeda, 2010; Risco et al., 2012; Vadillo e Pelayo, 2012).

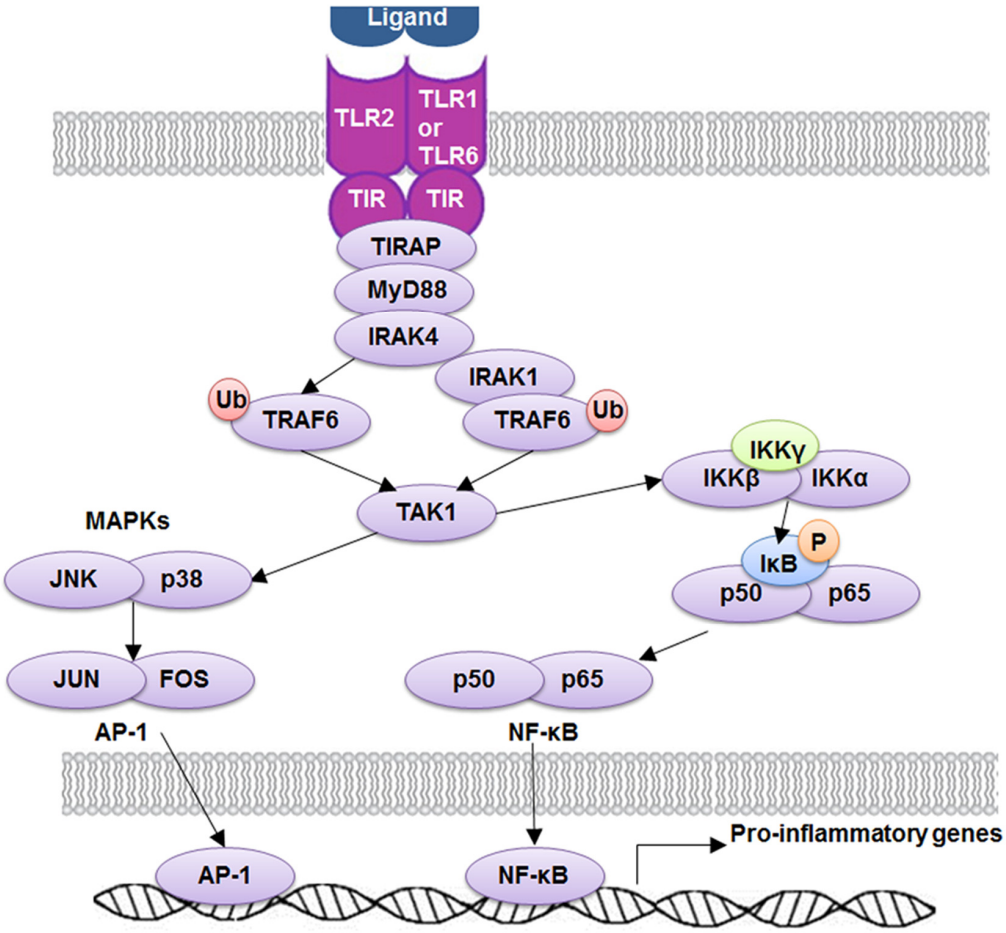


Figura 1: *Adaptado de Zhang Y et al., PLoS One, 2013.*

A função essencial e não redundante iniciada pela TAK-1 é fortemente sugerida pela resposta significativamente reduzida de NF-κB, JNK e p38 a vários ligantes de TLR em células derivadas de camundongos deficientes dessa quinase (Mogensen, 2009).

A ligação do TLR ao seu ligante em APCs resulta na ativação e maturação destas células, observada através do aumento da expressão das moléculas co-estimuladoras que serão importantes no início da resposta imune adaptativa (Kadowaki et al., 2001). Portanto, alterações funcionais nas APCs podem levar a deficiências secundárias nas respostas de células T (Zinkernagel, 2001).

Dados da literatura mostram o envolvimento dos TLRs na regulação da hematopoiese precoce em vertebrados. Nagai et al. (2006) reportaram que TLR-2 e 4 são expressos desde os estágios mais precoces da diferenciação hematopoiética murina e que, ao serem estimulados pelos seus ligantes Pam3CSK4 e Lipopolissacarídeo (LPS), respectivamente, induzem as células-tronco e progenitores mielóides a entrarem no ciclo celular e promoverem sua diferenciação em granulócitos e macrófagos, ignorando a necessidade de fatores de crescimento e diferenciação. Estimulação semelhante em progenitores linfoides promove a produção de células dendríticas, sugerindo que, o reconhecimento de componentes microbianos é possível desde as etapas mais precoces da hematopoiese.

A compreensão dos mecanismos da imunidade inata progrediu notavelmente a partir do descobrimento dos receptores *Toll-like*, que não somente participam da indução da secreção de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de moléculas co-estimuladoras implicadas na modulação da resposta imune, mas também no controle dos eventos que antecedem a hematopoiese (Vadillo e Pelayo, 2012).

Fagocitose e burst oxidativo

Neutrófilos e macrófagos são as principais células da resposta imune inata e representam a primeira linha de defesa contra patógenos. Ambos possuem uma gama de dispositivos antimicrobianos (Aderem e Underhill, 1999). No entanto, a eficiência da fagocitose bacteriana

depende basicamente da opsonização do patógeno, assim como o estado de ativação do fagócito (Stout e Suttles, 2004). A opsonização ocorre quando um microrganismo é revestido com moléculas que favorecem a fagocitose. As principais proteínas envolvidas nesta função são: a imunoglobulina de classe G (IgG), frações C3b e C3bi do sistema complemento e a fibronectina.

Os neutrófilos são as células fagocíticas recrutadas mais precocemente, as quais migram do sangue para os tecidos com o objetivo de ingerir e destruir os microrganismos evitando, assim, a infecção (Vasselon e Detmers, 2002). Os neutrófilos englobam e digerem os microrganismos através da ação de proteínas e enzimas microbicidas digestivas contidas nos seus grânulos citoplasmáticos tornando-as capazes de hidrolisar polissacarídeos simples e complexos além de proteínas, lipídeos e outros substratos (Faurschou e Borregaard, 2003; Chen et al., 2011).

Os macrófagos apresentam grande plasticidade funcional, permitindo uma adaptação fenotípica rápida às mudanças no microambiente (Stout e Suttles, 2004). A esse respeito, a ativação clássica dos macrófagos por *interferon* (IFN)-γ e fator de necrose tumoral (TNF) aumenta sua expressão de receptores de reconhecimento (PRRs), levando ao aumento da fagocitose. Além disso, os mecanismos microbicidas, como o *burst* oxidativo são altamente regulados de forma mais eficaz para eliminar as bactérias (Soehnlein et al., 2008).

O processo de digestão do microrganismo envolve basicamente dois eventos celulares: degranulação no vacúolo fagocítico com a formação do fagolisossomo e o *burst* respiratório com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*) (Hampton et al., 1998), seguidos da liberação de citocinas inflamatórias pelos fagócitos (Babior, 1999; Babior, 2000).

Neutrófilos e macrófagos produzem espécies reativas de nitrogênio e espécies reativas de oxigênio por um mecanismo denominado *burst* oxidativo, além de citocinas e quimiocinas, que amplificam e dirigem a resposta imune (Hoebe et al., 2004). Além disso, os monócitos e macrófagos possuem diferentes enzimas hidrolíticas em seus lisossomos, que contribuem para a degradação dos patógenos internalizados (Appelberg, 2006).

De modo geral, as espécies reativas de oxigênio consequentes da fagocitose são geradas principalmente através da ativação da NADPH (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxidase, uma enzima complexa que consiste de três subunidades citosólicas e duas subunidades de membrana. A separação destes dois grupos de componentes em compartimentos distintos garante a inatividade do complexo enzimático em células inativadas. Após o reconhecimento do agente invasor, ocorre a organização do complexo NADPH oxidase na membrana plasmática, seguida da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS). Como a produção dessas ROS é associada a um aumento abrupto do consumo de oxigênio, o evento metabólico no qual

elas são geradas é chamado *burst* ("explosão") respiratório ou *burst* oxidativo. O precursor destes oxidantes reativos é o radical ânion superóxido ($O2^{\cdot -}$), o qual é convertido, em sua maior parte, em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Apesar de não ser um radical livre devido à ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H_2O_2 é um metabólito extremamente deletério, pois participa da reação que produz o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), que é altamente tóxico para as células, pois, a combinação extremamente rápida do $OH^{\cdot}$ com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Assim, se o radical for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, como íon Fe++, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, o $OH^{\cdot}$ pode inativar várias proteínas de membrana celular e enzimas ao oxidar seus grupos sulfidrilas a pontes dissulfeto. Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (Ferreira e Matsubara, 1997).

Contudo, outros fatores contribuem para uma eficiente função do sistema fagocitário, 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).

Todos os estímulos pró-inflamatórios, metabólicos e imunológicos provocam o aumento do recrutamento de monócitos para locais

periféricos, onde ocorre a diferenciação em macrófagos e células dendríticas, contribuindo assim, para a defesa do hospedeiro, remodelação e reparação tecidual (Gordon e Taylor, 2005).

Como já foi discutido anteriormente, os monócitos têm um papel crucial na resposta imune primária devido a sua habilidade de fagocitar e degradar patógenos bacterianos. Por fim, esses eventos podem levar o monócito a dois caminhos distintos, ou seja, monócitos podem migrar para os tecidos linfoides e ativar o sistema adaptativo, ou podem sofrer apoptose, proporcionando sua morte induzida pela fagocitose (Gille et al., 2009).

A fagocitose das células apoptóticas pelos monócitos é importante, pois proporciona a homeostasia tecidual através da remoção de leucócitos infectados, como por exemplo, os neutrófilos em tecidos inflamados. A remoção tardia pode levar a necrose secundária das células apoptóticas e, então, perpetuar a inflamação e consequentemente, destruição tecidual (Gille et al., 2009).

Padrão de citocinas inflamatórias produzidas por monócitos

A produção de citocinas em resposta a ligantes de TLR é uma das características relevantes de monócitos e macrófagos teciduais (Sohlberg et al., 2011).

Embora muitos estudos tenham mostrado um padrão distinto da produção de citocinas pelas APCs neonatais quando comparados aos adultos, poucos têm abordado os mecanismos responsáveis por tais

diferenças. Evidências recentes indicam que o estado fisiológico distinto de células mononucleares neonatais ao nascimento, incluindo sua exposição a distintos fatores humorais inerentes à gestação e/ou ao nascimento, poderiam contribuir substancialmente para a polarização de suas respostas de citocinas mediadas por TLR. Em nota, as células mononucleares do sangue de cordão-umbilical contêm uma concentração intracelular aproximadamente 20 vezes maior de segundo mensageiro de cAMP (Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) (Levy et al., 2006), uma molécula que pode ativar a via dependente e independente da proteína kinase para inibir a produção de TNF induzida por um estímulo (Hasko e Cronstein, 2004). Neste caso, cAMP pode reduzir a produção de TNF através da fosforilação da MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) (Zhang et al., 2006), molécula crucial cuja ativação induz a produção do TNF. Ainda, cAMP é também conhecido por inibir várias outras citocinas como IFN-α, IFN-β e IL-12, que são pouco expressas em monócitos neonatais, enquanto preservam ou aumentam a expressão de outras citocinas produzidas por APCs neonatais como a IL-6, IL-10 e a IL-23 (Schnurr et al., 2005).

Alguns defeitos funcionais de fagócitos mononucleares neonatais têm sido documentados, comparados aos seus homólogos adultos, que evidenciam imaturidade, produção diminuída de citocinas e fagocitose alterada. Monócitos e macrófagos neonatais produzem baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-1β ou IL-12, em resposta aos ligantes de TLR e, por outro lado, altos níveis de IL-6, IL-8, IL-10 e

IL-23 (Levy, 2007). Essas alterações provavelmente resultam em vias de sinalização ligadas ao TLR pouco eficientes, mas a natureza destas deficiências ainda não está bem elucidada. Embora monócitos neonatais expressem RNA mensageiro (mRNA) para os diferentes TLR em níveis similares aos de monócitos de adultos, esses dados não excluem possíveis diferenças na expressão da proteína destes receptores. Por exemplo, embora os níveis de mRNA da molécula MyD88 estejam normais em monócitos do sangue de cordão, a expressão da proteína é reduzida, contribuindo possivelmente para a deficiente produção de TNF mediada pelo TLR (Yan et al., 2004; Sadeghi et al., 2007). Essas diferenças poderiam constituir mecanismos básicos para a exacerbada suscetibilidade a infecções em bebês prematuros (Velilla et al., 2006).

A relevância potencial da expressão de TLR-2 na saúde e na doença neonatal é o reconhecimento de patógenos que são relevantes para o neonato como *Streptococcus* grupo B, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma hominis*, *C. albicans hyphae* e citomegalovirus (van der Graaf et al., 2005; Henneke e Berner, 2006). Neste contexto, a maturação funcional da expressão do TLR tem sido de muito interesse. Monócitos do sangue de cordão umbilical de pré-termos têm expressão basal de TLR-4 diminuída, mas normal de TLR-2 comparado com monócitos do sangue periférico de adultos (Forster-Waldl et al., 2005). Embora vários estudos estabeleçam a similaridade entre a quantidade e a expressão de TLRs em monócitos do sangue de cordão umbilical de

recém-nascidos a termo e monócitos de sangue periférico de adultos, a funcionalidade da ativação desses TLRs parece ser muito diferente (Levy et al., 2004; Yan et al., 2004).

Justificativa

Apesar dos progressos substanciais na definição dos meios pelos quais produtos microbianos ativam a liberação de citocinas após estimulação de TLRs, pouco se sabe sobre a expressão e função deste sistema em recém-nascidos humanos, particularmente nos pré-termos, uma população em risco relativamente elevado de infecção microbiana e sepse. Alguns estudos que avaliaram a produção e liberação de citocinas comparando-se leucócitos neonatais e de adultos após estimulação *in vitro,* mostraram baixas respostas em neonatos (Levy et al., 2004). No entanto, não existem relatos publicados da atividade de uma gama de ligantes bem definidos para TLR e expressão de seus receptores e moléculas intermediárias envolvidas na sinalização em monócitos neonatais.

Contudo, a resposta imune inata do recém-nascido pode estar sujeita a alterações na ativação de TLR-2 e subsequente redução da ativação das proteínas sinalizadoras podendo levar a alterações nos níveis de expressão gênica e níveis séricos das citocinas pró- e anti-inflamatórias, além da reduzida atividade fagocítica e microbicida dos

fagócitos, contribuindo, assim, para uma resposta imune ineficiente do bebê decorrente de algumas dessas alterações.

O TLR-2 é um receptor essencial para o reconhecimento seletivo de peptideoglicano, que compreende cerca de 50% da parede celular de bactérias Gram-positivas. Dentre estas, estão os estafilococos, que são agentes infecciosos que prevalecem nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), responsáveis por surtos epidêmicos, sendo clássica a infecção por *Staphylococcus aureus* e, mais recentemente, foi reconhecida a importância das infecções por estafilococos coagulase negativos, especificamente por *S. epidermidis*, acometendo preferencialmente os recém-nascidos com reduzida imunocompetência, como os recém-nascidos pré-termo (Sadeck e Ceccon, 2006).

Atualmente, a taxa de infecção bacteriana nas UTIN, situa-se entre 6 e 25%, sendo maior nos recém-nascidos com peso inferior a 1.500 gramas, especialmente naqueles menores de 1.000 gramas (Richards et al., 2003; Nizet e Klein, 2011). Portanto, é de extrema importância realizar uma completa avaliação da atividade do TLR-2, que compreende estimulação, ativação da cascata de sinalização e produção de citocinas para a estimulação dos linfócitos T em recém-nascidos com diferentes idades gestacionais, a fim de comparar a maturação funcional deste receptor.

Em síntese, o estudo da imunidade inata neonatal não só fornece uma visão sobre o desenvolvimento do sistema imune inato humano, mas também fornece valiosas informações sobre possíveis mecanismos

subjacentes de doenças infecciosas neonatais. Uma melhor compreensão destes mecanismos pode levar a novas opções terapêuticas (Sadeghi et al., 2007).

OBJETIVOS

OBJETIVO

Avaliar a ativação de monócitos do sangue de cordão umbilical de recém-nascidos a termo e recém-nascidos pré-termo de diferentes idades gestacionais mediante estimulação via *Toll-like receptor 2* (TLR-2).

Objetivos específicos

1. Quantificar a expressão dos marcadores de ativação e das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 e IL-10 em cultura de monócitos do sangue de cordão umbilical, estimulados ou não, via TLR-2;
2. Avaliar as populações leucocitárias presentes no sangue de cordão umbilical;
3. Determinar a capacidade fagocitária e *burst* oxidativo dos fagócitos mono e polimorfonucleares presentes no sangue de cordão umbilical;
4. Determinar os níveis de expressão das proteínas envolvidas na via de sinalização intracelular, como MyD88, ERK1/2, JNK, p38 e do fator de transcrição NFκB, antes e após estimulação via TLR-2 de monócitos do sangue de cordão umbilical.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Ética

O presente projeto obteve prévia 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 (Protocolo de Pesquisa n°0101/10), e do Comitê de Ética do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (Registros CEP-HU/USP 972/09). Além disso, após a apresentação minuciosa do trabalho, todas as parturientes doadoras assinaram um termo de consentimento pré-esclarecido onde estiveram inteiramente de acordo em participar do mesmo.

3.2. Casuística

3.2.1. Obtenção de amostras de sangue de cordão umbilical

Para o presente trabalho, foram colhidas 17 amostras de recém-nascidos pré-termo com idade gestacional < 34 semanas (Grupo 1), 30 amostras de recém-nascidos pré-termo ≥ 34 e < 37 semanas (Grupo 2) e 47 amostras de recém-nascidos a termo ≥ 37 semanas (Grupo 3). A coleta foi realizada no Centro Obstétrico do Hospital Universitário da USP e no Centro Obstétrico do Instituto Central do Hospital das Clínicas.

Foram utilizados tubos contendo heparina para realização das culturas celulares e para o ensaio de Dihidrorodamina-123 (DHR), tubos com gel separador para a dosagem de citocinas no soro e tubos contendo EDTA para a realização da imunofenotipagem. Antes da coleta, foi realizada uma análise dos prontuários para escolha das possíveis doadoras e aplicação de uma ficha de anamnese à parturiente, estabelecendo os seguintes critérios de inclusão: idade entre 18 e 35 anos; reações sorológicas negativas para doenças infecto-contagiosas como hepatite, HIV e sífilis. Foram estabelecidos como critérios de exclusão: sinais de infecção durante gestação, trabalho de parto prolongado, níveis de proteína C reativa aumentados e hemocultura positiva.

A idade gestacional foi determinada considerando-se a data da última menstruação (DUM) e, quando não foi possível, utilizou-se a ultra-sonografia fetal realizada no primeiro trimestre. Na avaliação clínica da idade gestacional, quando surgiram dúvidas sobre a data da última menstruação e na ausência do exame de ultra-sonografia, foi utilizado o método de Capurro (1978) e New Ballard (1991).

3.2.2. Amostras controle de sangue de adultos saudáveis

Foram obtidas amostras de sangue periférico de adultos saudáveis que foram utilizadas para a padronização e controle dos testes realizados. Os critérios de seleção foram: adultos voluntários saudáveis de 18 a 35 anos, 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 de infecção no período da coleta.

3.3. Agonista do TLR-2

A estimulação das células em cultura foi feita utilizando um lipopeptídeo sintético bacteriano denominado Pam3CSK4 (Catalog # tlrl-pms, *Invivogen, San Diego, CA, USA*) que mimetiza a porção amino-terminal das lipoproteínas bacterianas. O reconhecimento do Pam3CSK4 é mediado pelo TLR-2 que coopera com o TLR-1 através de seus domínios citoplasmáticos. O Pam3CSK4 foi testado nas concentrações de 1, 5 e 10μg/mL em culturas de monócitos a fim de determinar a concentração ideal de estímulo, que foi estabelecida em 5μg/mL.

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

Para auxiliar a identificação de amostras de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos (RNs) a termo e pré-termo que apresentassem uma possível infecção, em associação com os dados do prontuário foram dosadas nas amostras de soro as concentrações basais das citocinas através dos *Kits* de CBA (*BD™ Cytometric Bead Array System, BD Biosciences, San Jose, CA, USA*), *Kit pro-inflammatory*

e *Kit* Th1, Th2, Th17, que incluem as citocinas IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, IL-12p70, IL-2, IL-4, IFN-γ, IL-17A, de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, no teste foram usados 50µl das 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 protegido da luz, todos os tubos foram lavados e analisados por citômetro de fluxo, 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 de PE (MFI, *median fluorescence intensity*) e baseadas na curva padrão obtida para cada citocina.

3.5. Estudo funcional dos monócitos

3.5.1. Separação celular para a obtenção das células mononucleares do sangue

Imediatamente após a dequitação da placenta, foram coletados aproximadamente 40mL de sangue de cordão umbilical em tubos contendo heparina. Em ambiente estéril, o sangue foi diluído em solução salina na proporção de 1:3. Após homogeneização, foram

colocados 10mL de Histopaque (*Histopaque 1077 g/mL, Sigma, St. Louis, MO, USA*) em outros tubos e adicionou-se cuidadosamente 20mL do sangue diluído. Os tubos foram centrifugados a 2200 rpm por 20 minutos a 25°C e a camada de células mononucleares foi retirada e passada para outro tubo. Foram realizadas duas lavagens com salina estéril e centrifugação a 1800 rpm por 10 minutos a 10°C. Por fim, o *pellet* contendo as células mononucleares foi ressuspendido em meio RPMI-1640 (*Gibco®, Life Technologies, Foster City, CA, USA*) suplementado com L-Glutamina a 1%, Gentamicina (50mg/L) e Soro Fetal Bovino (SFB) (*Sigma, St. Louis, MO, USA*) a 10% (meio R-10). A viabilidade das células foi observada em microscópio óptico utilizando corante Trypan Blue (*Trypan Blue Solution* 0,4%, Sigma, St. Louis, MO, USA) e sua contagem foi realizada no contador automático (*Cell-Dyn CD-1700 Hematology Analyzer, Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA*). A concentração de células foi calculada de modo que em cada poço da placa de 24 *wells* contivesse $1x10^6$ células/mL.

3.5.2. Cultura de Monócitos

Após separação celular, as células mononucleares do sangue de cordão e as células mononucleares do sangue periférico de adultos foram ressuspendidas em meio R-10 e distribuídas em placas de 24 *wells* na concentração de $1x10^6$ células/mL e mantidas a 37ºC em estufa com 5% de CO_2, *overnight*, para aderência dos monócitos. Em seguida, o sobrenadante contendo linfócitos foi retirado e os poços

lavados 2 vezes com meio RPMI-1640 para retirar os linfócitos restantes. As células foram, então, estimuladas com 5µg/mL de Pam3CSK4, diluído em meio R-10. Os poços utilizados como controle negativo do teste não foram estimulados, sendo adicionado somente o meio R-10. O sobrenadante de cultura foi, então, colhido 18 horas após o estímulo e armazenado em microtubos a -80ºC para posterior dosagem das citocinas. Em seguida, as placas foram submetidas a um banho de gelo por 10 minutos. Em ambiente não estéril, as células foram lavadas e ressuspendidas 3 vezes com *Staining Buffer* (PBS 7,4 acrescido de 1% de SFB e 0,1% de azida sódica) gelado. A suspensão de células contida em cada poço foi transferida para tubos de citometria, que foram centrifugados a 1800 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado. Em cada tubo, foram adicionados 100µl de *Staining Buffer* e realizou-se a marcação celular com os anticorpos monoclonais descritos na **Tabela 1,** selecionados previamente para avaliar a população celular e ativação das células cultivadas. Os tubos foram incubados por 30 minutos a temperatura ambiente e na ausência de luz e em seguida 500µl de *Staining Buffer* foram adicionados e os tubos centrifugados a 1800 rpm por 5 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas mais 2 vezes nas mesmas condições. Por fim, 300µl de *Staining Buffer* foi adicionado aos tubos e seguiu-se com a aquisição das células no citômetro FACS LRS II Fortessa (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*), salvando 10.000 eventos dentro do *gate* de monócitos HLA-DR^{+}CD14^{+}. As análises foram feitas

no *software FlowJo* (*Tree Star, Ashland, OR, USA*) e os dados apresentados representam a Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI, *median fluorescence intensity*) dos marcadores.

Tabela 1. Marcadores de superfície celular dos monócitos cultivados

Anticorpo monoclonal	Clone	Fluorocromo	Fabricante
HLA-DR	G46-6	V500	*BD Biosciences*
CD14	M5E2	Pacific blue	*BD Biosciences*
CD80	BB1	FITC	*BD Biosciences*
CD86	2331(FUN-1)	PECy5	*BD Biosciences*
CD40	5C3	PE	*BD Biosciences*
TLR-2 (CD282)	11G7	Alexa 647	*BD Biosciences*

A dosagem dos níveis de citocinas pré- e pós-estímulo no sobrenadante das culturas de monócitos também foi feita através do Kit CBA, quantificando as citocinas pró-inflamatórias IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α e anti-inflamatória IL-10, de acordo com as instruções do fabricante.

3.6. Caracterização dos leucócitos do sangue de cordão umbilical por Imunofenotipagem

Para a realização da imunofenotipagem, as hemácias das amostras de sangue colhidas em tubo contendo EDTA foram lisadas com *Lysing Buffer* (*BD Pharm Lyse™, BD Biosciences, San Jose, CA, USA*), incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos e centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos a 10°C, desprezando-se o sobrenadante. Após a repetição do procedimento descrito acima, foram

realizadas 2 lavagens com *Staining Buffer* e centrifugação a 1800 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas no volume de *Staining Buffer* adequado para que em cada *well* da microplaca de 96 *wells* contivesse $1x10^6$ células em 100µl de *Staining Buffer*. Os anticorpos pré-estabelecidos (**Tabelas 2 a 6**) foram adicionados e a placa permaneceu incubada por 30 minutos a temperatura ambiente e na ausência de luz. Em seguida, foram adicionados 100µl/*well* de *Staining Buffer*, a placa centrifugada a 1800 rpm por 5 minutos a 10°C e o sobrenadante desprezado. Foram feitas 2 lavagens com *Staining Buffer* nas mesmas condições de centrifugação anterior. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 300µl de *Staining Buffer* e, então, transferidas para tubos de citometria. Foi feita a aquisição no citômetro de fluxo utilizando o *software BD FACSDiva*. As diferentes populações celulares foram captadas utilizando-se como parâmetro o tamanho (*forward scatter*, FSC) e a granulosidade celular (*side scatter*, SSC). Para a captação de células dendríticas, especificamente, foram excluídas as populações de linfócitos, monócitos e neutrófilos. A análise foi feita no software *FlowJo*, onde cada população celular foi analisada separadamente através de *gates* utilizando como parâmetro o tamanho e a granulosidade celular.

Os números absolutos das populações foram calculados pela multiplicação da porcentagem indicada de cada população na citometria

de fluxo e o número absoluto de leucócitos determinados pelo contador automático de células.

Tabela 2. Marcadores de superfície celular de células dendríticas mielóides e plasmocitóides

Anticorpo monoclonal	Clone	Fluorocromo	Fabricante
Lineage**	**	FITC	*BD Biosciences*
HLA-DR	G46-6	V500	*BD Biosciences*
CD11c	3.9	PE Cy5	*BioLegend**
CD123	7G3	PE Cy7	*BD Biosciences*
CD1a	HI149	APC Cy7	*BioLegend*
CD80	2D10	APC	*BioLegend*
CD86	2331(FUN-1)	PE	*BD Biosciences*
TLR-2 (CD282)	11G7	Alexa 647	*BD Biosciences*

*BioLegend Inc. (*San Diego, CA, USA*)
** anti-CD3 (clone SK7), anti-CD14 (clone MΦP9), anti-CD16 (clone 3G8), anti-CD19 (clone SJ25C1), anti-CD20 (clone L27), anti-CD56 (clone NCAM16.2)

Tabela 3. Marcadores de superfície celular de monócitos

Anticorpo monoclonal	Clone	Fluorocromo	Fabricante
HLA-DR	L243	APC Cy7	*BD Biosciences*
CD14	M5E2	Pacific blue	*BD Biosciences*
CD80	BB1	FITC	*BD Biosciences*
CD86	2331(FUN-1)	PE Cy5	*BD Biosciences*
TLR-2 (CD282)	11G7	Alexa 647	*BD Biosciences*

Tabela 4. Marcadores de superfície celular das subpopulações de linfócitos T *naïve*, linfócitos T de memória central e linfócitos T de memória efetora

Anticorpo monoclonal	Clone	Fluorocromo	Fabricante
CD3	SK7	APC Cy7	*BD Biosciences*
CD4	SK3	PerCP	*BD Biosciences*
CD27	M-T271	FITC	*BD Biosciences*
CD45RA	HI100	APC	*BD Biosciences*
CCR7	3D12	PE Cy7	*BD Biosciences*
CD62L	DREG-56	PE	*BD Biosciences*

Tabela 5. Marcadores de superfície celular da subpopulação de linfócitos T efetores

Anticorpo monoclonal	Clone	Fluorocromo	Fabricante
CD3	UCHT1	V450	*BD Biosciences*
CD4	SK3	APC Cy7	*BD Biosciences*
CD69	L78	PECy7	*BD Biosciences*
CD62L	DREG-56	PE	*BD Biosciences*
CD40L (CD154)	TRAP1	PE Cy5	*BD Biosciences*

Tabela 6. Marcadores de superfície celular das subpopulações de linfócitos B *naïve*, linfócitos B ativados e linfócitos B de memória

Anticorpo monoclonal	Clone	Fluorocromo	Fabricante
CD19	4G7	PerCP	*BD Biosciences*
CD27	M-T271	FITC	*BD Biosciences*
CD69	DREG-56	PECy7	*BD Biosciences*
CD40	5C3	PE	*BD Biosciences*
TLR-2 (CD282)	11G7	Alexa 647	*BD Biosciences*

3.7. Análise da função fagocítica e *burst* oxidativo pelo método de DHR

A análise da fagocitose de *Staphylococcus aureus* foi realizada por meio da citometria de fluxo, a qual nos possibilita avaliar conjuntamente o *burst* oxidativo, conforme descrito por Hasui et al. (1989). Para tanto, utilizamos *S. aureus* marcadas com iodeto de propídio, gentilmente cedida pelo laboratório da Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della. Utilizamos PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma, St. Louis, MO, USA*) como controle positivo da reação.

A DHR, especificamente na presença de peróxido de hidrogênio é oxidada convertendo-se em rodamina-123 fluorescente (Rothe et al., 1988), a qual pode ser analisada por citometria de fluxo.

O ensaio de DHR foi realizado em condições ideais de esterilidade. Em microtubos, foram adicionados volumes adequados de sangue para que em cada microtubo contivesse $1x10^6$ leucócitos, que foram estimulados durante 20 minutos a 37°C e separadamente com 300 ng/mL de PMA e *S. aureus* na proporção de 10 microrganismos para 1 célula, ou não estimulados a fim de verificarmos a produção espontânea de H_2O_2. Em seguida, a DHR foi adicionada, a 500 ng/mL, em todos os tubos e as amostras incubadas por 7 minutos a 37°C. Após este período, as amostras foram lavadas com 500µl de *Staining Buffer* e centrifugadas por 5 minutos a 1800 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e as hemácias foram lisadas duas vezes com *BD FACS™ Lysing Solution* (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*), permanecendo durante 20 minutos a temperatura ambiente e na ausência de luz. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com *Staining Buffer* e ressuspendidas em 300µl da mesma solução.

A captação foi feita no *FACS LRS II Fortessa* utilizando-se como parâmetro o FSC e SSC, sendo salvos 2.000 eventos no *gate* de monócitos. As células foram analisadas no software *FlowJo*, onde monócitos e neutrófilos foram separados através de *gates*. Os resultados foram expressos pela Média de Intensidade de Fluorescência ($M_{ean}FI$, *mean fluorescence intensity*).

3.8. Análise da cascata de sinalização intracelular em cultura de monócitos

3.8.1. Extração de proteínas totais

Para a extração de proteínas das células, a cultura dos monócitos foi realizada de modo semelhante à descrita anteriormente. Resumidamente, após separação, os monócitos foram adicionados em placas de 12 *wells* na concentração de $3x10^6$ células/mL em meio R-10 e estimulados com 5 µg/mL de Pam3CSK4. As placas foram incubadas em estufa de CO_2 por 30 minutos e após este período, as mesmas foram colocadas em gelo e deixadas por 30 minutos a fim de parar a estimulação.

Em ambiente não estéril, porém livre de RNAse e DNAse, iniciou-se o protocolo de extração de proteínas do kit *PARIS™* (*Protein Isolation System*, *Life Technologies*, *Foster City, CA, USA*) conforme procedimento descrito pelo fabricante. O conteúdo de proteínas totais foi avaliado pelo método do ácido bicinconínico utilizando-se o kit de dosagem de proteínas *BCA™ Protein Assay Kit* (*Pierce, Rockford, IL, USA*). Os resultados da extração de proteínas foram expressos em µg/ml.

3.8.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) a 10% com pente de 15 dentes para análise das proteínas intracelulares dos

monócitos cultivados. As proteínas extraídas de cada amostra obtidas de células estimuladas e não estimuladas com 5µg/mL de Pam3CSK4 foram diluídas em *Sample Buffer* (Tris 60 mM, 25% glicerol, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol e 2,5% β-mercaptoetanol) e aquecidas a 100°C, de modo que cada amostra fosse aplicada ao gel em uma concentração de 60 µg/poço, além de 5 µl/poço do padrão de peso molecular *Kaleidoscope*™ (225 a 12 kDa) (*BioRad Laboratories Inc.*, *Hercules, CA, USA*). A corrida foi realizada em aparelho *Mini Protean Tetra Cell*™ (*BioRad Laboratories Inc.*, *Hercules, CA, USA*) com voltagem de 100V.

3.8.3. Transferência das proteínas para nitrocelulose

A partir do gel descrito acima, foi preparado um "sanduíche" com as placas de fibras, papéis de filtro, o gel e a membrana de nitrocelulose (Towbin et al., 1979). A corrida de transferência foi feita fixando-se a voltagem em 12V *overnight* e, em seguida, 20V por 30 minutos, em aparelho *Mini Protean II* (*BioRad Laboratories Inc.*, *Hercules, CA, USA*).

3.8.4. *Western blotting*

Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas com corante de *Ponceau S* a 0,5% por 20 minutos e descoradas com água destilada. As membranas foram bloqueadas com tampão TBS 0,01M acrescido de leite desnatado em pó 5% e 0,05% de Tween 20 e,

após 1 hora à temperatura ambiente, foram incubadas com os anticorpos anti-MyD88 de 33kDa (cod. 3699, *Cell Signaling, Danvers, MA, USA*), anti-SAPK/JNK fosforilada de 54kDa (cod. 9251, *Cell Signaling*) e anti-GAPDH (controle endógeno, cod. MAB374, *Millipore, Billerica, MA, USA,*) de 38 kDa, todos diluídos 1:1000 no mesmo tampão do bloqueio. Após incubação *overnight* em ambiente refrigerado e 2 lavagens de 10 minutos com tampão de lavagem (TBS 0,01M pH 7,4 acrescido de Tween 20 0,1%), as fitas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho (para MyD88 e SAPK/JNK) ou anti-IgG de camundongo (para GAPDH) marcados com peroxidase na diluição de 1:5000 no mesmo tampão do bloqueio por 1 hora e meia a temperatura ambiente. As fitas foram novamente lavadas por 2 vezes de 10 minutos e o substrato quimioluminescente foi aplicado (*Immobilon™ Western, Millipore, Billerica, MA, USA*). Este reagiu por dois minutos e a reação foi lida em aparelho fotodocumentador (*Fuji Film LAS - 4000*).

3.8.5 *Phosflow*

Phosflow® é uma técnica recentemente descrita que avalia moléculas fosforiladas da via de sinalização intracelular do TLR-2: ERK-1/2; NF-κB e p38, a qual é analisada por citometria de fluxo através da marcação destas moléculas intracelularmente com anticorpos específicos conjugados a fluorocromos, a partir da cultura de monócitos.

Foi realizada a cultura de monócitos como já descrito anteriormente, porém o estímulo foi mantido por 20 minutos. Após a realização da marcação extracelular com 3µL de anticorpo anti-CD14 (clone M5E2) conjugado a V500 e 3µL de anti-HLA-DR (clone L243) conjugado a APC-Cy7, foi feita uma lavagem com *Staining Buffer* e, em seguida, adicionado um volume pré-determinado de *Fixation Buffer* (*BD™ Cytofix*, Cat: 554655) de acordo com a quantidade de células/mL ($3x10^6$). Os tubos foram homogeneizados e incubados por 10 minutos a 37°C. Após este período, adicionaram-se aos tubos 100µL de *Staining Buffer* e os tubos foram centrifugados a 1800rpm por 5 minutos, a temperatura ambiente. Foi feita uma lavagem com *Staining Buffer* e o sobrenadante desprezado por inversão. Homogeneizou-se o *pellet* com o mínimo de tampão que restou no tubo. Duzentos microlitros de *Perm Buffer II* (*BD™ Phosflow*, Cat: 558052) foram adicionados para $3x10^6$ células/mL, homogeneizados e incubados por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, foram realizadas 3 lavagens adicionando-se 500µL de *Staining Buffer* e os tubos centrifugados a 1800 rpm por 5 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado por inversão e foram adicionados 100µL de *Staining Buffer* em cada tubo para a marcação intracelular com os anticorpos previamente selecionados, descritos na **Tabela 7**.

Tabela 7. Marcadores das moléculas intracelulares presentes na cascata de ativação celular da via do TLR-2

Anticorpo monoclonal	Clone	Fluorocromo	Fabricante
ERK 1/2	20A	PerCP	*BD Biosciences*
NF-κB	K10-895.12.50	PECy7	*BD Biosciences*
p38	36/p38 (pT180/pY182)	Pacific Blue	*BD Biosciences*

Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por uma hora, protegidos da luz. Foram feitas duas lavagens adicionando-se 1mL de *Staining Buffer* em cada tubo e o sobrenadante, desprezado. As células foram ressuspendidas em 200µL de tampão e foi feita a aquisição em citômetro de fluxo *FACS LRS II Fortessa* (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*), salvando-se 20.000 eventos dentro do gate de monócitos $CD14^{+}HLA\text{-}DR^{+}$. As análises foram feitas no *software FlowJo* e os dados apresentados representam a Média da Intensidade de Fluorescência ($M_{ean}FI$) dos marcadores.

3.9. Análise Estatística

Para a análise estatística, o *software* utilizado foi o *MedCalc* 12.7.0 (*MedCalc Software, Ostend, Bélgica*). No presente trabalho, além da análise estatística descritiva utilizada para calcular médias, medianas e desvios padrão foram utilizados: Teste de *Wilcoxon* (para análise comparativa das medianas das amostras pré e pós-estímulo); Teste de Mann-Whitney (para análise realizada entre diferentes grupos); Teste de *Kruskal-Wallis* (para análise comparativa das medianas dos 3

grupos de RNs e de adultos) seguido do teste Post-hoc de Dunn. Foi adotado um nível de significância de 5%.

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 e dosagem de proteína C reativa, além de 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 imunológico. As **Tabelas 8**, **9**, **10, 11** e **12** contêm as informações relevantes dos recém-nascidos (RNs) e suas respectivas mães. As amostras 1T e 1PT foram descartadas inicialmente de nossa casuística por apresentarem volume insuficiente de sangue para realização dos ensaios, bem como por apresentarem resultados indicativos de infecção em seus exames, pois os resultados da avaliação da proteína C reativa (PCR) e dos níveis de citocinas pró-inflamatórias foram obtidos somente após a coleta e armazenamento das amostras.

Tabela 8. 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
2PT	33 $^{0}/_{7}$	Normal	1930	8/9	Ausente	Não
3PT	*27 $^{0}/_{7}$*	*Normal*	*960*	*5/8*	*Ausente*	*Não*
8PT (1G)	30 $^{5}/_{7}$	Cesárea	1650	4/8	Presente [1]	Não
8PT (2G)	30 $^{5}/_{7}$	Cesárea	1500	2/8	Presente [1]	Não
14PT (1G)	30 $^{1}/_{7}$	Normal	1270	9/9	Ausente	Não
14PT (2G)	30 $^{1}/_{7}$	Normal	1400	9/10	Ausente	Não
15PT	33 $^{6}/_{7}$	Cesárea	1960	4/8	Presente [2]	Sim
16 PT	32 $^{4}/_{7}$	Cesárea	1860	8/9	Ausente	Não
19PT	32 $^{0}/_{7}$	Cesárea	1690	8/9	Ausente	Não
21PT	32 $^{6}/_{7}$	Cesárea	950	8/10	Presente [1,3,4]	Não
24PT	33 $^{5}/_{7}$	Cesárea	1390	9/10	Presente [3]	Não
25PT	30 $^{0}/_{7}$	Normal	1500	9/10	Ausente	Não
27PT	32 $^{5}/_{7}$	Cesárea	1590	7/8	Ausente	Sim
28PT	*33 $^{0}/_{7}$*	*Cesárea*	*1370*	*7/9*	*Presente [6]*	*Não*
31PT	32 $^{0}/_{7}$	Normal	1630	8/9	Ausente	Não
36PT	33 $^{2}/_{7}$	Normal	1965	8/9	Presente [3]	Não
37PT	31 $^{6}/_{7}$	Cesárea	1920	8/9	Ausente	Não

RN: recém-nascido; PT: pré-termo; IG: idade gestacional em semanas; g: gramas; 1G: primeiro gemelar; 2G: segundo gemelar; [1]: Hipertensão Arterial Crônica; [2]: Fibrose Pulmonar; [3]: Doença Hipertensiva Específica da Gestação; [4]: Cardiopatia; [5]: Asma; [6]: Carcinoma de útero invasivo. Amostras em vermelho foram excluídas.

Tabela 9. 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
1PT	*35 $^{1}/_{7}$*	*Normal*	*2890*	*10/10*	*Ausente*	*Não*
4PT (1G)	36 $^{0}/_{7}$	Cesárea	2595	8/10	Ausente	Não
4PT (2G)	36 $^{0}/_{7}$	Cesárea	2590	7/9	Ausente	Não
5PT	35 $^{4}/_{7}$	Cesárea	2740	10/10	Ausente	Não
6PT	36 $^{6}/_{7}$	Cesárea	2520	10/10	Ausente	Sim

7PT	36 $^{4}/_{7}$	Fórcipe	2990	9/10	Ausente	Sim
9PT (1G)	36 $^{2}/_{7}$	Cesárea	2410	8/9	Ausente	Sim
9PT (2G)	36 $^{2}/_{7}$	Cesárea	1810	9/9	Ausente	Sim
10PT	35 $^{2}/_{7}$	Cesárea	2705	9/9	Ausente	Sim
11PT	35 $^{0}/_{7}$	Normal	2430	7/9	Ausente	Não
12PT	35 $^{3}/_{7}$	Normal	2450	10/10	Ausente	Não
13PT	35 $^{4}/_{7}$	Cesárea	2180	7/9	Presente [3]	Não
17PT	35 $^{0}/_{7}$	Cesárea	2600	8/9	Presente [8]	Não
18PT	34 $^{2}/_{7}$	Cesárea	2240	4/8	Ausente	Não
20PT	35 $^{1}/_{7}$	Cesárea	1160	9/10	Ausente	Não
22PT	34 $^{5}/_{7}$	Cesárea	2050	8/9	Presente [3,5]	Sim
23PT	36 $^{0}/_{7}$	Normal	2650	9/10	Ausente	Sim
26PT	35 $^{2}/_{7}$	Normal	1420	7/9	Ausente	Não
29PT	35 $^{2}/_{7}$	Normal	2090	9/10	Presente [1,3,7]	Não
30PT	35 $^{1}/_{7}$	Cesárea	2650	9/10	Ausente	Não
32PT	34 $^{0}/_{7}$	Cesárea	1780	9/10	Presente [3]	Não
33PT	34 $^{2}/_{7}$	Cesárea	2180	9/10	Ausente	Não
34PT	36 $^{4}/_{7}$	Normal	2340	9/10	Presente [4]	Não
35PT(1G)	34 $^{1}/_{7}$	Cesárea	1960	7/9	Presente [9]	Não
35PT(2G)	34 $^{1/7}$	Cesárea	1270	7/9	Presente [9]	Não
38PT	34 $^{5/7}$	Normal	2550	8/9	Presente [10]	Não
39PT	36 $^{0}/_{7}$	Cesárea	2295	3/7	Ausente	Não
40PT	34 $^{1/7}$	Normal	2260	9/10	Presente [4]	Não

RN: recém-nascido; PT: pré-termo; IG: idade gestacional em semanas; g: gramas; 1G: primeiro gemelar; 2G: segundo gemelar; [1]: Hipertensão Arterial Crônica; [3]: Doença Hipertensiva Específica da Gestação; [4]: Cardiopatia; [5]: Asma; [7]: Diabetes Mellitus; [8]: Isoimunização RH; [9]: Epilepsia; [10]: Hipertireoidismo. Amostras em vermelho foram excluídas.

Tabela 10. 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
1T	*39 $^{0}/_{7}$*	*Normal*	*2845*	*10/10*	*Ausente*	*Não*
2T	37 $^{6}/_{7}$	Normal	2945	10/10	Ausente	Não
3T	39 $^{2}/_{7}$	Cesárea	2485	9/10	Ausente	Não

4T	40 0/7	Normal	3945	9/10	Ausente	Não
5T	38 3/7	Cesárea	3350	9/10	Ausente	Não
7T	37 6/7	Cesárea	3555	7/9	Ausente	Não
8T	*40 6/7*	*Normal*	*3905*	*9/9*	*Ausente*	*Não*
10T	41 0/7	Normal	3200	9/10	Ausente	Não
11T	41 5/7	Cesárea	3060	4/10	Ausente	Não
12T	*41 0/7*	*Normal*	*3550*	*9/10*	*Ausente*	*Não*
13T	*37 1/7*	*Normal*	*2745*	*10/10*	*Ausente*	*Não*
14T	37 6/7	Cesárea	3060	4/10	Ausente	Não
15T	40 0/7	Normal	3155	10/10	Ausente	Não
16T	37 6/7	Cesárea	2620	9/9	Ausente	Não
17T	38 4/7	Cesárea	3290	8/9	Ausente	Não
19T	40 0/7	Cesárea	3285	10/10	Ausente	Não
20T	37 5/7	Normal	3365	10/10	Ausente	Não
21T	41 2/7	Normal	3555	9/10	Ausente	Não
22T	39 1/7	Normal	3470	9/10	Ausente	Não
23T	37 6/7	Normal	2660	9/10	Ausente	Não
24T	39 1/7	Cesárea	3300	10/10	Ausente	Não
25T	40 0/7	Normal	3310	10/10	Ausente	Não
26T	39 0/7	Fórcipe	3265	9/9	Ausente	Não
27T	39 2/7	Fórcipe	2975	9/10	Ausente	Não
28T	38 2/7	Cesárea	2610	9/10	Ausente	Não
29T	39 6/7	Cesárea	3040	8/9	Ausente	Não
30T	39 6/7	Cesárea	3200	9/10	Ausente	Não
31T	39 2/7	Cesárea	4100	9/10	Ausente	Não
32T	40 2/7	Fórcipe	3395	9/10	Ausente	Não
33T	40 4/7	Cesárea	4330	9/10	Ausente	Não
34T	37 0/7	Fórcipe	2760	10/10	Ausente	Não
35T	40 0/7	Cesárea	2890	9/10	Ausente	Não
36T	40 1/7	Cesárea	3825	10/10	Ausente	Não
37T	39 0/7	Cesárea	3920	10/10	Ausente	Não
38T	38 2/7	Normal	3580	8/8	Ausente	Não
39T	38 5/7	Normal	3327	9/10	Ausente	Não
40T	38 6/7	Normal	3720	9/10	Ausente	Não
41T	40 3/7	Normal	3280	9/10	Presente [11]	Não

42T	37 $^{5}/_{7}$	Normal	3145	9/10	Ausente	Não
43T	39 $^{0}/_{7}$	Cesárea	3290	8/9	Ausente	Não
44T	39 $^{6}/_{7}$	Normal	3360	10/10	Ausente	Não
45T	37 $^{0}/_{7}$	Cesárea	3000	8/9	Presente [4]	Não
46T	40 $^{1}/_{7}$	Normal	3490	10/10	Presente [12]	Não
47T	39 $^{0}/_{7}$	Normal	2860	8/9	Presente [1]	Não
48T	37 $^{1}/_{7}$	Cesárea	4310	8/9	Presente [7,13]	Não

RN: recém-nascido; T: termo; IG: idade gestacional em semanas; g: gramas; [1]: Hipertensão Arterial Crônica; [4]: Cardiopatia; [7]: Diabetes Mellitus; [11]: Hipertensão Arterial Sistêmica; [12]: Síndrome Nefrótica; [13]: Hipotireoidismo. Amostras em vermelho foram excluídas.

Tabela 11. Dados do prontuário das parturientes e seus respectivos recém-nascidos pré-termo

RN PT	**Morbidade Materna**			**Exame laboratorial (RN)**			
	ITU	**SGB**	***E. coli***	**PCR 1ºdia**	**PCR 2ºdia**	**PCR 3ºdia**	**HMC**
1PT	*Ausente*	*Ausente*	*NR*	*<10*	*<10*	*NR*	*Negativa*
2PT	Ausente	Ausente	NR	<10	<10	NR	Negativa
3PT	*Presente*	*NR*	*NR*	*≥10*	*≥10*	*<10*	*Negativa*
4PT (1G)	Ausente	Ausente	Ausente	NR	NR	NR	Negativa
4PT (2G)	Ausente	Ausente	Ausente	NR	NR	NR	Negativa
5PT	Ausente	Ausente	Ausente	<10	<10	NR	NR
6PT	Ausente	Ausente	Ausente	≥10	≥10	NR	Negativa
7PT	Ausente	Ausente	Ausente	<10	<10	NR	Negativa
8PT (1G)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
8PT (2G)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
9PT (1G)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
9PT (2G)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
10PT	Ausente	Ausente	Ausente	<10	<10	NR	Negativa
11PT	Ausente	Ausente	Ausente	<10	NR	NR	NR
12PT	Ausente	Ausente	Ausente	>10	10	<10	Negativa
13PT	Ausente	NR	Ausente	NR	NR	NR	NR
14PT(1G)	Ausente	NR	NR	<10	<10	NR	Negativa
14PT(2G)	Ausente	NR	NR	<10	<10	NR	Negativa
15PT	Ausente	Ausente	NR	<10	<10	NR	Negativa

16PT	Ausente	NR	NR	<10	NR	NR	Negativa
17PT	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
18PT	Ausente	NR	NR	<10	NR	NR	Negativa
19PT	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
20PT	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
21PT	NR	NR	NR	<10	≥10	NR	Negativa
22PT	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
23PT	Ausente	NR	NR	NR	<10	NR	Negativa
24PT	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
25PT	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
26PT	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
27PT	Ausente	Ausente	NR	NR	<10	NR	Negativa
28PT	*NR*	*Ausente*	*NR*	*NR*	*NR*	*NR*	*NR*
29PT	Ausente	Ausente	NR	<10	≥10	≥10	Negativa
30PT	Ausente	Ausente	NR	<10	≥10	NR	Negativa
31PT	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
32PT	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
33PT	Presente	NR	NR	<10	NR	NR	Negativa
34PT	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
35PT(1G)	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
35PT(2G)	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
36PT	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
37PT	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
38PT	Ausente	NR	NR	NR	NR	NR	NR
39PT	Ausente	Ausente	NR	<10	<10	NR	Negativa
40PT	Ausente	Ausente	NR	<10	<10	NR	Negativa

RN: recém-nascido; PT: pré-termo; 1G: primeiro gemelar; 2G: segundo gemelar; ITU: infecção do trato urinário; SBG: *Streptococcus* do grupo B; *E. coli*: *Escherichia coli*; PCR: proteína C reativa; HMC: Hemocultura; NR: não realizada.

Tabela 12. Dados do prontuário das parturientes e seus respectivos recém-nascidos a termo

RN T	Morbidade Materna			Exame laboratorial (RN)			
	ITU	SGB	*E. coli*	PCR 1ºdia	PCR 2ºdia	PCR 3ºdia	HMC
1T	*NR*	*NR*	*NR*	*NR*	*NR*	*NR*	*NR*
2T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
3T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
4T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
5T	NR	NR	NR	<10	<10	NR	Negativa
7T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
8T	*Presente*	*NR*	*Presente*	*NR*	*NR*	*NR*	*NR*
10T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
11T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
12T	*NR*	*Presente*	*NR*	*NR*	*NR*	*NR*	*NR*
13T	*NR*	*Presente**	*NR*	*NR*	*NR*	*NR*	*NR*
14T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
15T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
16T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
17T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
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	<10	<10	NR	Negativa
24T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
25T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
26T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
27T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
28T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
29T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
30T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
31T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
32T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
33T	NR	NR	NR	<10	≥10	<10	Negativa
34T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

35T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
36T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
37T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
38T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
39T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
40T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
41T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
42T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
43T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
44T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
45T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
46T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
47T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Negativa
48T	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

RN: recém-nascido; T: termo; 1G: primeiro gemelar; 2G: segundo gemelar; ITU: infecção do trato urinário; SBG: *Streptococcus* do grupo B; *E. coli*: *Escherichia coli*; PCR: proteína C reativa; HMC: Hemocultura; NR: não realizada; *: *Staphylococcus warneri*.

Diante dos dados apresentados nas **Tabelas 8, 9, 10, 11** e **12**, as amostras dos RNs 8T, 12T e 13T foram descartadas em virtude da presença de infecção no trato urinário materno causada por *E. coli*, infecção por *Streptococcus* do grupo B e infecção por *Staphylococcus warneri*, respectivamente. A amostra 3PT também foi excluída devido a infecção do trato urinário materno, no entanto, a bactéria não foi isolada. Já a amostra 28PT foi descartada em virtude do diagnóstico materno de carcinoma de útero invasivo.

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

A dosagem de citocinas nas amostras de soro de cordão umbilical foi realizada com o intuito de eliminar aquelas que apresentassem níveis aumentados característicos de infecção. Os resultados estão demonstrados nas **Tabelas 13**, **14** e **15**.

Tabela 13. 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-1β**	**IL-10**	**TNF-α**	**IL-2**	**IL-4**	**IL-17A**
2PT	*> 2500,0*	*978,9*	*10,2*	*51,8*	*11,1*	*ND*	*NR*	*NR*	*NR*
3PT	*1.663,4*	*1.104,3*	*19,3*	*23,6*	*25,3*	*ND*	*NR*	*NR*	*NR*
8PT (1G)	17,3	3,1	ND	ND	ND	1,3	ND	ND	ND
8PT (2G)	105,0	33,5	ND	ND	0,6	1,8	ND	ND	ND
14PT(1G)	403,1	55,0	3,4	3,3	1,7	0,4	ND	ND	ND
14PT(2G)	40,7	6,1	2,2	0,25	0,9	0,5	ND	ND	ND
15PT	9,8	1,4	2,1	0,4	1,2	1,0	4,2	2,2	296,9
16PT	38,3	4,6	6,1	0,9	2,1	0,9	2,0	ND	ND
19PT	53,9	17,7	ND	0,5	ND	ND	1,8	ND	ND
21PT	96,1	9,3	0,3	1,3	0,7	0,4	2,8	0,3	ND
24PT	39,5	17,8	0,1	0,9	1,0	0,8	NR	NR	NR
25PT	32,8	20,4	0,4	0,6	1,9	1,4	NR	NR	NR
27PT	17,0	10,8	0,5	0,4	4,1	ND	NR	NR	NR
28PT	*10,9*	*1,1*	*ND*	*ND*	*0,1*	*0,2*	*NR*	*NR*	*NR*
31PT	402,9	296,8	0,3	0,8	5,3	0,1	NR	NR	NR
36PT	26,7	2,2	ND	ND	0,8	0,6	1,2	1,0	12,9
37PT	12,6	1,6	0,7	ND	0,3	0,3	1,4	ND	ND

PT: pré-termo; 1G: primeiro gemelar; 2G: segundo gemelar; ND: não detectado. As amostras marcadas em vermelho e itálico foram excluídas da casuística de acordo com o prontuário das mães. As amostras marcadas em azul e itálico foram excluídas da casuística de acordo com o resultado da dosagem de citocinas no soro dos recém-nascidos.

Tabela 14. 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-1β**	**IL-10**	**TNF-α**	**IL-2**	**IL-4**	**IL-17A**
4PT (1G)	44,9	ND	ND	ND	ND	ND	NR	NR	NR
4PT (2G)	34,8	15,0	16,0	ND	ND	ND	2,0	ND	ND
5PT	52,9	19,0	ND	ND	8,4	ND	NR	NR	NR
6PT	173,2	118,5	0,9	6,4	1,1	1,4	1,3	ND	ND
7PT	24,8	8,2	ND	ND	ND	0,1	ND	ND	ND
9PT (1G)	20,9	3,1	ND	0,1	0,8	0,6	ND	ND	ND
9PT (2G)	16,5	6,6	0,5	ND	0,5	1,7	1,9	ND	ND
10PT	19,2	3,0	1,1	2,4	0,6	3,5	4,3	1,6	110,2
11PT	*>2500,0*	*241,7*	*0,3*	*32,3*	*2,7*	*0,8*	*NR*	*NR*	*NR*
12PT	490,0	241,6	ND	ND	ND	ND	ND	0,5	ND
13PT	8,1	10,3	2,2	0,3	0,5	1,0	ND	1,1	ND
17PT	18,2	4,4	3,3	0,6	0,8	0,7	2,9	ND	ND
18PT	22,9	11,2	2,5	0,35	1,0	0,4	ND	ND	ND
20PT	115,0	27,3	0,3	ND	2,0	0,4	2,0	ND	ND
22PT	78,5	13,6	0,5	4,3	1,2	1,2	ND	ND	ND
23PT	14,5	4,0	0,3	0,5	0,3	0,1	NR	NR	NR
26PT	30,8	7,5	0,3	0,8	0,1	0,1	NR	NR	NR
29PT	16,0	2,6	0,1	1,8	1,1	ND	1,9	2,4	21,9
30PT	10,5	0,7	0,7	3,0	0,2	1,0	1,2	ND	4,8
32PT	14,2	2,5	0,1	0	0,2	0,7	2,0	2,6	121,2
33PT	23,0	0,8	ND	ND	0,8	0,5	ND	ND	6,0
34PT	1835,7	50,3	0,4	6,7	2,4	53,2	1,4	1,9	10,3
35PT(1G)	16,0	3,4	ND	ND	1,3	0,4	3,1	2,0	10,9
35PT(2G)	24,6	3,6	0,7	ND	1,5	ND	ND	ND	ND
38PT	18,6	4,3	1,2	6,1	0,5	0,8	NR	NR	NR
39PT	21,3	2,1	1,1	0,4	ND	ND	NR	NR	NR
40PT	21,2	11,0	0,8	0,7	0,7	0,2	NR	NR	NR

PT: pré-termo; 1G: primeiro gemelar; 2G: segundo gemelar; ND: não detectado; NR: não realizado. As amostras marcadas em azul e itálico foram excluídas da casuística de acordo com o resultado da dosagem de citocinas no soro dos recém-nascidos.

Tabela 15. 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-1β**	**IL-10**	**TNF-α**	**IL-2**	**IL-4**	**IL-17A**
2T	*210,2*	*858,7*	*140,5*	*ND*	*26,5*	*24,9*	*NR*	*NR*	*NR*
3T	37,1	14,8	17,8	ND	18,6	ND	2,8	ND	38,4
4T	33,9	ND	ND	ND	16,6	ND	1,7	ND	ND
5T	38,7	ND	12,0	ND	ND	ND	1,7	ND	ND
7T	45,6	22,2	0,0	ND	ND	0,8	3,1	ND	ND
8T	*187,4*	*21,6*	*0,3*	*3,8*	*4,8*	*0,5*	*ND*	*ND*	*ND*
10T	1298,0	8,4	0,3	21,9	ND	0,6	1,4	ND	107,4
11T	479,0	11,7	0,4	21,0	1,5	ND	2,4	0,4	57,6
12T	*687,9*	*6,8*	*0,4*	*17,2*	*0,7*	*0,1*	*NR*	*NR*	*NR*
13T	*347,6*	*726,1*	*ND*	*15,1*	*3,0*	*0,8*	*NR*	*NR*	*NR*
14T	35,4	10,0	ND	0,1	1,3	1,1	ND	ND	ND
15T	108,3	167,2	0,3	8,6	1,0	1,5	ND	1,0	209,6
16T	17,7	9,2	0,1	0,6	0,6	0,5	1,7	0,6	ND
17T	244,1	3,2	ND	1,4	0,2	1,3	ND	ND	ND
19T	12,7	6,0	0,9	1,1	ND	0,8	2,0	0,4	ND
20T	137,7	4,9	1,1	0,7	ND	0,6	ND	ND	ND
21T	214,9	238,7	ND	3,5	1,3	1,1	ND	0,6	ND
22T	86,7	47,0	ND	0,7	0,6	1,5	2,7	ND	ND
23T	88,2	4,7	ND	1,5	0,4	1,3	ND	ND	104,5
24T	224,5	4,0	0,5	1,9	0,9	0,9	ND	ND	ND
25T	20,4	1,8	ND	1,3	ND	ND	NR	NR	NR
26T	221,3	2,8	0,3	4,7	ND	ND	ND	ND	253,2
27T	194,1	5,6	ND	19,9	0,2	0,7	ND	ND	87,3
28T	16,6	2,3	0,3	1,5	0,4	0,4	1,6	ND	ND
29T	17,8	2,0	1,5	1,0	0,6	1,0	ND	ND	ND
30T	201,9	0,7	1,0	2,7	0,5	1,3	ND	ND	ND
31T	873,5	1,9	0,8	4,4	1,4	ND	ND	ND	ND
32T	122,8	17,0	0,1	5,4	0,7	1,1	ND	ND	ND
33T	20,6	3,3	0,4	2,7	0,2	1,2	2,0	ND	ND
34T	>2500,0	32,0	4,4	29,3	1,5	1,8	1,8	ND	171,3
35T	10,3	2,6	ND	0,7	0,5	0,1	NR	NR	NR
36T	17,0	2,5	0,3	1,4	0,8	0,6	NR	NR	NR
37T	92,9	4,1	1,0	1,6	1,7	2,9	1,2	0,8	8,3
38T	52,8	1,0	1,3	10,0	1,0	1,9	4,0	1,9	5,6
39T	119,6	9,3	ND	0,3	0,7	3,9	2,2	1,7	19,4
40T	210,7	4,1	ND	4,2	0,4	1,6	NR	NR	NR
41T	25,0	4,7	2,0	2,7	0,2	0,8	NR	NR	NR
42T	19,2	7,0	1,8	1,4	0,6	1,3	NR	NR	NR
43T	16,7	2,7	0,3	1,8	1,4	1,5	NR	NR	NR
44T	20,9	16,0	0,9	0,9	0,8	0,6	NR	NR	NR

45T	16,8	4,4	1,4	1,3	0,9	1,0	NR	NR	NR
46T	18,1	4,3	0,3	1,2	41,2	1,9	NR	NR	NR
47T	17,5	1,0	0,7	1,2	1,1	1,7	NR	NR	NR
48T	24,7	5,2	0,2	0,6	0,5	0,4	NR	NR	NR

T: termo; ND: não detectado; NR: não realizado. As amostras marcadas em vermelho e itálico foram excluídas da casuística de acordo com o prontuário das mães. As amostras marcadas em azul e itálico foram excluídas da casuística de acordo com o resultado da dosagem de citocinas no soro dos recém-nascidos.

Os valores das dosagens de IFN-γ não estão descritos nas tabelas, pois os níveis dessa citocina no soro dos RNs foram indetectáveis.

As amostras marcadas em azul e itálico indicam que estas foram excluídas devido às altas concentrações de citocinas indicativas de infecção no soro dos RNs.

De acordo com os resultados obtidos nas dosagens de citocinas em associação aos dados maternos e exames laboratoriais dos RNs, e relatos da literatura, algumas amostras foram excluídas da nossa casuística a fim de evitar possíveis interferências nas análises e resultados posteriores. As amostras de soro dos RNs 2PT, 3PT (associada à presença de infecção do trato urinário) e 13T (associada à infecção por *Staphylococcus warneri*) apresentaram altas concentrações de IL-8 e IL-6; as amostras 12T (associada à presença de infecção materna por SGB) e 11PT apresentaram altas concentrações de IL-8, sendo que, este último, ainda apresentou uma concentração considerável de IL-6. Já o RN 2T apresentou alta concentração de IL-6. Sendo assim, essas amostras foram excluídas da casuística.

Embora um estudo tenha identificado que a IL-8 não é uma ferramenta útil para o diagnóstico de infecção (Bonac et al., 2000), a

maioria dos estudos encontrou a concentração desta citocina consideravelmente aumentada em neonatos infectados. No entanto, existem conflitos relatados entre o impacto do período gestacional na correlação de concentrações de IL-8 aumentada com sepse em neonatos (Dollener et al., 2001). Por esse motivo, optamos por não excluir os RNs 10T, 31T, 34PT e 34T da casuística. Além disso, os ensaios realizados posteriormente com essas amostras demonstraram resultados equivalentes às amostras dos demais RNs.

A **Figura 2**, a seguir, mostra a relação entre os níveis de citocinas e a diferença entre o tipo de parto. Os dados estão apresentados pela média das amostras agrupadas por tipo de parto, normal ou cesárea.

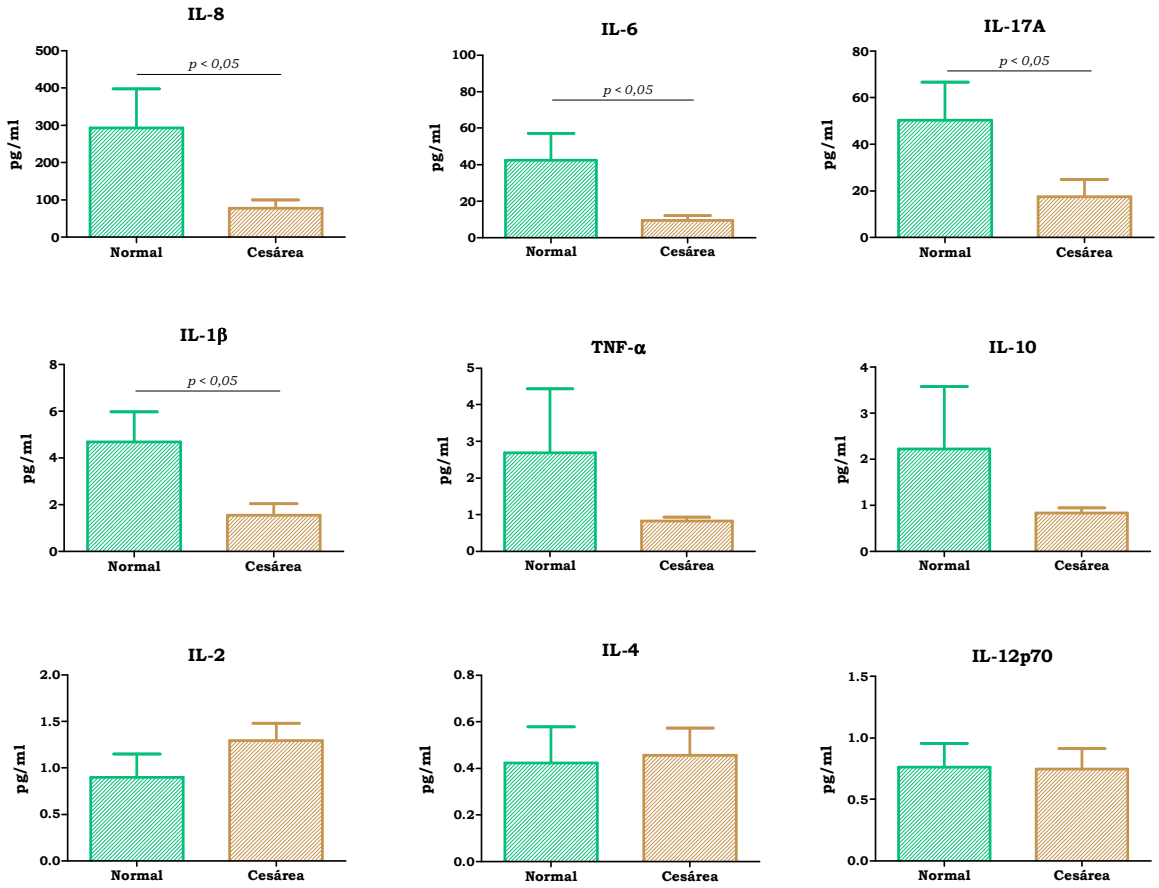


Figura 2. Concentrações séricas de IL-8, IL-6, IL-17A, IL-1β, TNF-α, IL-12p70, IL-2, IL-4 e IL-10 em amostras de soro provenientes do cordão umbilical de recém-nascidos pré-termo e a termo saudáveis agrupados por tipo de parto. Parto normal (n = 31); Cesárea (n = 49).

Nossos dados mostraram níveis significativamente mais elevados das citocinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-6 no parto normal comparado à cesárea, assim como níveis mais elevados de IL-17A. Ainda, observaram-se níveis significativamente mais elevados de IL-1β no parto normal em relação à cesárea, porém em níveis mais reduzidos do que as outras citocinas inflamatórias, não ultrapassando 10 pg/mL.

As dosagens das citocinas pró-inflamatória TNF-α e a anti-inflamatória IL-10 resultaram em níveis mais aumentados no parto normal, porém não foram detectadas diferenças estatísticas com o parto cesárea.

A **Tabela 16**, a seguir, mostra a média e os valores mínimos e máximos dos pesos e das idades gestacionais dos RNs que foram utilizados no presente trabalho e divididos em 3 grupos: Grupo 1 (<34 semanas), Grupo 2 (≥34 e <37) e Grupo 3 (≥37 semanas).

Tabela 16. Médias dos pesos e das idades gestacionais dos grupos de recém-nascidos

	Grupo 1 [N=14]	**Grupo 2 [N=26]**	**Grupo 3 [N=40]**
		Média (mínimo – máximo)	
Peso (gramas)	1591 (950 - 1965)	2249 (1160 - 2990)	3308 (2485 - 4330)
Idade gestacional (semanas)	31 $^{6}/_{7}$ (30 - 33 6/7)	35 $^{2}/_{7}$ (34 - 36 6/7)	39 $^{1}/_{7}$ (37 - 41 5/7)

N: número amostral.

4.3. Estudo funcional dos monócitos

As culturas de monócitos foram realizadas utilizando amostras de sangue de cordão umbilical, sendo 9 amostras do Grupo 1, 14 do Grupo 2 e 24 amostras do Grupo 3, acompanhadas de 24 amostras de sangue periférico de adultos saudáveis.

A análise das culturas foi feita delimitando-se a população de monócitos $CD14^{+}HLA\text{-}DR^{+}$ utilizando como parâmetro o tamanho (*forward scatter*, FSC) e a granulosidade celular (*side scatter*, SSC) (**Figura 3**) como descrito por Sánchez-Torres et al. (2001).

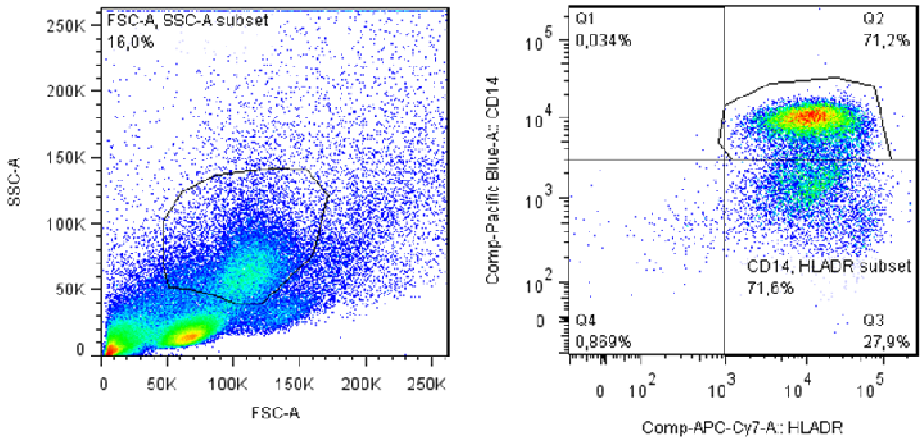


Figura 3. *Dot plots* representativos do *gate* de monócitos com base no tamanho (*forward scatter*, FSC) e granulosidade celular (*side scatter*, SSC), e *gate* da população de monócitos $CD14^{+}HLA\text{-}DR^{+}$.

A análise das culturas revelou que após delimitarmos um *gate* na população de monócitos, de acordo com o tamanho e a granulosidade celular, aproximadamente 70% são monócitos $CD14^{+}HLA\text{-}DR^{+}$. A **Figura 4**, a seguir, mostra a Mediana do Índice de Fluorescência (MFI) da expressão dos marcadores de ativação celular CD80, CD86 e CD40 em monócitos estimulados e não estimulados cultivados por 18 horas, bem como a expressão de TLR-2 e HLA-DR.

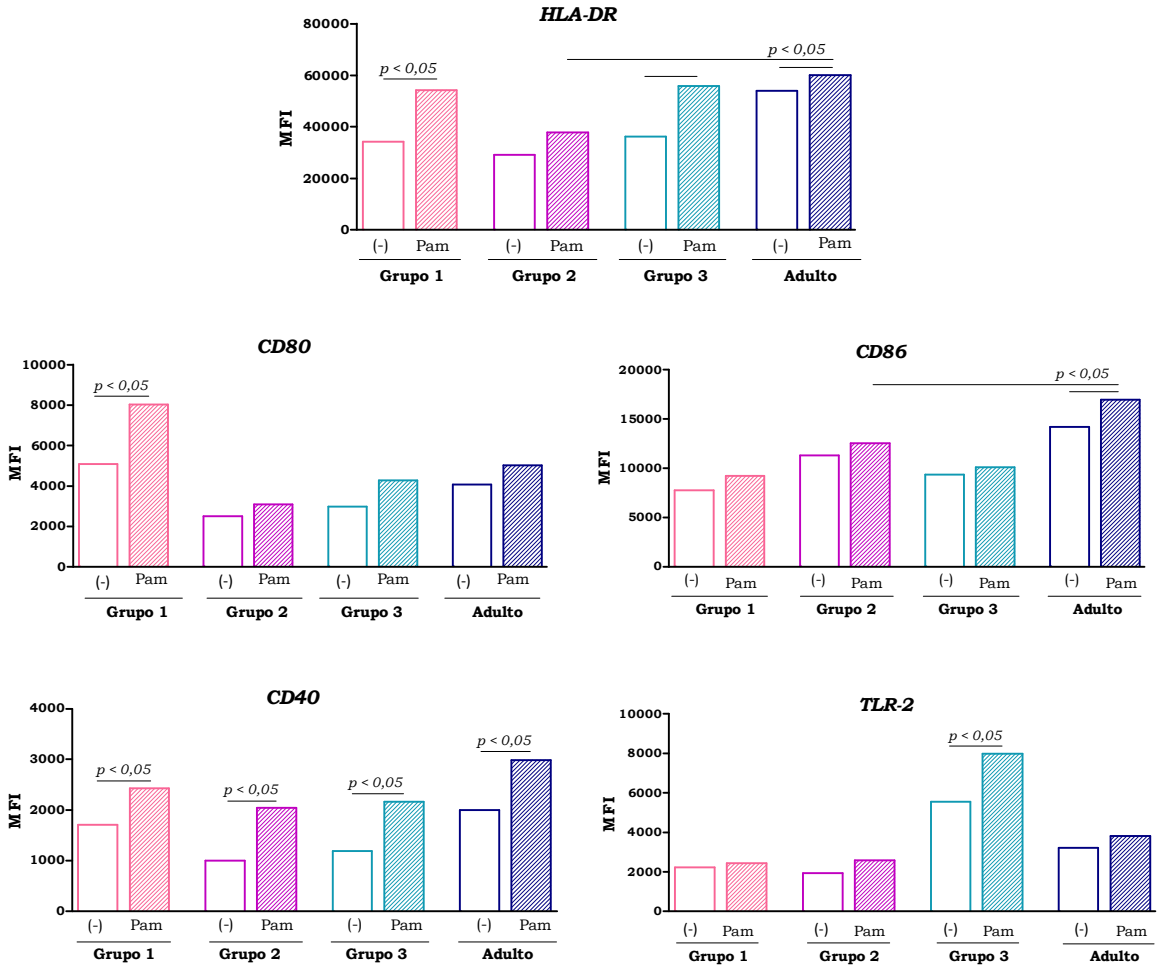


Figura 4. Análise da Mediana do Índice de Fluorescência (MFI) da expressão dos marcadores CD80, CD86, CD40, TLR-2 e HLA-DR das culturas de monócitos ativados (Pam) e não ativados (-) com Pam3CSK4 por 18 horas. Os gráficos representam a média dos valores de cada grupo.

Ao analisarmos os marcadores entre os grupos, observamos baixa expressão de CD80 pelos monócitos de todos os grupos incluindo o adulto, exceto para o Grupo 1, o qual apresentou expressão mais elevada antes do estímulo e um aumento estatisticamente significativo após o estímulo.

Monócitos neonatais apresentam alta expressão da molécula co-estimuladora CD86, no entanto, apenas o grupo adulto apresentou

diferenças significativas entre monócitos estimulados e não estimulados, além de níveis superiores de expressão de CD86 em relação aos neonatos pré-termos tardios do Grupo 2. A expressão basal de HLA-DR foi menor nos RNs quando comparados aos adultos, mas após a ativação, todos os RNs apresentaram uma boa expressão desta molécula, com exceção do Grupo 2.

Quanto a expressão de CD40, todos os grupos apresentaram aumento estatisticamente significativo e semelhante após a resposta ao estímulo.

Surpreendentemente, foram observados níveis equivalentes de expressão de todos os marcadores no Grupo 1 em relação aos outros grupos de RNs e uma boa resposta após estímulo com Pam3CSK4. Não foi observado aumento expressivo de TLR-2 entre monócitos não estimulados e estimulados, exceto para o Grupo 3.

As citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 e IL-10 foram dosadas no sobrenadante das culturas de monócitos e os resultados estão apresentados na **Figura 5**.

Os monócitos neonatais apresentaram uma tendência à produção de níveis mais altos de todas as citocinas pró-inflamatórias, IL-6, TNF-α e IL-1β quando comparados aos adultos, exceto de IL-8. A dosagem das citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α revelaram diferenças significativas entre pré- e pós-estímulo para todos os grupos, enquanto para a IL-8, todos os grupos apresentaram altos níveis de produção, no entanto, apenas o

Grupo 3 e o adulto mostraram diferença significativa entre pré- e pós-estímulo.

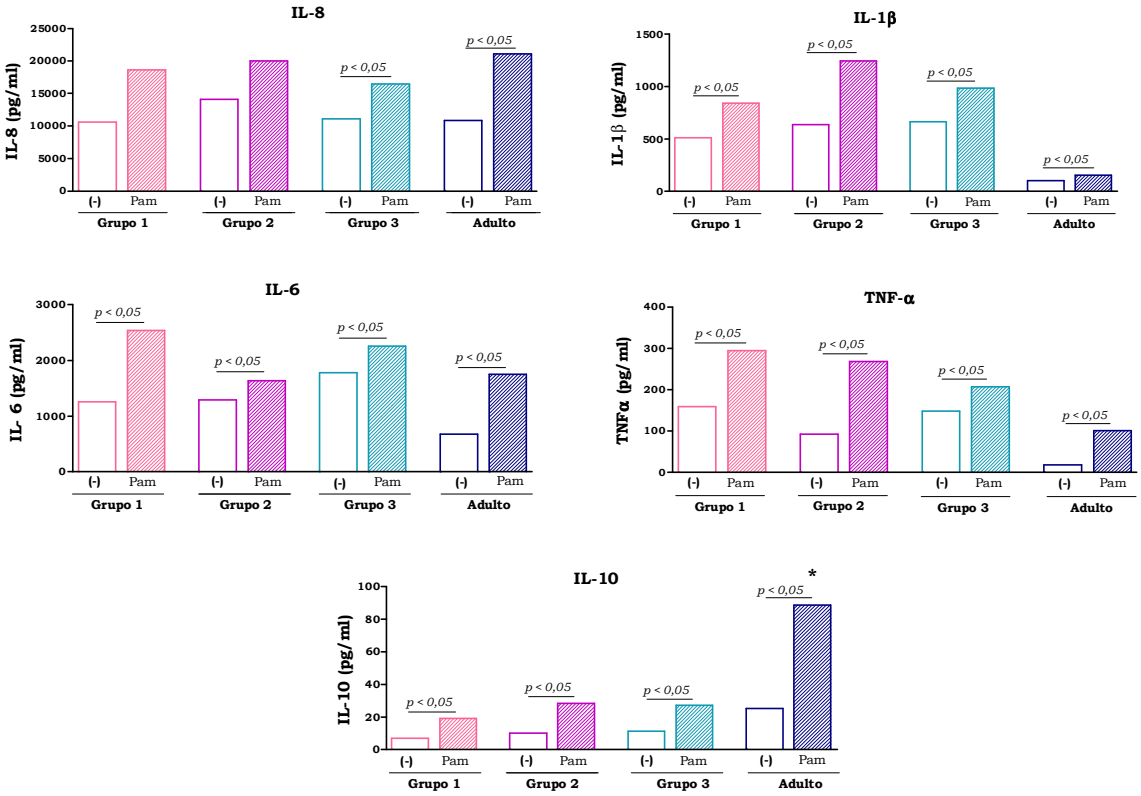


Figura 5. Concentrações das citocinas IL-8, IL-1β, IL-6, TNF-α e IL-10 nos sobrenadantes das culturas de monócitos ativados e não ativados com Pam3CSK4 por 18 horas. Pam: monócitos estimulados com 5µg/mL de Pam3CSK4; (–): monócitos não estimulados. *****: valor significativamente maior quando comparado aos monócitos estimulados dos grupos de recém-nascidos. Os gráficos representam a média dos valores de cada grupo.

Quanto a produção de IL-10, monócitos neonatais e de adultos responderam bem ao estímulo com diferenças significativas entre monócitos pré e pós-estimulados para todos os grupos. Embora tenham respondido bem ao estímulo, monócitos de RNs prematuros extremo e tardio e a termo apresentaram produção marcadamente reduzida de IL-10 pós-estímulo quando comparados aos adultos.

4.4. Caracterização dos leucócitos do sangue total por Imunofenotipagem

A caracterização dos leucócitos foi realizada com 13 amostras de sangue de cordão umbilical de RNs do Grupo 1, 21 amostras do Grupo 2, 22 amostras do Grupo 3 e 39 amostras de sangue periférico de adultos.

A análise estatística revelou que RNs a termo (Grupo 3) apresentam maior número de leucócitos totais quando comparados aos RNs pré-termos menores e maiores que 34 semanas de gestação e aos adultos ($p<0,05$), dados mostrados na **Tabela 17**, a seguir. Em adição, adultos apresentam menor número de leucócitos quando comparados aos 3 grupos de RNs.

Tabela 17. Contagem de leucócitos totais nas amostras de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos dos grupos 1, 2 e 3 e no sangue periférico dos adultos

	Grupo 1 [N=13]	**Grupo 2 [N=21]**	**Grupo 3 [N=22]**	**Adulto [N=39]**
	Média (mínimo – máximo)			
Nº leucócitos (10^3/µl)	9,1 (4,0 – 17,6)	10,4 (5,8 - 22,9)	14,8* (6,5 - 31,2)	6,6† (3,3 - 12,1)

Nº: número. *: valor significativamente maior quando comparado aos outros grupos ($p < 0,05$). †: valor significativamente menor quando comparado aos outros grupos ($p < 0,05$).

Para a caracterização das células dendríticas (DCs) mielóides e plasmocitóides, as marcações foram feitas no mesmo tubo analisando marcadores de superfície e de ativação celular. Os resultados estão

expressos pela mediana do número absoluto de células dendríticas totais ($Lin^{-}HLA\text{-}DR^{+}$) e da frequência (%) de cada subpopulação de células dendríticas, descritas na **Figura 6**.

A população de DCs das amostras de sangue de cordão umbilical e periférico de adulto foram definidas como $LIN^{-}HLA\text{-}DR^{+}$, de acordo com Koumbi et al. (2010), e as populações mielóide ($LIN^{-}HLA\text{-}DR^{+}CD11c^{+}$) e plasmocitóide ($LIN^{-}HLA\text{-}DR^{+}CD123^{+}$) foram caracterizadas como descrito por Sorg et al. (1999) e Schreibelt et al. (2010).

Os valores das medianas (mínimo - máximo) da frequência de células $LIN^{-}HLA\text{-}DR^{+}$ do Grupo 1 foi 1,5% (0,4 - 5,9); do Grupo 2: 1,4% (0,6 - 6,1); Grupo 3: 1,8% (0,2 - 7,6) e do Adulto foi 0,5% (0,1 - 2,0) do total de células analisadas, ou seja, o sangue periférico de adultos apresentou frequência significativamente menor de células dendríticas totais quando comparado ao sangue de cordão de recém nascidos pré-termo e a termo.

Com relação ao número absoluto, os resultados mostraram que os RNs dos três grupos apresentam maior número de DCs $LIN^{-}HLA\text{-}DR^{+}$ quando comparados ao sangue periférico de adultos.

Recém-nascidos do Grupo 3 apresentaram frequência significativamente menor de DCs mielóides e plasmocitóides em relação aos outros grupos de RNs e ao adulto e amostras de adultos apresentaram uma frequência significativamente maior de DCs mielóides quando comparados ao Grupo 2.

Não houve diferenças significativas entre os grupos quanto à expressão de CD1a, mas recém-nascidos prematuros possuem uma tendência a expressar maior frequência de DCs plasmocitóides imaturas em relação aos RNs a termo. Ainda, observa-se uma maior porcentagem de DCs plasmocitóides imaturas em relação às mielóides em todos os grupos.

Inversamente, foi observada uma maior proporção de DCs mielóides expressando os marcadores de ativação celular CD80 e CD86 em relação às DCs plasmocitóides para todos os grupos. Foi observado um aumento da expressão de CD80 nos dois tipos celulares, de acordo com a idade gestacional, com significativa menor expressão de CD80 em DCs de RNs pré-termos do Grupo 1 em relação ao Grupo 3 e adultos. A expressão de CD86 em mDCs e pDCs foi semelhante entre os grupos.

Foi observada uma maior frequência DCs mielóides e plasmocitóides TLR-2^{+} em RNs a termo e adultos quando comparados aos pré-termos, porém não estatisticamente significativa.

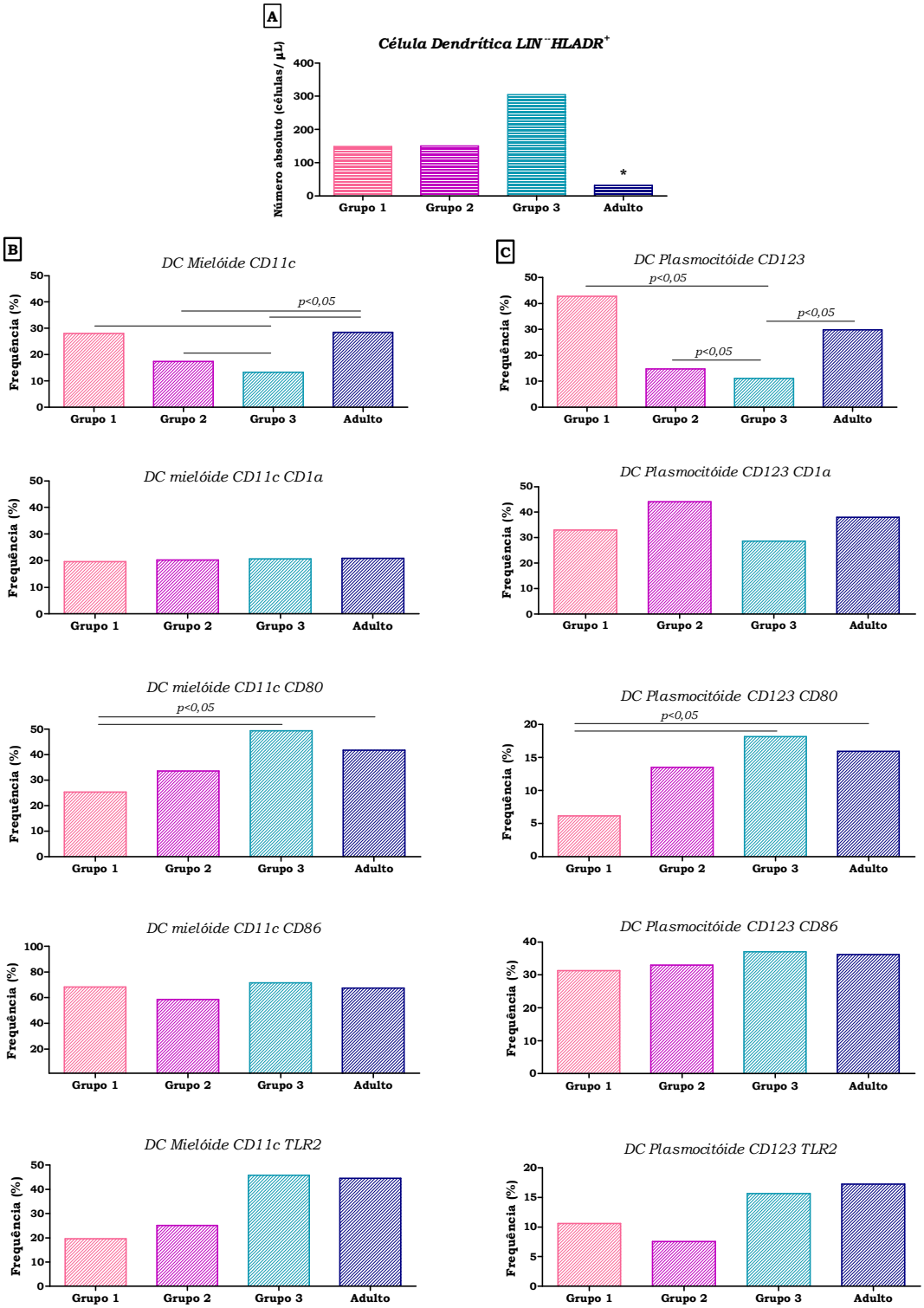


Figura 6. (**A**) Mediana do número absoluto (células/µl) das populações de células dendríticas totais (Lin⁻HLA-DR⁺); Frequência (%) de células dendríticas mielóides CD11c (**B**) e plasmocitóides CD123 (**C**); imaturas (CD1a); expressando os marcadores CD80, CD86 e TLR-2 em amostras de sangue de cordão dos RNs dos Grupos 1, 2 e 3 e de sangue de adultos. DC: célula dendrítica; *****: valor significativamente menor do adulto quando comparado aos RNs ($p < 0,05$). Os dados estão representados pela mediana dos valores.

A **Figura 7** mostra a mediana dos valores absolutos da população de monócitos e das frequências de monócitos CD80⁺, CD86⁺ e expressando TLR-2. Os valores das medianas (mínimo - máximo) da frequência de monócitos CD14⁺HLA-DR⁺ do Grupo 1 representou 3,2% (1,3 – 6,7); Grupo 2: 3,9% (1,2 - 10,3); Grupo 3: 3,2% (0,7 – 12,9) e Adulto: 2,7% (0,3 – 7,7) do total de leucócitos analisados.

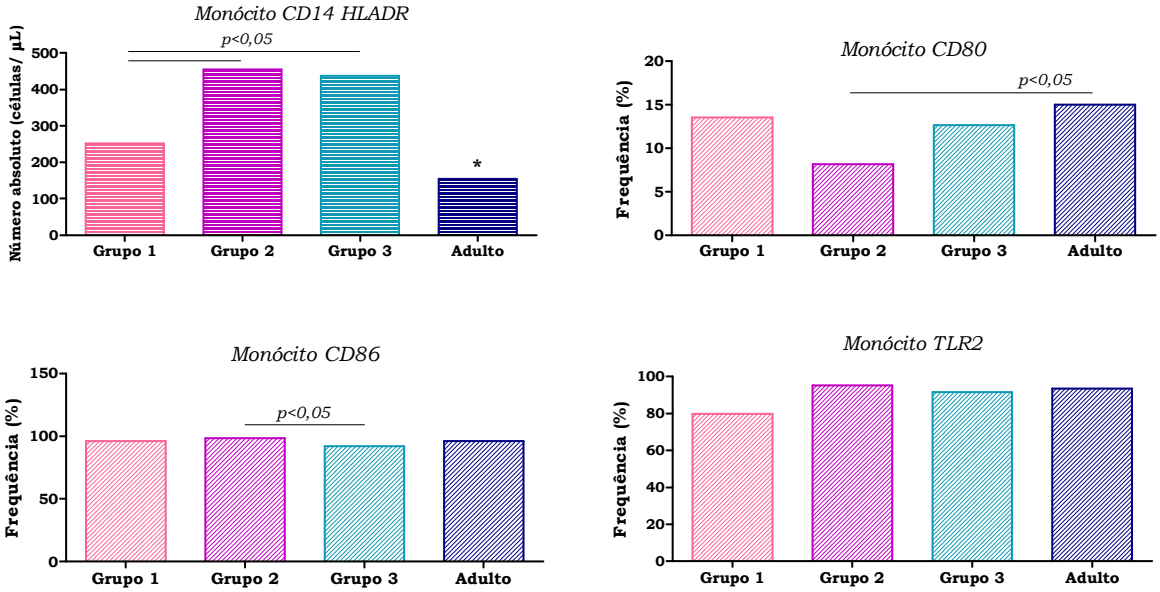


Figura 7. Mediana do número absoluto (células/µl) da população de monócitos CD14⁺ HLA-DR⁺ e Mediana da Frequência (%) dos marcadores de ativação celular CD80 e CD86, e TLR-2 em amostras de sangue de cordão umbilical dos recém-nascidos dos grupos 1, 2 e 3 e de sangue periférico de adultos. *****: valor significativamente menor do adulto quando comparado com os grupos de RNs ($p < 0,05$). Os dados estão representados pelas medianas dos valores.

A população de monócitos foi definida pelo *gate* de células CD14⁺HLA-DR⁺ utilizando como parâmetro o tamanho (*forward scatter*, FSC) e a granulosidade celular (*side scatter*, SSC), assim como na

cultura de monócitos, como descrito na literatura (Sánchez-Torres et al., 2001).

Nossas análises mostraram números maiores de monócitos no sangue de cordão umbilical quando comparados ao sangue periférico de adultos. No entanto, o Grupo 1 apresentou número de monócitos significativamente menor quando comparado aos Grupos 2 e 3.

Em todos os grupos a frequência de monócitos que expressam CD80 foi reduzida e, em contrapartida, CD86 é amplamente expresso nesta população celular. RNs do Grupo 2 apresentaram menor expressão do marcador CD80 em relação ao adulto e os RNs do Grupo 3 revelaram menor expressão de CD86 em relação ao Grupo 2.

Também foram observadas altas porcentagens de monócitos expressando TRL-2, no entanto, RNs do Grupo 1 apresentaram números reduzidos destas células e uma tendência a expressar menor frequência deste receptor em monócitos quando comparados aos outros grupos.

A seguir, na **Figura 8**, estão representados os linfócitos T *helper* $CD3^+CD4^+$, expressos pela mediana do número absoluto destas células, e as medianas das frequências das subpopulações de linfócitos T CD4. Os valores das medianas (mínimo - máximo) da frequência da população de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ representaram no Grupo 1: 43,3% (14,4 - 50,0); Grupo 2: 42,1% (21,2 - 62,4); Grupo 3: 36,8% (23,2 - 50,2) e Adulto: 41,9% (27,6 - 59,1) do total de linfócitos analisados.

Em nosso estudo, optamos por analisar os mesmos conjuntos de marcadores citados por Tanel et al. (2009) a fim de determinar as diferentes subpopulações de células T.

O sangue de cordão umbilical apresentou números significativamente maiores de linfócitos T $CD3^{+}CD4^{+}$ em relação ao adulto.

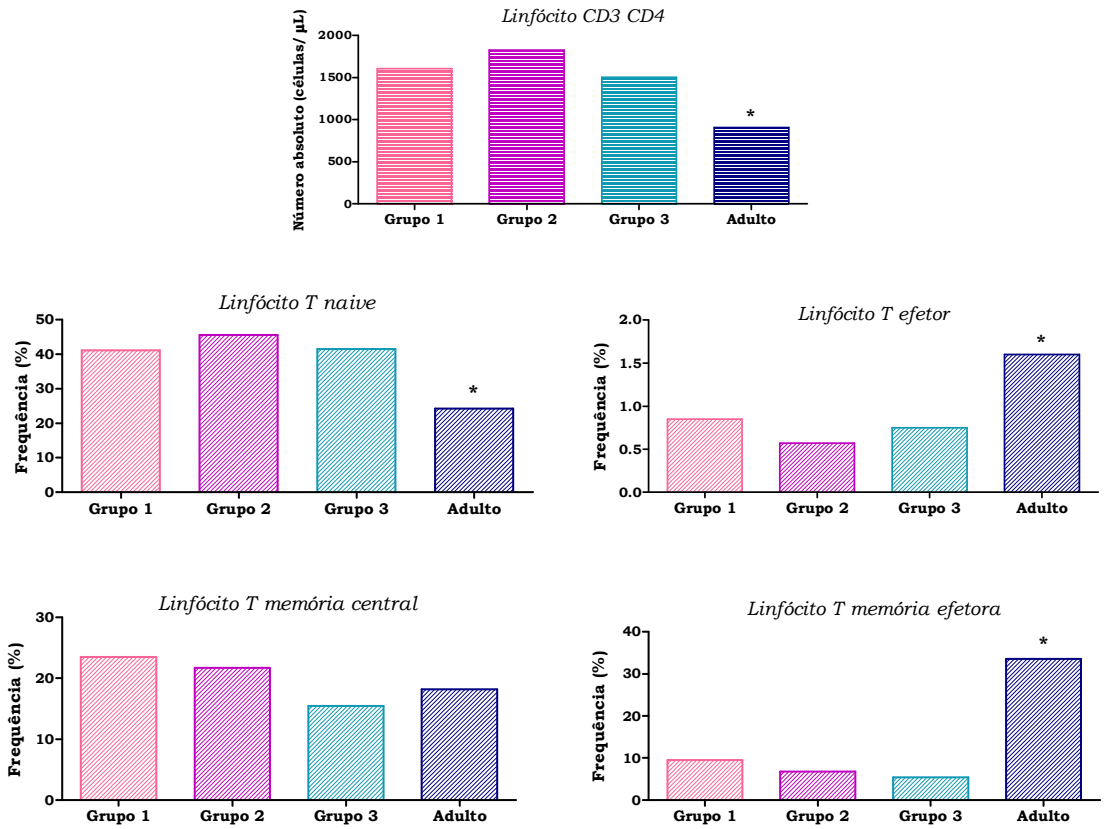


Figura 8. Mediana do número absoluto (células/µl) da população de linfócitos T $CD3^{+}CD4^{+}$ e mediana das frequências (%) das subpopulações de linfócitos T CD4 caracterizados pelos seguintes marcadores: Linfócito T *naive*: $CD4^{+}CD45RA^{+}CCR7^{+}CD27^{+}CD28^{+}CD62L^{+}$; Linfócito T efetor: $CD4^{+}CD62^{Low}CD69^{+}$; Linfócito T memória central: $CD4^{+}CD45RA^{-}CCR7^{+}CD27^{+}$; Linfócito T memória efetora: $CD4^{+}CD45RA^{-}CCR7^{-}CD27^{+}$ em amostras de sangue de cordão umbilical dos recém-nascidos dos Grupos 1, 2 e 3 e de sangue periférico de adultos. *****: diferença estatística do adulto quando comparado aos grupos de RNs ($p<0,05$). Os dados estão representados pelas medianas dos valores.

Quanto às várias subpopulações de linfócitos, a frequência de linfócitos T *naïve* é maior nos 3 grupos de RNs quando comparados ao adulto que, por sua vez, apresentou maior frequência de linfócitos T efetores e de memória efetora quando comparado aos RNs. Com relação aos linfócitos T de memória central, os valores percentuais foram equivalentes entre os grupos.

Os números absolutos de células B $CD19^+$ e as medianas das frequências das subpopulações destas células estão descritos na **Figura 9**.

A análise da frequência de células B $CD19^+$ resultou em uma mediana (mínimo - máximo) de 16,1% (6,8 - 26,6) para o Grupo 1; Grupo 2: 11,5% (4,5 - 30,7); Grupo 3: 12,6% (6,5 - 26,9) e Adulto 11,1% (2,4 - 28,0) do total de linfócitos analisados.

Foi observado um número significativamente maior de linfócitos B nas amostras de RNs dos 3 grupos quando comparados as amostras de adulto, bem como as porcentagens de linfócitos B *naïve* e, de modo inverso, os RNs apresentaram menor frequência de linfócitos B de memória em relação aos adultos.

As frequências de linfócitos B ativados foram muito reduzidas em todos os grupos, inclusive nos adultos, e nenhuma diferença estatística foi detectada entre os grupos.

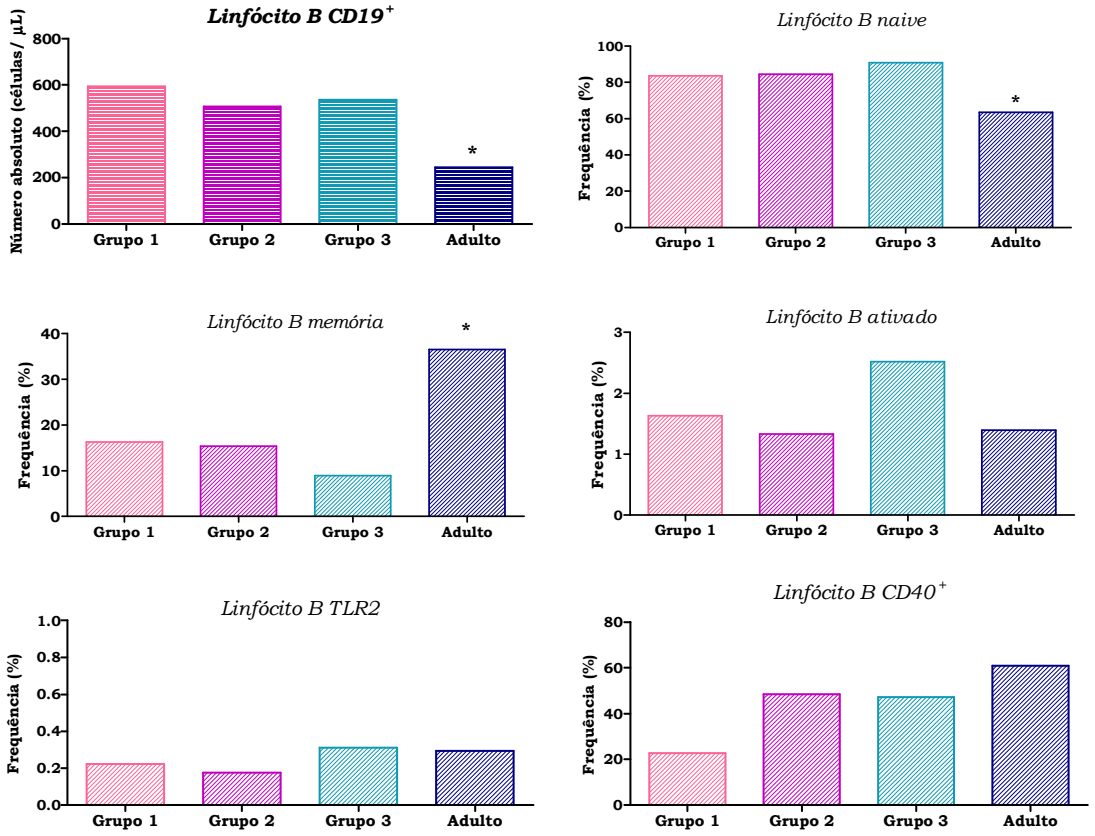


Figura 9. Mediana do número absoluto (células/µl) dos linfócitos B CD19^{+} em amostras de sangue de cordão umbilical dos recém-nascidos dos grupos 1, 2 e 3 e de sangue periférico de adultos. Mediana da frequência das subpopulações de linfócito B caracterizadas pelos seguintes marcadores: Linfócito B *naive*: CD19^{+}CD27^{-}; Linfócito B de memória: CD19^{+}CD27^{+}; Linfócito B ativado: CD19^{+}CD69^{+}CD40^{+}; Linfócitos expressando TLR-2 e CD40. *****: diferença estatística do adulto quando comparado aos grupos de RNs ($p<0,05$). Os dados estão representados pelas medianas dos valores.

Quanto à expressão do TLR-2, podemos observar números muito reduzidos de células B expressando este marcador. Além disso, o Grupo 1 apresentou uma tendência a expressar menor porcentagem do marcador CD40.

4.5. Análise da função fagocítica e *burst* oxidativo pelo método de DHR

Antes de realizarmos as análises, confirmamos a marcação da bactéria por citometria de fluxo, como mostra a **Figura 10**, com imagens obtidas por microscopia confocal. Uma vez confirmada a eficácia da marcação, iniciamos a avaliação da atividade fagocítica e do *burst* oxidativo nos monócitos e neutrófilos do sangue de cordão umbilical dos RNs.

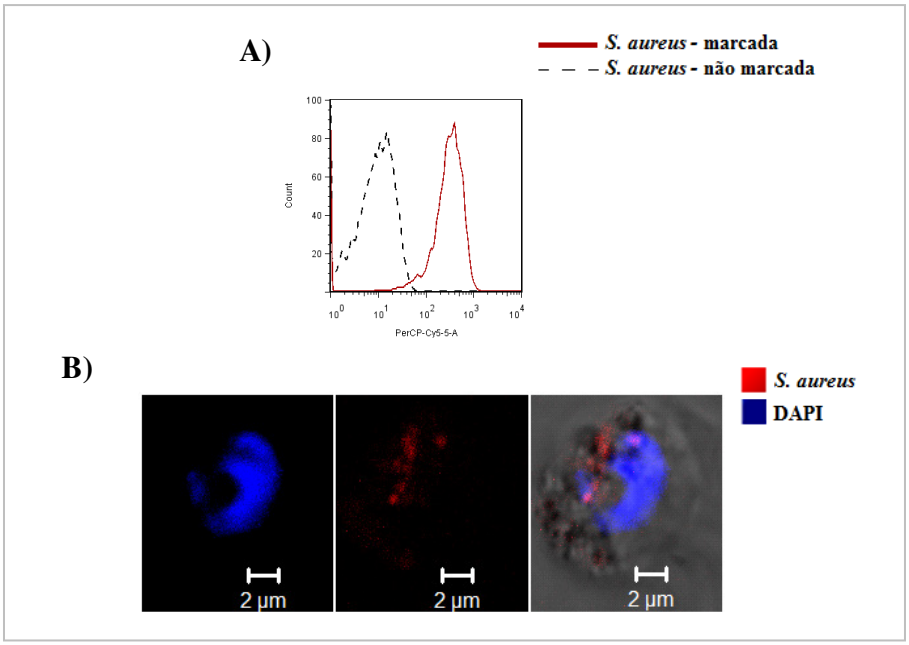


Figura 10. Marcação de *S. aureus* para realização da fagocitose. A) Histograma demonstrando a eficiência de marcação das bactérias. B) Imagens obtidas por microscopia confocal demonstrando a presença dos *S. aureus* no interior do fagócito. Os núcleos dos fagócitos foram marcados em azul com fluorocromo DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindol) e as bactérias em vermelho com iodeto de propídio.

O ensaio de DHR foi realizado com 8 amostras do Grupo 1, 12 do Grupo 2 e 23 amostras do Grupo 3, acompanhadas por 24 amostras de sangue periférico de adultos saudáveis.

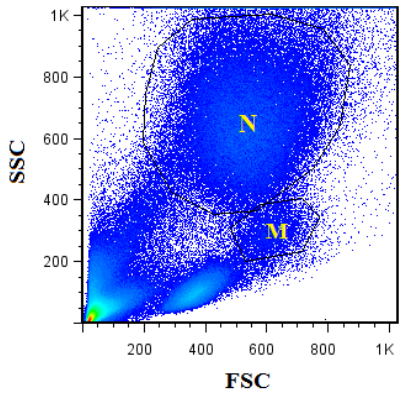


Figura 11. *Dot plots* representativos dos *gate*s nas populações de neutrófilos (N) e monócitos (M) tendo como parâmetro o tamanho (*forward scatter*, FSC) e granulosidade celular (*side scatter*, SSC) para análise da atividade fagocítica e produção de H_2O_2.

As populações de monócitos e neutrófilos foram delimitadas utilizando como parâmetro o tamanho (FSC) e granulosidade celular (SSC), como mostra a **Figura 11**, acima.

Os resultados do índice de fagocitose de *S. aureus* por monócitos e neutrófilos foram determinados pela porcentagem, que indica a quantidade de células com capacidade fagocítica e pela Média da Intensidade de Fluorescência ($M_{ean}FI$) obtida nas análises, que corresponde ao número de bactérias que cada célula fagocítica internalizou.

Observa-se, na **Figura 12**, que os monócitos neonatais apresentam um aumento discreto da capacidade fagocítica de *S. aureus* de acordo com a idade gestacional, mas monócitos de adultos são

significativamente mais eficientes neste processo. O mesmo é visto para o $M_{ean}FI$, onde a quantidade de bactérias fagocitadas aumenta gradativamente de acordo com a idade gestacional, porém nenhuma diferença estatística foi evidenciada quando os RNs foram comparados aos adultos.

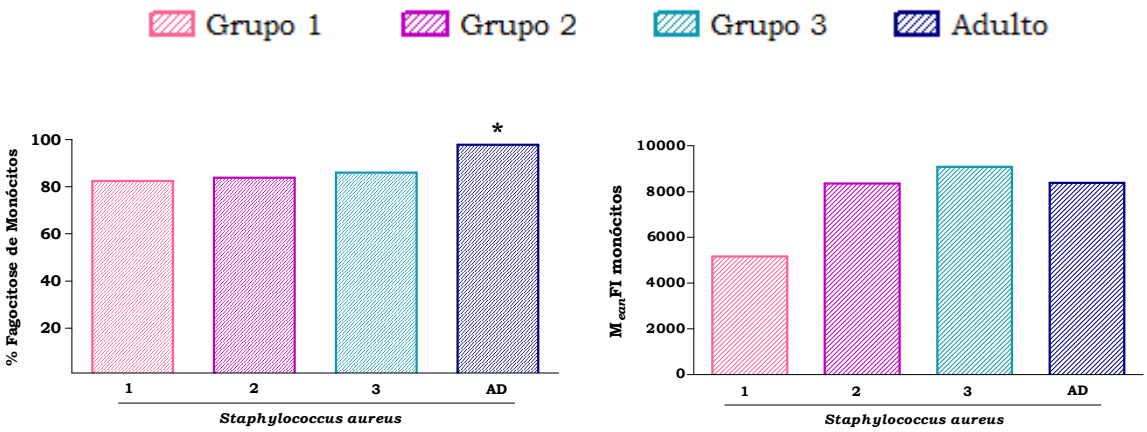


Figura 12. Fagocitose de *S. aureus* por monócitos. Porcentagem de fagocitose por monócitos e índice de fagocitose representado pelo $M_{ean}FI$, respectivamente. *****: diferença estatística do adulto quando comparado aos grupos de RNs ($p<0,05$). Os dados estão representados pela mediana dos valores.

Embora tenham sido detectadas porcentagens muito altas de fagocitose de *S. aureus* por neutrófilos de todos os grupos, os neutrófilos neonatais, assim como os monócitos, também apresentam capacidade fagocítica significativamente reduzida em relação aos de adultos (**Figura 13**). Os resultados também demonstram que neutrófilos são fagócitos mais eficientes, com um $M_{ean}FI$ acima dos 10.000, mas os neutrófilos do Grupo 3 apresentaram valor estatisticamente superior quando comparados aos do Grupo 1.

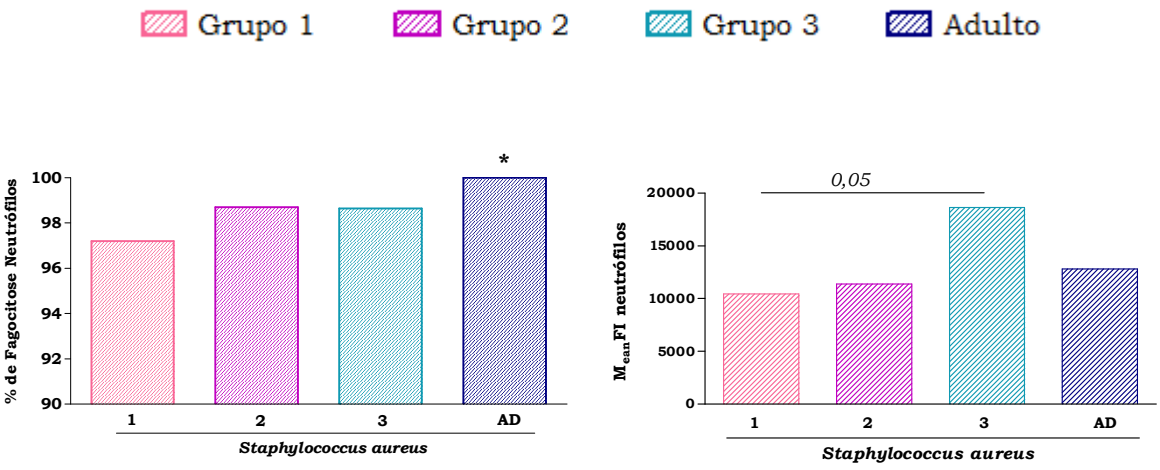


Figura 13. Fagocitose de *S. aureus* por neutrófilos. Porcentagem de fagocitose por neutrófilos e índice de fagocitose representado pelo M_{ean}FI. *****: diferença estatística do adulto quando comparado aos grupos de RNs (*p<0,05*). Os dados estão representados pela mediana dos valores.

A seguir, na **Figura 14**, estão apresentados os resultados da análise da produção de peróxido de hidrogênio após estimulação dos fagócitos com PMA ou após a fagocitose de *S. aureus*.

Os dados apresentados pela porcentagem representam os fagócitos produtores de H_2O_2 e o M_{ean}FI representa a quantidade destas moléculas que foram produzidas.

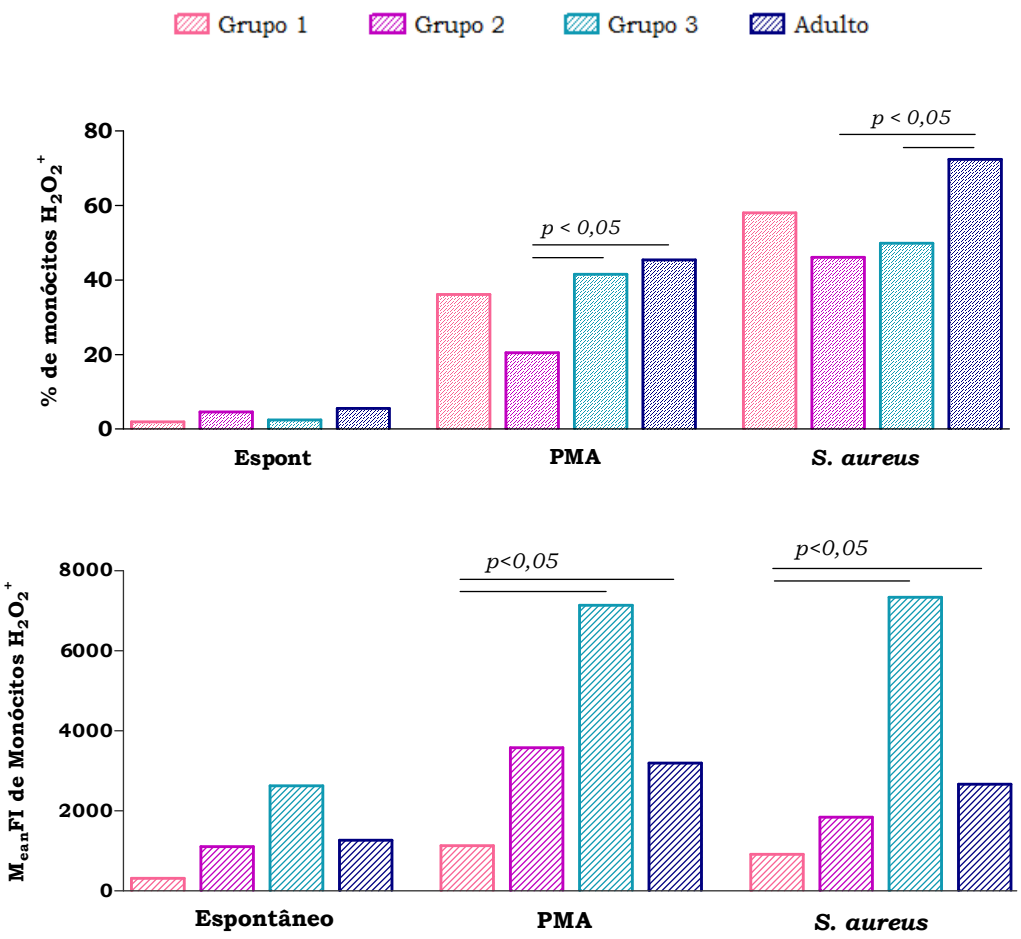


Figura 14. Avaliação do *burst* oxidativo de monócitos de RNs e adultos mediante estimulação com PMA ou após fagocitose de *S. aureus*. As barras representam as porcentagens e o M_{ean}FI de células produtoras de H_2O_2. Os dados estão representados pela média dos valores.

Os resultados demonstraram que RNs são capazes de gerar *burst* oxidativo após a fagocitose de *S. aureus*, na qual a porcentagem de monócitos produtores de peróxido de hidrogênio foi maior do que em resposta ao estimulo com PMA, que consistiu em nosso controle positivo.

A porcentagem dos monócitos produtores de H_2O_2 foi reduzida no Grupo 2 em relação ao Grupo 3 e aos adultos quando estimulados com PMA e foi reduzida nos Grupos 2 e 3 em relação aos adultos após

fagocitose de *S. aureus*. Quanto à análise do $M_{ean}FI$, foi observada uma alta produção de H_2O_2 pelo Grupo 3 e apenas o Grupo 1 apresentou valores significativamente menores em relação ao Grupo 3 e aos adultos, após ativação com PMA e fagocitose de *S. aureus*.

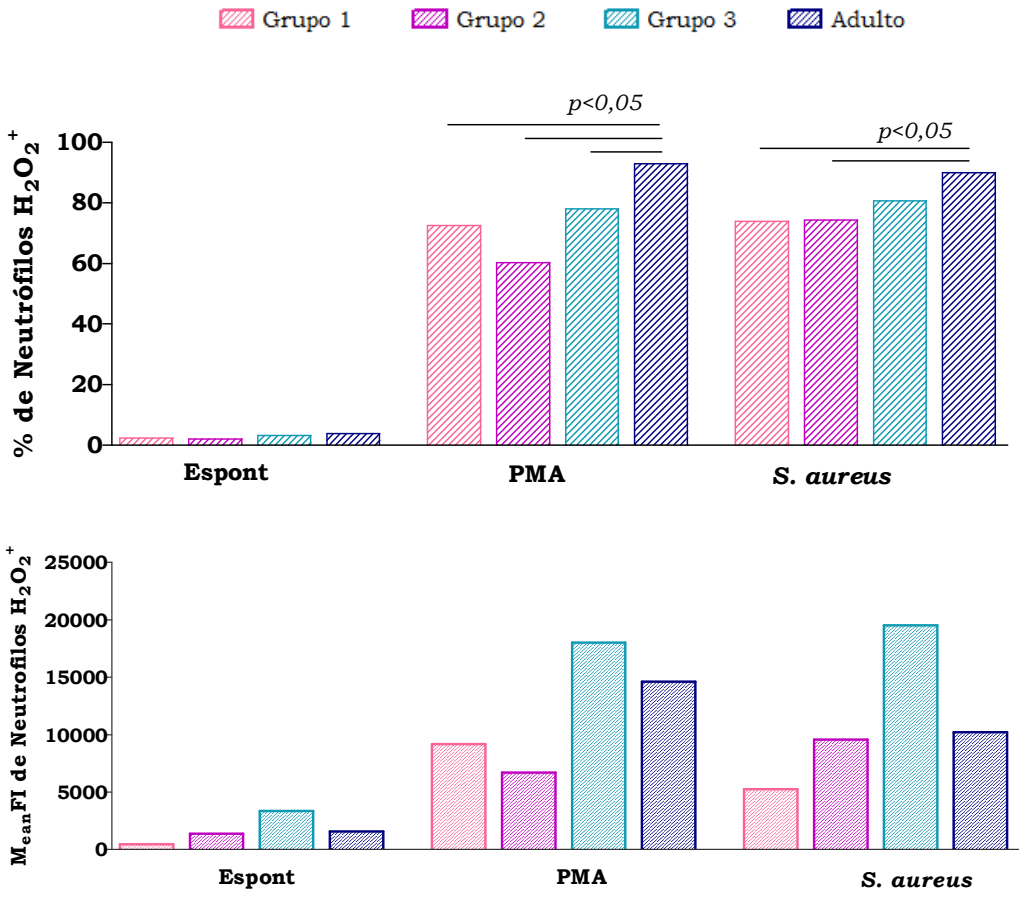


Figura 15. Avaliação do *burst* oxidativo de neutrófilos de RNs e adultos mediante estimulação com PMA ou após fagocitose de *Staphylococcus aureus*. As barras representam as porcentagens e o $M_{ean}FI$ de células produtoras de H_2O_2. Os dados estão representados pela média dos valores.

Na **Figura 15**, acima, observou-se que neutrófilos de todos os grupos foram capazes de gerar *burst* oxidativo, com alta produção de H_2O_2 após estímulo com PMA, no entanto, observamos frequências

significativamente reduzidas de neutrófilos produtores de H_2O_2 em todos os RNs quando comparados aos adultos.

Após a fagocitose de *S. aureus*, observou-se porcentagem inferior de neutrófilos produtores de H_2O_2 somente nos RNs pré-termo dos Grupos 1 e 2 quando comparados aos adultos. Quanto à análise do M_{ean}FI, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

4.6. Análise da via de sinalização intracelular de TLR-2 em monócitos

4.6.1. Extração de proteínas totais dos monócitos em cultura

Foram extraídas as proteínas dos monócitos cultivados de 6 recém-nascidos do Grupo 1, 6 do Grupo 2, 12 do Grupo 3 e 9 de adultos antes e após o estímulo com Pam3CSK4.

A extração de proteínas, apresentou um bom rendimento para a realização dos testes de *Western blotting,* variando de 14,0 a 17,0 mg/ml.

4.6.2. Western blotting

O *Western blotting* foi realizado com 2 amostras do Grupo 1, 2 amostras do Grupo 2, 4 amostras do Grupo 3 e 3 amostras de adultos.

A avaliação da proteína MyD88 (**Figura 16**) revelou um aumento da sua expressão frente ao estímulo em monócitos do Grupo 1, do

Grupo 2 e do adulto. O neonato do Grupo 3 expressou níveis semelhantes aos basais desta proteína após o estímulo.

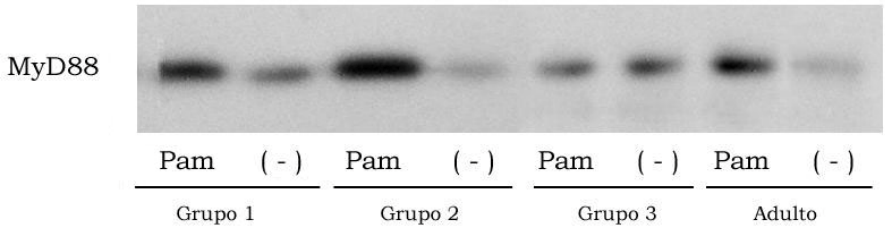


Figura 16. Expressão de MyD88 (33kDa) em cultura de monócitos estimulados ou não (-) com Pam3CSK4 de 1 amostra dos Grupos 1, 2, 3 e de adulto. As proteínas foram analisadas por *Western blotting* com os anticorpos primários policlonais desenvolvidos em coelho e com anticorpo secundário anti-IgG de coelho.

Na **Figura 17**, é possível observar claramente o aumento da expressão da JNK fosforilada após adição do estímulo, tanto em monócitos do RN do Grupo 3, como em monócitos do adulto. Monócitos do RN do Grupo 1 revelaram uma fraca expressão desta molécula, tanto antes como após a adição do estímulo.

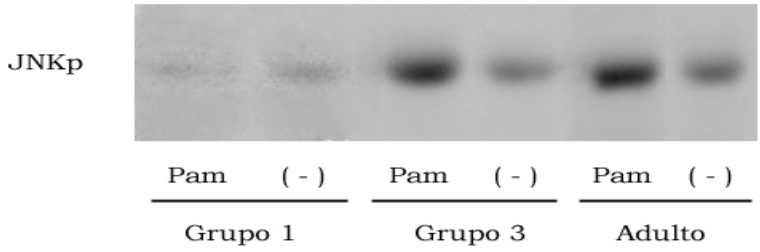


Figura 17. Expressão de JNK fosforilada (54kDa) em cultura de monócitos estimulados ou não (-) com Pam3CSK4 de 1 amostra do Grupo 1, 1 do Grupo 3 e 1 amostra de adulto. As proteínas foram analisadas por *Western blotting* com os anticorpos primários policlonais desenvolvidos em coelho e com anticorpo secundário anti-IgG de coelho.

O *Western blotting* realizado para detecção do controle endógeno GAPDH demonstrou expressão semelhante entre as amostras pré e pós-estímulo apenas no adulto. As amostras de recém-nascidos mostraram a expressão da proteína, constituindo um controle importante do teste, porém pareceu sofrer influência do estímulo e a amostra de RN do Grupo 1 mostrou uma expressão fraca da proteína, antes e após o estímulo (**Figura 18**).

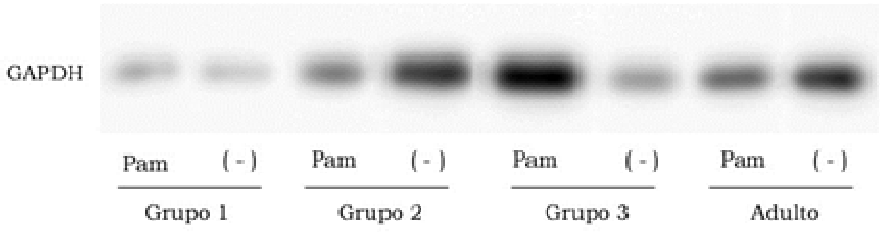


Figura 18. Expressão de GAPDH (38kDa) em cultura de monócitos antes (-) ou após estímulo com Pam3CSK4 (Pam) de 1 amostra dos Grupos 1, 2, 3 e de adulto. As proteínas foram analisadas por *Western blotting* com os anticorpos primários policlonais desenvolvidos em camundongo e com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo.

4.6.3. *Phosflow*

Esta técnica foi realizada com 3 amostras do Grupo 1, 6 do Grupo 2, 12 do Grupo 3 e 12 amostras de adultos.

Os resultados das análises das moléculas fosforiladas (ativadas) ERK-1/2, NF-κB e p38 estão representados pela média da intensidade de florescência (M_{ean}FI), como mostra a **Figura 19**.

Os resultados mostraram que os monócitos estimulados com o Pam3CSK4 apresentam um aumento do M_{ean}FI, variando esta intensidade para cada grupo e molécula analisada.

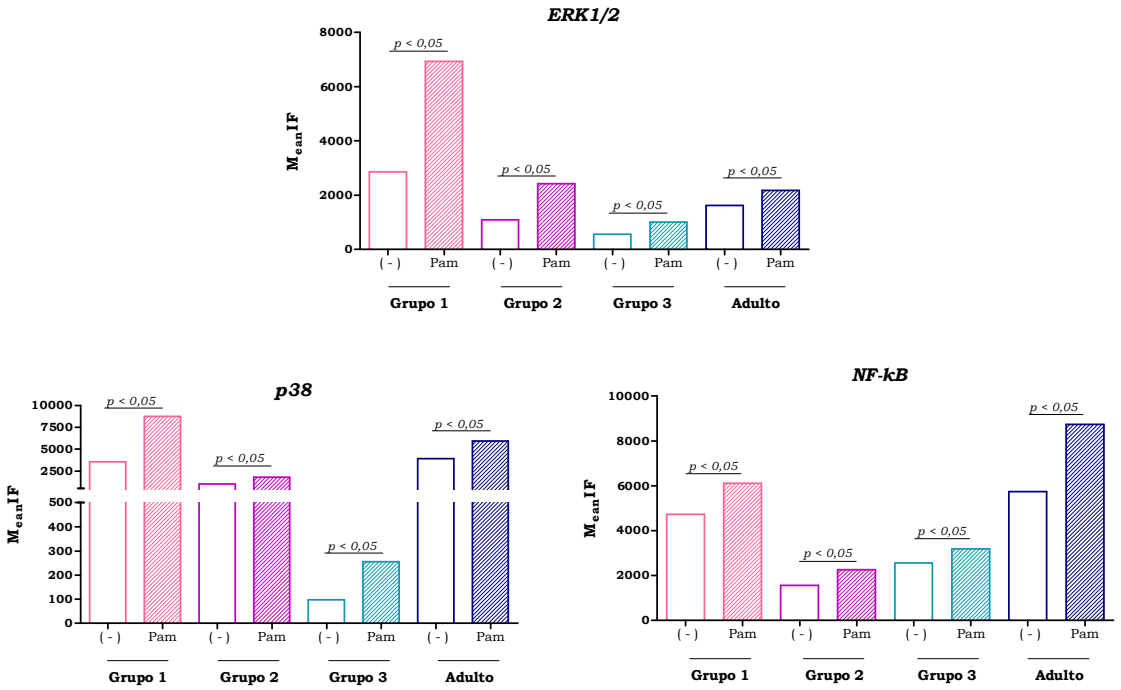


Figura 19. Análise da média da intensidade de fluorescência ($M_{ean}FI$) da expressão das proteínas ERK-1/2, p38 e NF-κB ativadas (fosforiladas) em cultura de monócitos $CD14^{+}HLA\text{-}DR^{+}$ não ativados (-) e ativados com Pam3CSK4 por 20 minutos. Os gráficos representam a mediana dos valores de cada grupo.

Nota-se uma expressão aumentada da ERK-1/2 pelo Grupo 1 e reduzida expressão pelos outros grupos. No entanto, todos apresentaram diferença significativa quando os monócitos pré- e pós-estímulo foram comparados e nenhuma diferença foi detectada entre os grupos.

A molécula p38 mostrou-se expressa em níveis diferentes para cada grupo, mas todos os grupos apresentaram diferenças significativas entre os monócitos pré- e pós-estímulo. O Grupo 3 revelou baixa expressão desta proteína e os RNs pré-termos e adultos mostraram alta expressão, porém não foram detectadas diferenças entre os grupos.

Quanto ao fator de transcrição NF-κB, foi observada menor expressão nos Grupos 2 e 3 e uma tendência a maior expressão pelo Grupo 1 e adultos, no entanto sem diferenças significativas quando os grupos foram comparados.

É notável a tendência a uma menor expressão de todas as moléculas pelo grupo de recém-nascidos a termo e maior expressão pelos RNs prematuros extremo. Mas para melhor avaliação desses dados será necessário aumentar o número amostral de tal experimento.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi realizada a avaliação da imunidade inata e seus mecanismos de ativação via TLR-2 em monócitos de recém-nascidos pré-termo extremo, pré-termo tardio e a termo.

O trabalho envolveu um grande número de diferentes tipos de experimentos para avaliar a imunidade inata destes recém-nascidos. Estes experimentos compreenderam desde a dosagem de citocinas do soro dos RNs, como forma de triagem para determinar presença de infecção, imunofenotipagem do sangue total a fim de avaliar a presença dos leucócitos envolvidos na resposta imune inata, avaliação funcional dos monócitos em cultura frente ao estímulo antigênico com a caracterização desta população celular através da imunofenotipagem e dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias, avaliação da capacidade fagocítica de *S. aureus* e do *burst* oxidativo de monócitos e neutrófilos, além da extração de proteínas de monócitos estimulados em cultura para a avaliação das moléculas da via de sinalização intracelular do TLR-2 por *Western blotting* e por Citometria de fluxo.

A realização de todos os experimentos citados acima revelou um grande desafio no que se refere ao volume insuficiente de sangue obtido para a realização de todos os ensaios propostos, o que ficou evidenciado nos diferentes números amostrais utilizados em cada um dos 8 ensaios. Vale ressaltar que de todas as amostras de sangue de cordão umbilical

coletadas, algumas foram descartadas antes mesmo de ser realizada a dosagem de citocinas séricas, em virtude do diagnóstico de infecção realizado após o parto ou pela presença de patologias maternas, o que é comum na população de RNs prematuros.

Na maioria das gestações que termina em parto pré-termo extremo, a probabilidade de haver complicações por corioaminionite e/ou infecção neonatal adquirida por transmissão vertical da mãe é maior (Krediet et al., 2007), o que dificulta o aumento do número de amostras colhidas do grupo de recém-nascidos abaixo de 34 semanas. Além disso, na maioria desses casos, após a dequitação da placenta, a mesma é levada para análise anatomopatológica ou apresenta-se fragmentada e com coágulos, impossibilitando a coleta do sangue. Com relação ao Grupo 2 (pré-termos tardios), há maior disponibilidade de coleta dessas amostras e, sendo assim, o número de amostras de sangue de cordão umbilical deste grupo foi maior que no Grupo 1. Com relação aos RNs a termo, não encontramos dificuldades nas coletas, pois a grande maioria dessas amostras vem de mães que se adequam aos critérios de inclusão definidos no trabalho, não havendo sinais de infecção ou diagnóstico de patologias maternas ou neonatais que seriam consequentemente prejudiciais aos nossos resultados.

O padrão de citocinas pró- e anti-inflamatórias das amostras de soro de cordão de todos os RNs, pré-termo e a termo, efetivamente utilizadas no trabalho apresentou-se dentro dos valores considerados

normais descritos na literatura (Santana et al., 2001; Prokesová et al., 2006; Rizos et al., 2005).

Protonotariou et al. (1999) relataram que os níveis de IL-1β e IL-6 em soro de cordão umbilical não foram significativamente diferentes dos soros de adultos controle, enquanto os níveis de TNF-α apresentaram-se significativamente mais elevados nas amostras de soro de cordão umbilical, aumentando sua concentração até o 5º dia de vida do bebê e sofrendo uma redução, posteriormente, até o 44º dia. Por outro lado, Rizos et al. (2005) mostraram que as concentrações de IL-1β, IL-6 e TNF-α no soro de cordão são significativamente mais elevadas quando comparadas aos soros de adultos controle.

A gestação e o parto, como a maioria dos fenômenos biológicos, envolvem a atuação de citocinas. A relação entre os níveis de citocinas inflamatórias com o tipo de parto mostrou que o parto a termo está fortemente ligado a estimulação de uma rede de citocinas, o que é diretamente refletido 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 (Protonotariou et al., 1999).

Foi observado que o tipo de parto pode influenciar as concentrações de citocinas, as quais são mais elevadas em partos vaginais quando comparadas à cesárea (Rizos et al., 2005). Em nosso trabalho, as concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 mostraram-se significativamente mais elevadas no parto normal quando

comparado à cesárea, bem como para IL-1β, mesmo que em níveis mais reduzidos, o que não foi visto para TNF-α.

Também foi observado um aumento dos níveis de IL-17A no parto normal, citocina predominantemente secretada pelas células Th17, as quais apresentam inúmeras funções imunomoduladoras e induzem produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, TNF e quimiocinas (Harrington et al., 2005; Annunziato et al., 2008).

Esses resultados reforçam a sugestão de que o próprio parto a termo poderia consistir num processo inflamatório, o qual promove a ativação da resposta imune neonatal, refletido num aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias durante os primeiros dias de vida. A presença dos receptores solúveis de citocinas, sIL-6R, sTNFRI e sTNFRII, encontrados em concentrações elevadas nas amostras neonatais representa um mecanismo regulatório de proteção para o neonato contra a função sistêmica das citocinas, durante o trabalho de parto e na vida neonatal precoce (Rizos et al., 2005).

Interleucina-1β, IL-6 e TNF-α já foram encontradas em células, tecidos e fluidos associados à gestação (Miller et al., 1990; Tsunoda et al., 1990; Romero et al., 1990; Gunn et al., 1996; Olah et al., 1995). IL-1β pode iniciar um importante papel na embriogênese, desenvolvimento e diferenciação do feto pela regulação do crescimento e diferenciação de tecidos e órgãos (Tsunoda et al., 1990). Além disso, IL-1β estimula a produção de IL-6 e de prostaglandina pelo tecido intrauterino, podendo sinalizar o início do trabalho de parto. Na gestação a termo, IL-6 pode

orquestrar mudanças bioquímicas, imunológicas e fisiológicas que contribuem para a sobrevivência materna e fetal (Romero et al., 1990). O TNF-α é detectado na placenta, no líquido amniótico e na decídua e pode contribuir para a regulação da proliferação celular na unidade útero-placentária (Jäättelä et al., 1988).

Assim como as APCs, monócitos humanos apresentam alta expressão do MHC de classe II (molécula HLA-DR), envolvido na apresentação antigênica às células T e considerado um importante elo entre a resposta imune inata e a adquirida (Medzhitow e Janeway, 2000).

Em acordo com nossos resultados, Pérez et al. (2010) observaram que monócitos de RNs pré-termo e a termo apresentam menor expressão de HLA-DR quando comparados aos monócitos de adulto, o que poderia contribuir para uma defesa comprometida do recém-nascido. Por outro lado, ao serem estimulados, os monócitos dos 3 grupos de RNs promoveram um aumento da expressão dessa molécula em níveis semelhantes aos de adultos, sendo estatisticamente significativo para o Grupo 1 e para o Grupo 3.

Monócitos de recém-nascidos e de adultos apresentaram maior expressão de CD86 em relação ao CD80, no entanto, monócitos neonatais revelaram uma tendência a menor expressão de CD86 quando comparados aos adultos, sendo significativa somente para o Grupo 2. Em contrapartida, a expressão de CD80 foi reduzida em todos os grupos, com exceção do Grupo 1, que apresentou aumento

significativo após o estímulo. Os sinais fornecidos pela interação entre CD28 e as moléculas co-estimulatórias B7 são essenciais para a ativação inicial de células T *naïve* conduzindo a um aumento de produção de IL-2 e de expressão de IL-2R (CD25) por células T. Nos seres humanos, a família de moléculas B7, B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), interage com seus ligantes em células T, CD28 e CTLA4 (CD152), respectivamente, com diferentes afinidades promovendo a ativação ou interrupção da resposta (Carreno e Collins, 2002). Portanto, uma menor expressão de CD86 nos RNs poderia indicar um menor controle da resposta inflamatória e, a maior expressão de CD80 no Grupo 1, poderia, ainda, intensificar esta resposta.

A interação entre CD40, expressa na APC e o seu ligante na célula T, CD154 (CD40L), contribui para a capacidade das células T de ativar a síntese de citocinas inflamatórias de monócitos sugerindo que este par ligante-receptor pode contribuir para a manutenção e/ou exacerbação do processo inflamatório. Observamos que monócitos neonatais apresentam menor expressão de CD40 em relação aos adultos, porém revelaram um aumento significativo em resposta ao Pam3CSK4, em níveis semelhantes aos de adultos. Assim, deficiências na interação CD40-CD40L não são, provavelmente, devido a uma deficiência na apresentação antigênica neonatal, mas na capacidade de células T neonatais se ativarem (Han et al., 2004).

Com relação ao TLR-2, não foi observado um aumento expressivo entre monócitos estimulados e não estimulados, tanto neonatais como

de adultos. No entanto, monócitos do Grupo 3 mostraram uma maior expressão quando comparado aos outros grupos.

Um aspecto interessante da função de TLR foi descoberto quando a localização celular de TLR-2 foi monitorada após a estimulação de macrófagos com *zymosan*, um ligante de TLR-2. Neste estudo, foi demonstrado que, mediante a fagocitose de *zymosan,* o TLR-2 localiza-se primeiro nas vesículas fagocíticas e, subsequentemente, nos fagossomas. Esta observação surpreendente sugere que os macrófagos usam TLRs para determinar o conteúdo dos fagossomas. Além da fagocitose de microrganismos, os macrófagos desempenham um papel importante na fagocitose e depuração de células apoptóticas. No entanto, ao contrário das bactérias e do *zymosan*, as células apoptóticas não induzem uma reação inflamatória quando fagocitados por macrófagos. Portanto, dependendo da natureza do material fagocitado, TLRs podem ser diferencialmente recrutados para os fagossomas (Underhill et al., 1999; Medzhitov e Janeway, 2000). Deste modo, os níveis de expressão semelhantes ou até reduzidos entre monócitos pré- e pós-estimulados, encontrados no presente trabalho, poderiam ser decorrentes desta internalização dos TLR-2 após contato com seu ligante.

O sistema imune inato reconhece e responde aos estímulos microbianos através da ativação do TLR, ativando cascatas de sinalização intracelular que resultam na transcrição de múltiplos genes como, por exemplo, das citocinas envolvidas em funções reguladoras e

efetoras. No entanto, existem relatos discrepantes referentes à capacidade de produção de citocinas individuais em resposta a agonistas de TLR ao nascimento e ao longo da infância (Scott et al., 1997; Upham et al., 2002; Chelvarajan et al., 2004). No entanto, a preponderância dos dados atualmente disponíveis não apoia a ideia de uma incapacidade geral de produção de citocinas por monócitos e células dendríticas neonatais, mas sugere uma diferença na natureza desta resposta. Está bem descrito o deficit substancial e consistente na produção de citocinas do tipo Th1 envolvidas na proteção contra patógenos intracelulares, como IFNs do tipo I, IL-12 e IFN-γ (Yerkovich et al., 2007; Kollmann et al., 2009; Pérez et al., 2010; Corbett et al., 2010).

As citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 e IL-10 foram dosadas no sobrenadante das culturas de monócitos e, com exceção da IL-8, monócitos neonatais e de adultos foram capazes de produzir níveis significativamente elevados dessas citocinas após a adição do estímulo. Quanto às citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF-α e IL-1β, monócitos neonatais revelaram uma tendência a maior produção quando comparados aos adultos. Alguns estudos mostraram níveis de produção de TNF-α em resposta ao estímulo com agonistas de TLR-2 ligeiramente menores em cordão umbilical, particularmente quando sangue total foi usado, ou células mononucleares neonatais ou monócitos foram cultivados em altas concentrações de soro neonatal (>50%) (Levy et al., 2004; Kollmann et al., 2004).

Contudo, outros trabalhos revelaram que os níveis de produção por células neonatais de citocinas centrais para a defesa do hospedeiro contra bactérias e fungos extracelulares, inflamação aguda e respostas tipo Th17 parece não ser muito diminuída e, em alguns casos, é mais robusta (Lewis e Wilson, 2011). A produção de IL-1β por células de RNs a termo e adultos é semelhante, enquanto está muito bem documentado na literatura que monócitos neonatais produzem mais IL-6, IL-8 e IL-23 e alguns trabalhos também demonstraram níveis mais altos de TNF-α (Schultz et al., 2002; Angelone et al., 2006; Yerkovich et al., 2007; Corbett et al., 2010). Em desacordo com nossos resultados, alguns estudos que utilizaram células de RNs prematuros demonstraram que a produção de IL-8 foi maior do que a produção por células adultas (Schultz, et al., 2002**;** Dembinski et al., 2002), enquanto outros estudos com RNs pré-termo e a termo revelaram que a produção de TNF-α, IL-6 e IL-8 foi reduzida (Sadeghi et al., 2007; De Wit et al., 2003; Levy et al., 2004).

Apesar de alguns estudos preliminares sugerirem que a produção da citocina imunoregulatória e anti-inflamatória IL-10 é reduzida em células neonatais, a maioria dos estudos tem encontrado igual ou maior produção de IL-10 por células mononucleares neonatais (Chang et al., 1994; Lewis e Wilson, 2011). Em nossas dosagens, foi evidente a reduzida produção de IL-10 por monócitos de RNs pré-termo e a termo em comparação com os adultos, apesar do aumento significativo pós-estímulo. Particularmente, essa produção reduzida de IL-10 em

neonatos, em acordo com outros trabalhos da literatura (Jones et al., 1996; Chheda et al., 1996; Schultz, et al., 2004) pode contribuir para o aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias em RNs a termo e pré-termo. A alta incidência de complicações graves durante o processo infeccioso em neonatos pode ser decorrente da sua incapacidade de controlar a inflamação (Martinot et al., 1997; Gomez et al., 1998). Essas informações sugerem, portanto, um desequilíbrio da resposta imune neonatal.

O reconhecimento de um PAMP por um TLR desencadeia eventos que resultam na captação, processamento e apresentação antigênica, bem como a expressão de moléculas co-estimuladoras e secreção de citocinas, como foi avaliado no presente projeto. Estes eventos irão dirigir a resposta imune adaptativa subsequente. Centralmente envolvidas nestes processos estão as células apresentadoras de antígenos (APCs). As principais APCs humanas são as células dendríticas (DCs), tanto mielóides (mDCs), como plasmocitóides (pDCs), bem como monócitos/macrófagos e células B.

A imunofenotipagem dos leucócitos totais do sangue de cordão umbilical foi realizada com o objetivo de avaliar quantitativamente e qualitativamente a presença das APCs, bem como dos linfócitos T e B envolvidos na resposta a bactérias extracelulares. O presente trabalho mostrou que RNs a termo apresentam maior número de leucócitos quando comparados aos RNs pré-termos e aos adultos e, por sua vez, adultos apresentam menor número de leucócitos comparados aos 3

grupos de neonatos. De um modo geral, a composição de leucócitos circulantes numericamente difere entre os RNs de diferentes idades gestacionais, provavelmente refletindo fases de desenvolvimento dinâmicas (Milcic, 2010). As proporções de ambas as células linfóides e mielóides são geralmente mais elevadas no sangue periférico de um recém-nascido saudável a termo (Berrington et al., 2005; Christensen et al., 2009; Sharma et al., 2012).

Após a descoberta de marcadores que permitem uma melhor identificação dos subgrupos de DCs, foi visto recentemente que essas, definidas como $Lin^{-}HLA\text{-}DR^{+}$, representam 0,3% das células mononucleares do sangue de cordão umbilical (Velilla et al., 2006), uma porcentagem significativamente inferior a encontrada no presente trabalho. Shin et al. (2009) e Koumbi et al. (2010) mostram que DCs mielóides expressam $CD11c^{+}$ e induzem diferenciação de células Th1, com a produção de níveis elevados de IL-12. Já DCs plasmocitóides expressam $CD123^{high}$ e induzem diferenciação de células Th2, produzindo grandes quantidades IFNs do tipo I e II (Steinman, 2003; Adams et al., 2005).

No presente trabalho, encontramos números relativos significativamente mais elevados de DCs totais em recém-nascidos prematuros e a termo em relação aos adultos, porém estes apresentaram maior proporção de mDCs em relação aos recém-nascidos e frequências equivalentes de pDCs, exceto para os RNs do

Grupo 3. Essa maior porcentagem de mDCs em adultos pode contribuir para uma resposta Th1 mais eficiente.

Células dendríticas são APCs profissionais com capacidade única de ativar e induzir expansão clonal de linfócitos T *naïve* e de memória. As DCs imaturas apresentam principalmente $CD1a^+$ e maior capacidade de internalizar antígenos, mas são pobres ativadoras de células T, por expressarem baixos níveis das moléculas co-estimulatórias CD40, CD80, CD86 e, no presente trabalho, encontramos frequências semelhantes de mDCs e pDCs expressando CD1a entre RNs e adultos. Células dendríticas maduras são $CD83^+$ e expressam altos níveis das moléculas CD80 e CD86, além de HLA-DR e são excelentes estimuladoras de células T antígeno-específicas (Gulubova et al., 2012).

A expressão de TLR-2 é normal em células dendríticas do sangue de cordão, assim como em mDCs neonatais (Drohan et al., 2004; Velilla et al., 2006). Estes resultados estão de acordo com nossos dados, assim como para as pDCs, pois não encontramos diferenças significativas entre os RNs e adultos, embora observou-se valores crescentes de expressão de TLR-2 em mDCs e pDCs de acordo com a idade gestacional. Esses dados sugerem que DCs neonatais tem a capacidade de reconhecer o antígeno através do TLR-2, mas a expressão deste receptor é menor em RNs prematuros. Além disso, a interação com a célula T pode ser deficiente por apresentarem baixa expressão das moléculas co-estimuladoras, mostrando, mais uma vez, a imaturidade do sistema imunológico neonatal.

Embora não tenham sido observadas diferenças nas frequências de monócitos entre RNs e adultos, o número absoluto dessas células no sangue de cordão umbilical de RNs prematuros extremos foi inferior aos encontrados nos outros RNs.

Está descrito que diferenças qualitativas em monócitos são evidentes no útero, a fenotipagem por citometria de fluxo de monócitos circulantes neonatais ou fetais no terceiro trimestre revela que estas células expressam níveis reduzidos de moléculas de MHC classe II (HLA-DR) e apresentam baixa expressão basal de moléculas CD86 e CD40, o que contribui potencialmente para uma atividade deficiente da APC (Velilla et al., 2006). Em desacordo com estes dados, encontramos frequências semelhantes de monócitos expressando CD80 e CD86 entre os RNs e adultos, mas as porcentagens de monócitos $CD80^+$ foram ligeiramente inferiores em RNs comparados aos adultos, embora significativamente diferente apenas para o Grupo 2. Também é importante salientar que observamos redução da expressão de CD80 por mDCs e pDCs em RNs do Grupo 1, o que poderia reforçar a idéia de uma atividade ineficiente das APCs de RNs prematuros.

TLR-2 também foi amplamente expresso em monócitos neonatais, embora a frequência em RNs pré-termo extremo tenha sido ligeiramente menor. Isso mostra que RNs pré-termos, particularmente os prematuros extremos, apresentam as ferramentas necessárias para reconhecer o antígeno invasor, mas as moléculas envolvidas no reconhecimento antigênico, como o TLR-2 e a molécula co-estimuladora CD80 estão

presentes em menor frequência quando comparados aos outros RNs, o que pode contribuir para uma resposta imune inata deficiente e levar a uma ativação inadequada da resposta imune adaptativa.

Uma peculiaridade da resposta imune nos primeiros anos de vida é a presença no sangue periférico de números elevados de linfócitos, tanto percentuais como absolutos, como mostrado no presente trabalho, onde o adulto apresenta menor número de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ quando comparado aos grupos de RNs. Desta forma, nesta fase da vida o mais preocupante é a linfocitopenia, caracterizada por números totais de linfócitos repetidamente inferiores a 2.500 células/mm^3, e que pode representar um sinal de alerta importante para uma imunodeficiência grave (Heldrup et al., 1992).

Os valores percentuais das várias subpopulações de linfócitos permanecem muito semelhantes aos adultos em todas as fases da vida com predomínio das células T auxiliares (40 - 50%), seguida das T citotóxicas (15 - 25%), sabendo-se que as células T constituem entre 70 e 80% dos linfócitos circulantes. Evidentemente, a proporção de células T *naïve* é elevada nos primeiros tempos de vida, caindo gradualmente na medida em que crescem as percentagens de células de memória (Heldrup et al., 1992).

Como já está bem descrito, células de memória são derivadas de células efetoras, as quais são derivadas da ativação de células T *naïve*. Células T *naïve* são caracterizadas pela expressão de CD45RA, CCR7 e receptores co-estimuladores CD27 e CD28. As células T efetoras são

determinadas por expressarem vários marcadores, entre eles o CD69, CD25, porém baixos níveis de CD62L. Quanto aos marcadores característicos das células T de memória central, que residem preferencialmente nos linfonodos, várias propriedades fenotípicas são compartilhadas com células T *naïve*, exceto a expressão de CD45RA. Células T de memória efetora migram preferencialmente para os tecidos periféricos e não expressam CD45RA ou CCR7 e, dependendo de seu estado de diferenciação, podem ou não expressar CD27/CD28 (Tanel et al., 2009).

Um estudo de revisão de subpopulações de linfócitos comparando amostras de sangue de cordão umbilical e amostras de sangue periférico de adultos mostrou que células T *naïve* ocorrem com uma frequência relativamente alta em neonatos quando comparados aos adultos (de Vries et al., 1999).

Em concordância, nossos dados mostraram maior frequência de linfócitos T *naïve* nos 3 grupos de RNs quando comparados aos adultos, sem diferenças significativas entre os recém-nascidos, embora RNs do Grupo 1 tenham apresentado frequência ligeiramente menor do que os outros recém-nascidos. O aumento da frequência de células T *naïve* em neonatos já é conhecido, uma vez que tem sido demonstrado que os neonatos prematuros apresentam população de células T *naïve* reduzida quando comparada a dos RNs a termo (Peoples et al., 2009; Walker et al., 2011).

Os adultos, por sua vez, apresentaram maior frequência de linfócitos T efetores e de memória efetora quando comparados aos RNs. Uma vez que essas células já foram ativadas após contato prévio com o antígeno, as frequências mais altas encontradas em adultos são esperadas. Linfócitos T de memória central apresentaram-se em frequências equivalentes entre os grupos. Estes achados não estão de acordo com outro trabalho que apresentou frequência de células T de memória reduzida em RNs comparados aos adultos, embora a divisão entre as subpopulações de células T de memória, efetora e central, não tenha sido efetuada (Szabolcs et al., 2003).

A maioria das subpopulações de células B encontra-se em números significativamente mais elevados no sangue de cordão umbilical devido à linfocitose existente, assim como de Vries et al. (1999) relataram em sua revisão sobre subpopulações de linfócitos neonatais, onde células B $CD19^+$ foram mais frequentes no sangue de cordão em relação ao adulto. Mais tarde, os mesmos dados foram reportados por Curtis et al. (2011). O mesmo foi observado em nossos resultados, onde os adultos apresentaram número significativamente menor de linfócitos B quando comparados aos RNs dos 3 grupos, refletindo a linfocitose fisiológica neonatal.

Nossos dados também mostram que os 3 grupos de RNs apresentam frequência significativamente maior de linfócitos B *naïv*e e menor de linfócitos B de memória quando comparados aos adultos. Linfócitos B de memória e *naïve* podem ser ativados através da ligação

do CD40, receptor expresso constitutivamente nessas células, ao seu ligante CD154 (CD40L) presente nos linfócitos T. Nossos resultados mostraram uma expressão consideravelmente mais baixa de CD40 em linfócitos B de RNs prematuros extremos do Grupo 1 quando comparados aos outros grupos de RNs, no entanto não houve diferença significativa. A interação entre CD40-CD40L inicia uma função central na formação do centro germinativo e desenvolvimento da memória humoral, indução da proliferação, *switch* de classes de imunoglobulinas, diferenciação e secreção de citocinas e imunoglobulinas (Néron et al., 2011).

Foi mostrado que as células B de memória constitutivamente apresentam uma discreta expressão de TLR-2 (Lanzavecchia et al., 2006) e no presente trabalho, nós observamos frequências extremamente baixas de linfócitos B expressando TLR-2 em todos os grupos, incluindo adultos.

O estudo da atividade fagocítica das células e do *burst* oxidativo é muito importante para determinarmos a possível suscetibilidade do RN em adquirir infecções por *Staphylococcus aureus*. Sendo assim, os resultados foram apresentados como índice de fagocitose de *S. aureus* por monócitos e neutrófilos, determinados pela porcentagem, que indica a quantidade de células com capacidade fagocítica, além do número de bactérias que cada célula fagocítica internalizou, mostrado pela Média da Intensidade de Fluorescência (M_{ean}FI) obtida nas análises.

Os mecanismos microbicidas de fagócitos consistem em uma combinação de processos enzimáticos e oxidativos que são ativados imediatamente após a fagocitose. Quando o microrganismo é fagocitado, a célula aumenta seu consumo de oxigênio molecular o que acaba resultando na produção de espécies reativas de oxigênio, as quais são essenciais para a morte bacteriana, através do *burst* respiratório e substâncias bactericidas que são liberadas dos grânulos citoplasmáticos dentro do fagolisossomo (Roos et al., 2003; Carr, 2000). A geração dessas espécies oxidativas em neutrófilos e outros fagócitos é mediada pela NADPH oxidase (Elbim e Lizard, 2009). Uma vez ativada, a NADPH oxidase inicia o *burst* respiratório, produzindo o ânion superóxido (O_2^-), o qual é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima peróxido dismutase (SOD), que por sua vez é convertido em ácido hipocloroso (HOCl) e radical hidroxila ($OH^\bullet$) pela enzima mieloperoxidase (MPO) (Burg e Pillinger, 2001).

Deve-se levar em consideração que os monócitos podem mudar morfologicamente após a fagocitose, sendo assim, não são localizados obrigatoriamente no *gate* clássico de monócitos. Por isso, muitos estudos aplicam estratégias de marcação celular com anti-CD14, que possibilita delimitar melhor a população e, ainda assim monócitos reduzem a expressão dessa molécula após incubação com a bactéria, mas mantêm sua expressão de HLA-DR. Após incubação com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, monócitos do sangue de cordão umbilical e de sangue periférico de adulto apresentam tamanho

diminuído e aumentam a granulosidade, revelando características de células apoptóticas (Gille et al., 2009). A apoptose de neutrófilos e monócitos após a fagocitose da bactéria é chamada morte celular induzida por fagocitose. A geração de espécies reativas de oxigênio em consequência da fagocitose é, provavelmente, um dos eventos de indução de apoptose (Zhang et al., 2003).

Nossos resultados mostraram que monócitos e neutrófilos neonatais apresentam capacidade fagocítica inferior a de adultos, embora os neutrófilos neonatais tenham apresentado quase 100% de atividade. No entanto, a quantidade de bactérias fagocitadas foi equivalente entre os grupos, com exceção dos RNs prematuros extremos, que apresentaram MFI reduzido em monócitos e neutrófilos em relação aos RNs a termo.

Em desacordo com nossos resultados, Gille et al. (2009) demonstraram que embora monócitos de neonatos a termo apresentem algumas diferenças funcionais quando comparados aos monócitos de adultos, eles apresentam competência fagocítica equivalente para bactérias Gram-positivas *in vitro*. O mesmo foi descrito sobre a fagocitose de *S. epidermidis* por monócitos de RNs a termo e prematuros, os quais demonstraram porcentagens e números de bactérias ingeridas semelhantes entre os grupos de RNs e adultos (Strunk et al., 2012).

Quanto aos neutrófilos neonatais, assim como em nosso trabalho, foi demonstrado que em condições ótimas *in vitro*, estes são capazes de

se ligar e internalizar bactérias gram-positivas e gram-negativas com eficiência equivalente ou ligeiramente reduzida em relação aos neutrófilos de adultos (Bektas et al., 1990; Johnston, 1998). As concentrações séricas de opsoninas são reduzidas em neonatos, em particular naqueles prematuros e, quando as concentrações de opsoninas são limitadas, neutrófilos de RNs internalizam bactérias de forma menos eficiente comparando-se aos neutrófilos de adultos (Falconer et al., 1995).

Nossos resultados mostraram que monócitos de neonatos a termo apresentaram *burst* oxidativo normal após estímulo com PMA e reduzido após ativação celular pela fagocitose de *S. aureus,* porém sua produção de H_2O_2 foi elevada frente aos dois estímulos. Já neonatos pré-termos do Grupo 2 apresentaram baixa geração do *burst* em resposta ao PMA e ao *S. aureus*, o que poderia levar a uma deficiente morte intracelular bacteriana. No entanto, este resultado não foi evidenciado estatisticamente com os RNs do Grupo 1 provavelmente em virtude do número amostral utilizado para este experimento, embora a produção de H_2O_2 tenha sido diminuída frente aos estímulos.

Estudos *in vitro* demonstram que a morte intracelular de *S. aureus* ou *E. coli* após fagocitose por neutrófilos de neonatos a termo é consistentemente normal, ao passo que, e em conjunto com os achados de *burst* respiratório, a atividade microbicida sobre estafilococos é prejudicada em neonatos pré-termos com peso abaixo de 2.000g ao nascimento (Gahr et al., 1985). Nossos resultados estão de acordo com

os descritos acima, pois observamos atividade de *burst* com produção de peróxido de hidrogênio equivalente entre RNs a termo e adultos e reduzida nos RNs prematuros após a fagocitose de *S. aureus*. A geração de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio por neutrófilos de neonatos a termo é geralmente semelhante ou maior do que a dos adultos em resposta a estímulos solúveis (Björkqvist et al., 2004). Embora uma modesta redução na geração de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos de pré-termos em comparação com RNs a termo tenha sido observada em resposta a algumas linhagens de estafilococos coagulase-negativo, isso não foi observado com outras cepas de estafilococos ou com cepas de estreptococos do grupo B (Chudgar et al., 2005).

Assim, monócitos e neutrófilos do Grupo 3 são capazes de produzir quantidades significativamente elevadas de H_2O_2, quando estimulados com PMA e *S. aureus*, como reportado por Wu et al. (2005), onde os neonatos a termo apresentam uma tendência a serem mais responsivos ao PMA no que se refere ao *burst* oxidativo, comparando-se aos recém-nascidos pré-termo.

Em síntese, ao analisarmos a porcentagem de fagócitos produtores de peróxido de hidrogênio observamos, de modo geral, uma diminuição do M_{ean}FI dos RNs pré-termos, revelando uma produção de peróxido de hidrogênio deficiente, o que poderia ocasionar uma reduzida morte intracelular dos microrganismos.

A publicação de dados sobre fagocitose nos últimos 30 anos tem sido de difícil interpretação e correlação entre os resultados, em virtude de muitos parâmetros envolvidos, assim como a variedade de técnicas utilizadas para a investigação da função de monócitos e neutrófilos (Filias et al., 2011). Muitos fatores podem participar da regulação da homeostasia do pool de neutrófilos e monócitos dos neonatos nos primeiros dias após o nascimento como a produção de citocinas, diminuição de hormônios, maturação dos macrófagos, substâncias transferidas pelo aleitamento materno como CD14 solúvel, entre outros. Alguns destes fatores podem ter um efeito sobre a função celular e podem ser responsáveis pelo aumento da capacidade fagocítica mostrada no estudo (Filias et al., 2011).

Alguns defeitos funcionais de fagócitos mononucleares neonatais têm sido documentados, comparados aos seus homólogos adultos. Essas alterações podem resultar de vias de sinalização ligadas ao TLR pouco eficientes, mas a natureza destas deficiências ainda não está bem elucidada.

Tem sido demonstrado que as respostas mediadas por TLR podem ser divididas em via dependente da proteína MyD88 e via independente da MyD88, a qual é dependente de TRIF. Além disso, é discutido que as citocinas que são hiperexpressas por células mononucleares do sangue de cordão, ou seja, as citocinas pró-inflamatórias, são uniformemente dependentes de MyD88, ao passo que aquelas citocinas cuja produção é atenuada em sangue de cordão e lactentes (IL-12 p35, IL-18, IL-23p19)

são controladas por mecanismos dependentes de TRIF (Weighardt et al., 2004; Goriely et al., 2006).

Para realizar uma avaliação minuciosa da possível deficiência funcional das APCs neonatais estudamos moléculas importantes da via de sinalização intracelular dos monócitos neonatais.

Em virtude da observação que camundongos *knockout* de MyD88 são altamente suscetíveis à infecção por uma ampla gama de microrganismos, níveis reduzidos de expressão de MyD88 poderiam contribuir para uma resposta imune neonatal reduzida à patógenos (Kawai et al., 1999).

A avaliação da proteína MyD88 revelou um aumento da sua expressão frente ao estímulo em monócitos dos RNs pré-termo e do adulto. No entanto, a amostra testada de RN a termo expressou níveis semelhantes aos basais desta proteína após o estímulo.

Foi demonstrado níveis basais reduzidos de mRNA da molécula MyD88 em monócitos do sangue de cordão de RNs pré-termo em relação aos RNs a termo (Sadeghi et al., 2007). Além disso, a expressão proteica desta molécula é reduzida após estímulo em RNs a termo em comparação com adultos, contribuindo possivelmente para a deficiente produção de TNF-α mediada pelo TLR em neonatos (Yan et al., 2004). Em nosso trabalho, houve um aumento da expressão de MyD88 nos RNs pré-termo, o que está de acordo com a alta produção, não só de TNF-α, mas das citocinas pró-inflamatórias dosadas nos sobrenadantes das culturas de monócitos.

Vários estudos têm mostrado que a via da MAP kinase, em particular a via SAPK (*stress-activated protein kinase*)/JNK, inicia uma função chave na sinalização da transdução de TNF-α (MacEwan, 2002; Varfolomeev e Ashkenazi, 2004). Em nosso trabalho, observou-se que monócitos dos RNs pré-termo extremo apresentam fraca expressão de JNK e não revelaram um aumento da expressão após o estímulo. Já monócitos de RN a termo apresentaram aumento da expressão dessa molécula após o estímulo com Pam3CSK4, de modo similar aos monócitos de adulto.

Os resultados observados nos testes de *Western blotting* utilizando-se o anticorpo anti-GAPDH como controle endógeno da reação foram, de certa forma, inesperados, uma vez que observamos diferenças entre as bandas pré- e pós-estímulo de cada amostra. Geralmente, o GAPDH é considerado como uma enzima *housekeeping* e é frequentemente usado como controle invariante para estudos de expressão gênica e de proteínas. Em adição à sua bem descrita função na glicólise, estudos recentes sugerem que o GAPDH é uma proteína multifuncional que desempenha um papel importante no transporte de membrana, formação de microtúbulos, proliferação celular e apoptose em células de mamíferos (Wang et al., 2013).

Particularmente, o GAPDH é uma proteína chave redox sensível, cuja atividade é largamente afetada por modificações oxidativas covalentes em seu resíduo Cys^{152} altamente reativo que estimulam a translocação nuclear desta enzima e regulam o destino da célula (Colell

et al., 2009). A translocação do GAPDH para o núcleo pode ser interpretada como um esforço extremo da célula para manter a produção de ROS em níveis toleráveis (Dando et al., 2013). Em nossos testes, como não realizamos extrações nucleares, as diferentes bandas observadas comparando-se monócitos antes e após o estímulo poderiam ser resultantes da translocação desta enzima para o núcleo das células.

Com relação ERK-1/2 e p38, Sadeghi et al. (2007) constataram que estas moléculas apresentaram menor fosforilação após o estímulo nos RNs pré-termos, o que poderia culminar na deficiente ativação do fator de transcrição AP1 e consequente menor produção de citocinas pró-inflamatórias. No presente trabalho, observamos resultados aparentemente contrários, onde ERK-1/2 e p38 mostraram-se ativadas (fosforiladas) nos monócitos de todos os grupos após o estímulo, com diferença significativa entre pré- e pós-estímulo. Estes resultados condizem com a maior produção de citocinas pró-inflamatórias por RNs pré-termos observadas em nossas culturas, o que não foi visto para os RNs a termo provavelmente em virtude do nosso reduzido número amostral.

A resposta precoce de citocinas pró-inflamatórias, entre elas, IL1β, IL6, IL8 e TNF-α é iniciada após ativação do NF-κB (Kenzel e Henneke, 2006). Strunk et al. (2012) estudaram os eventos de sinalização após ativação de TLR-2 em resposta ao *S. epidermidis* e demonstraram números de monócitos NF-κB-positivos, p38-positivos e JNK-positivos similares entre RNs pré-termo extremo, pré-termo

moderado, a termo e adultos. Embora no trabalho acima tenham encontrado ativação normal destas moléculas da cascata de sinalização, foram observados baixos níveis das citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF, nos dois grupos de RNs pré-termo quando comparados com os adultos. No entanto, estes autores trabalharam com células criopreservadas, o que poderia prejudicar a resposta dos monócitos ao estímulo com *S. epidermidis*. Em nosso trabalho, a alta produção de citocinas inflamatórias está de acordo com a ativação equivalente das moléculas da via de sinalização intracelular, p38, ERK-1/2 e NF-κB entre os grupos de RNs e adultos.

Em resumo, nossos resultados compreendem uma avaliação abrangente da resposta imune inata mediada por TLR-2 em recém-nascidos pré-termo e a termo. De modo geral, nós demonstramos que as células dendríticas e monócitos de neonatos expressam TLR-2 em níveis semelhantes aos adultos. A expressão adequada de TLR-2 sugere um reconhecimento antigênico eficiente que é refletido em uma ativação adequada das moléculas da cascata de sinalização e uma potente produção de citocinas pró-inflamatórias, apesar da reduzida produção de IL-10. Deste modo, o neonato não apresenta uma imaturidade funcional, mas sim, um desequilíbrio em sua resposta imune inata, com uma aparente menor produção de fatores anti-inflamatórios, o que pode levar a predisposição à sepse.

Conclusões

CONCLUSÕES

1. Monócitos de RNspré-termo extremo, pré-termo tardio e RNs a termo responderam bem ao estímulo antigênico via TLR-2 com níveis semelhantesde expressãode marcadores de ativação, alta produção das citocinas pró-inflamatóriasTNF-α, IL-1β, IL-6 e reduzida produção de IL-10.

2. A análisedas diferentes populações de leucócitos do sangue totalrevelou números absolutos elevados em RNs quando comparados aos adultos, devido à característica leucocitose neonatal.A expressão de TLR-2 em APCs neonatais foi semelhante entre os grupos, com uma tendência a menor expressão em RNspré-termo extremo. Como esperado, recém-nascidos apresentaram maior expressão de linfócitos T e B *naïve* e menor expressão de linfócitos T efetor e de memória efetora e linfócitos B de memória.

3. Monócitos e neutrófilos neonatais apresentam capacidade fagocítica de*Staphylococcus aureus* reduzida em relação aos adultos. Ageração do *burstoxidativo*por monócitos e neutrófilos foisemelhanteentre os RNs, no entanto RNspré-termo apresentaram produção de peróxido de hidrogênio deficiente, o que poderia ocasionar uma reduzida morte intracelular deste microrganismo.

4. Monócitos neonatais mostraram, de modo geral, ativação adequada das moléculas envolvidas na sinalização intracelular após estímulo via TLR-2, o que está de acordo com a alta produção de citocinas pró-inflamatórias nos sobrenadantes de cultura de monócitos.

Nossosresultados 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, importante citocina anti-inflamatória, o que pode levar a um desequilíbrio na resposta imune e aumentar a susceptibilidade do recém-nascido à sepse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams S, O'Neill DW, Bhardwaj N. Recent advances in dendritic cell biology. *J Clin Immunol.* 2005;25:177-88.

Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:593-623.

Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 2003;15:5-11.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124:783-801.

Angelone DF, Wessels MR, Coughlin M, Suter EE, Valentini P, Kalish LA, Levy O. Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF- production *in vitro* and *in vivo*. *Pediatr Res.* 2006;60:205-9.

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.

Appelberg R. Macrophage nutriprive antimicrobial mechanisms. *J Leukoc Biol.* 2006;79:1117-28.

Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silvia P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res.* 2007;40:97-112.

Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999;93:1464-76.

Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 2000;109:33-44.

Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Wasman BL, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr*. 1991;119:417-23.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392: 245-52.

Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH, Rubens C, Menon R, Van Look PF. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ*. 2010.;88:31-8.

Bektas S, Goetze B, Speer CP. Decreased adherence, chemotaxis and phagocytic activities of neutrophils from preterm neonates. *Acta Paediatr Scand*. 1990;79:1031-8.

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;140:289-92.

Beutler B. The Toll-like receptors: analysis by forward genetic methods. *Immunogenetics*. 2005;57:385-92.

Björkqvist M, Jurstrand M, Bodin L, Fredlund H, Schollin J. Defective neutrophil oxidative burst in preterm newborns on exposure to coagulase-negative staphylococci. *Pediatr Res*. 2004;55:966-71.

Bonac B, Derganc M, Wraber B, Hojker S. Interleukin-8 and procalcitonin in early diagnosis of early severe bacterial infection in critically ill neonates. Pflugers Archives: *Europ J Physiol*. 2000;440:R72-R74.

Burg ND, Pillinger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol*. 2001;99:7-17.

Capurro H, Konichezky S, Fonseca, D, Caldeiro-Badia RA. Simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. *J Pediatr*. 1978;93:120.

Carr R. Neutrophil production and function in newborn infants. *Br J Haematol*. 2000;110:18-28.

Carreno M, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: Newpathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:29-53.

Chang M, Suen Y, Lee SM, Baly D, Buzby JS, Knoppel E, Wolpe S, Cairo MS. Transforming growth factor-beta 1, macrophage inflammatory protein-1 alpha, and interleukin-8 gene expression is lower in stimulated human neonatal compared with adult mononuclear cells. *Blood*. 1994;84:118-24.

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-α and its receptors. *Pediatr Res*. 1996;40:475-83.

Chelvarajan RL, Collins SM, Doubinskaia IE, Goes S, Van Willigen J, Flanagan D, De Villiers WJ, Bryson JS, Bondada S. Defective macrophage function in neonates and its impact on unresponsiveness of neonates to polysaccharide antigens. *J Leukoc Biol*. 2004;75:982-94.

Chen CX, Soto I, Guo YL, Liu Y. Control of secondary granule release in neutrophils by Ral GTPase. *J Biol Chem*. 2011;286:11724-33.

Christensen RD, Henry E, Jopling J, Wiedmeier SE. The CBC: reference ranges for neonates. *Semin Perinatol.* 2009;33:3-11.

Chudgar UH, Thurman GW, Ambruso DR. Oxidase activity in cord blood neutrophils: a balance between increased membrane associated

cytochrome b558 and deficient cytosolic components. *Pediatr Blood Cancer*. 2005;45:311-7.

Colell A, Green DR, Ricci JE. Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell Death Differ*. 2009;16:1573-8.

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.

Cuenca AG, Wynn JL, Moldawer LL, Levy O. Role of innate immunity in neonatal infection. *Am J Perinatol*. 2013;30:105-12.

Curtis MG, Walker B, Denny TN. Flow cytometric methods for prenatal and neonatal diagnosis. *J Immunol Methods*. 2011;363:198-209.

Dando I, Fiorini C, Pozza ED, Padroni C, Costanzo C, Palmieri M, Donadelli M. UCP2 inhibition triggers ROS-dependent nuclear translocation of GAPDH and autophagic cell death in pancreatic adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833:672-9.

Dembinski J, Behrendt D, Reinsberg J, Bartmann P. Endotoxin-stimulated production of IL-6 and IL-8 is increased in short-term cultures of whole blood from healthy term neonates. *Cytokine*. 2002;18:116-9.

de Vries E, de Groot R, de Bruin-Versteeg S, Comans-Bitter WM, van Dongen JJ. Analysing the developing lymphocyte system of neonates and infants. *Eur J Pediatr*. 1999;158:611-7.

De Wit D, Tonon S, Olislagers V, Goriely S, Boutriaux M, Goldman M, Willems F. Impaired responses to toll-like receptor 4 and toll-like receptor 3 ligands in human cord blood. *J Autoimmun*. 2003;21:277-81.

Dollener H, Vatten L, Austgulen R. Early diagnostic markers for neonatal sepsis: Comparing C-reactive protein, interleukin-6, soluble tumour necrosis factor receptors and soluble adhesion molecules. *J Clin Epidemiol*. 2001;54:1251-7.

Drohan L, Harding JJ, Holm B, Cordoba-Tongson E, Dekker CL, Holmes T, Maecker H, Mellins ED. Selective developmental defects of cord blood antigen-presenting cell subsets. *Hum Immunol*. 2004;65:1356-69.

Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib SL, Zimmerli W, Landmann R. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to Streptococcus pneumoniae meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis*. 2002;186:798-806.

Elbim C, Lizard G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Cytometry A*. 2009;75:475-81.

Falconer AE, Carr R, Edwards SW. Impaired neutrophil phagocytosis in preterm neonates: lack of correlation with expression of immunoglobulin or complement receptors. *Biol Neonate*. 1995;68:264-9.

Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. 2003;5:1317-27.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*. 1997;43:61-8.

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.

Forster-Waldl E, Sadeghi K, Tamandl D, Gerhold B, Hallwirth U, Rohrmeister K, Hayde M, Prusa AR, Herkner K, Boltz-Nitulescu G,

Pollak A, Spittler A. Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging. *Pediatr Res*. 2005;58:121-4.

Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, Drage MG, Jadlowsky J, Harding CV, Weinberg A, Sieg SF. Human -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:18631-5.

Gahr M, Blanke R, Speer CP. Polymorphonuclear leukocyte function in term and preterm newborn infants. *Biol Neonate*. 1985;48:15-20.

Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:141-65.

Gille C, Leiber A, Mundle I, Spring B, Abele H, Spellerberg B, Hartmann H, Poets ChF, Orlikowsky TW. Phagocytosis and postphagocytic reaction of cord blood and adult blood monocyte after infection with green fluorescent protein-labeled Escherichia coli and group B Streptococci. *Cytometry B Clin Cytom*. 2009;76B:271-84.

Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;179:194-202.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Rev Immunol*. 2005;5:953-64.

Goriely S, Molle C, Nguyen M, Albarani V, Haddou NO, Lin R, De Wit D, Flamand V, Willems F, Goldman M. Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation. *Blood*. 2006;107:1078-84.

Gulubova MV, Ananiev JR, Vlaykova TI, Yovchev Y, Tsoneva V, Manolova IM. Role of dendritic cells in progression and clinical outcome of colon cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2012;27:159-69.

Gunn L, Hardiman P, Tharmaratnam S, Lowe D, Chard T. Measurement of interleukin-1 alpha and interleukin-6 in pregnancy-associated tissues. *Reprod Fertil Dev*. 1996;8:1069-73.

Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 1998;92:3007-17.

Han P, McDonald T, Hodge G. Potential immaturity of the T-cell and antigenpresenting cell interaction in cord blood with particular emphasis on the CD40-CD40 ligand costimulatory pathway. *Immunology*. 2004;113:26-34.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6:1123-32.

Hasko G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol*. 2004;25:33-9

Hasui M, Hirabayashi Y, Kobayashi Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. *J Immunol Methods*. 1989;117:53-8.

Henneke P, Berner R. Interaction of neonatal phagocytes with group B streptococcus: recognition and response. *Infect Immun*. 2006;74:3085-95.

Heldrup J, Kalm O, Prellner K. Blood T and B lymphocyte subpopulations in healthy infants and children. *Acta Paediatr*. 1992;81:125-32.

Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2004;5:971Y974.

Jäättelä M, Kuusela P, Saksela E. Demonstration of tumor necrosis factor in human amniotic fluids and supernatants of placental and decidual tissues. *Lab Invest.* 1988;58:48-52.

Janeway CA Jr. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect.* 2001;3:1167-71.

Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.

Johnston RB Jr. Function and cell biology of neutrophils and mononuclear phagocytes in the newborn infant. *Vaccine.* 1998;16:1363-8.

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.

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med.* 2001;194:863-9.

Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11:115-22.

Kenzel S, Henneke P. The innate immune system and its relevance to neonatal sepsis. *Curr Opin Infect Dis.* 2006;19:264-70.

Kollmann TR, Crabtree J, Rein-Weston A, Blimkie D, Thommai F, Wang XY, Lavoie PM, Furlong J, Fortuno ES 3rd, Hajjar AM, Hawkins NR, Self SG, Wilson CB. Neonatal innate TLR-mediated responses are distinct from those of adults. *J Immunol.* 2009;183:7150-60.

Koumbi LJ, Papadopoulos NG, Anastassiadou V, Machaira M, Kafetzis DA, Papaevangelou V. Dendritic cells in uninfected infants born to hepatitis B virus-positive mothers. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17:1079-85.

Krediet TG, Wiertsema SP, Vossers MJ, Hoeks SB, Fleer A, Ruven HJ, Rijkers GT. Toll-like receptor 2 polymorphism is associated with preterm birth. *Pediatr Res.* 2007;62:474-6.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;388:621-5.

Lanzavecchia A, Bernasconi N, Traggiai E, Ruprecht CR, Corti D, Sallusto F. Understanding and making use of human memory B cells. *Immunol Rev.* 2006;211:303-9.

Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nature Rev Immunol.* 2007;7:379-90.

Levy O, Coughlin M, Cronstein BN, Roy RM, Desai A, Wessels MR. The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF-α production in the human newborn. *J Immunol.* 2006;177:1956-66.

Levy O, Zarember KA, Roy RM, Cywes C, Godowski PJ, Wessels MR. Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848. *J Immunol.* 2004;173:4627-34.

Lewis DB, Wilson CB. Developmental immunology and role of host defenses in neonatal susceptibility to infection. In: Remington JS et al., editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* 7a ed. Philadelphia: Saunders; 2011. p. 83-169.

Lukacs SL, Schoendorf KC, Schuchat A. Trends in sepsis-related neonatal mortality in the United States, 1985–1998. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:599-603.

MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: Differences and cellular consequences. *Cell Signal.* 2002;14:477-92.

Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol.* 2002;80:477-83.

Mancuso G, Midiri A, Beninati C, Biondo C, Galbo R, Akira S, Henneke P, Golenbock D, Teti G. Dual role of TLR-2 and myeloid differentiation factor 88 in a mouse model of invasive group B streptococcal disease. *J Immunol.* 2004;172:6324-9.

Martinot A, Leclerc F, Cremer R, Leteurtre S, Fourier C, Hue V. Sepsis in neonates and children: definitions, epidemiology, and outcome. *Pediatr Emerg Care.* 1997;13:277–81

Medzhitov R, Janeway C Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol.* 2000;8:452-6.

Milcic TL, The complete blood count. *Neonatal Netw.* 2010;29:109-15.

Miller LC, Isa S, LoPreste G, Schaller JG, Dinarello CA. Neonatal interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor: cord blood levels and cellular production. *J Pediatr.* 1990;117:961-5.

Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:240-73.

Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, Bahrun U, Kouro T, Akira S, Takatsu K, Kincade PW. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity.* 2006;24:801-12.

Néron S, Nadeau PJ, Darveau A, Leblanc J-F. Tuning of CD40–CD154 Interactions in Human B-Lymphocyte Activation: A Broad Array of In Vitro Models for a Complex In Vivo Situation. *Arch Immunol Ther Exp.* 2011;59:25-40.

Nizet V, Klein JO. Bacterial sepsis and meningitis. In: Remington JS et al., editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* 7a ed. Philadelphia: Saunders; 2011. p. 222-75.

Olah KS, Neilson JP, Johnson PM. Interleukin-6 in amniotic fluid obtained at forewater amniotomy compared with hindwater samples in women in spontaneous labour. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1995;60:65-7.

Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:985646.

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;26:647-57.

Pérez A, Bellón JM, Gurbindo MD, Muñoz-Fernández MA. Impairment of stimulation ability of very-preterm neonatal monocytes in response to lipopolysaccharide. *Hum Immunol.* 2010;71:151-7.

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.

Protonotariou E, Malamitsi-Puchner A, Giannaki G, Rizos D, Phocas I, Sarandakou A. Patterns of inflammatory cytokine serum concentrations during the perinatal period. *Early Hum Dev.* 1999;56:31-8.

Richards M, Thursky K, Buising K. Epidemiology, prevalence, and sites of infections in intensive care units. *Semin Respir Crit Care Med.* 2003;24:3-22.

Risco A, del Fresno C, Mambol A, Alsina-Beauchamp D, MacKenzie KF, Yang HT, Barber DF, Morcelle C, Arthur JS, Ley SC, Ardavin C, Cuenda A. p38γ and p38δ kinases regulate the Toll-like receptor 4 (TLR4)-induced cytokine production by controlling ERK1/2 protein kinase pathway activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:11200-5.

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.

Romero R, Avila C, Santhanam U, Sehgal PB. Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor. Association with infection. *J Clin Invest.* 1990;85:1392-400.

Roos D, van Bruggen R, Meischl C. Oxidative Killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* 2003;5:1307-15.

Rothe G, Oser A, Valet G. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften.* 1988; 75:354-5.

Sadeck ESR, Ceccon MEJR. Aspectos clínicos das infecções estafilocócicas em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal. *Pediatria* (São Paulo). 2006;28:234-41.

Sadeghi K, Berger A, Langgartner M, Prusa AR, Hayde M, Herkner K, Pollak A, Spittler A, Forster-Waldl E. Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling. *J Infect Dis.* 2007;195:296-302.

Sanchez-Torres C, Garcia-Romo G S, Cornejo-Cortes M A, Rivas-Carvalho A, Sanchez-Schmitz G. CD16+ and CD16– human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells. *Int Immunol.* 2001;13:1571-81.

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.

Schnurr M, Toy T, Shin A, Wagner M, Cebon J, Maraskovsky E. Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. *Blood.* 2005;105:1582-9.

Schreibelt G, Tel J, Sliepen KH, Benitez-Ribas D, Figdor CG, Adema GJ, de Vries IJ. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59:1573-82.

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 Pediatr Res.* 2002;51:317-22.

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.

Scott ME, Kubin M, Kohl S. High level interleukin-12 production, but diminished interferon-gamma production, by cord blood mononuclear cells. *Pediatr Res.* 1997;41:547-553.

Sharma AA, Jen R, Butler A, Lavoie PM. The developing human preterm neonatal immune system: a case for more research in this area. *Clin Immunol.* 2012;145:61-8.

Shin S, Jang JY, Roh EY, Yoon JH, Kim JS, Han KS, Kim S, Yun Y, Choi YS, Choi JD, Kim SH, Kim SJ, Song EY. Differences in circulating dendritic cell subtypes in pregnant women, cord blood and healthy adult women. *J Korean Med Sci.* 2009;24:853-9.

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

Soehnlein O, Kenne E, Rotzius P, Eriksson EE, Lindbom L. Neutrophil secretion products regulate anti-bacterial activity in monocytes and macrophages. *Clin Exp Immunol.* 2008;151:139-45.

Sohlberg E, Saghafian-Hedengren S, Bremme K, Sverremark-Ekström E. Cord blood monocyte subsets are similar to adult and show potent peptidoglycan-stimulated cytokine responses. *Immunology.* 2011;133:41-50.

Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c$^-$ population. *Blood* 1999;93:2302-7.

Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology *APMIS.* 2003;111:675-97.

Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol.* 2004;76:50913.

Strunk T, Prosser A, Levy O, Philbin V, Simmer K, Doherty D, Charles A, Richmond P, Burgner D, Currie A. Responsiveness of human monocytes to the commensal bacterium Staphylococcus epidermidis develops late in gestation. *Pediatr Res.* 2012;72:10-8.

Szabolcs P, Park KD, Reese M, Marti L, Broadwater G, Kurtzberg J. Coexistent naïve phenotype and higher cycling rate of cord blood T cells as compared to adult peripheral blood. *Exp Hematol.* 2003;31:708-14.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76.

Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR-2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection. *J Immunol.* 2000;165:5392-6.

Tanel A, Fonseca SG, Yassine-Diab B, Bordi R, Zeidan J, Shi Y, Benne C, Sékaly RP. Cellular and molecular mechanisms of memory T-cell survival. *Expert Rev Vaccines.* 2009;8:299-312.

Towbin H, Staeklin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76:4350-4.

Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:975-1028.

Tsunoda H, Tamatani T, Oomoto Y, Hirai Y, Kasahara T, Iwasaki H, Onozaki K. Changes in interleukin 1 levels in human amniotic fluid with gestational ages and delivery. *Microbiol Immunol.* 1990;34:377-85.

Ulrichts P, Tavernier J. MAPPIT analysis of early Toll-like receptor signalling events. *Immunol Lett.* 2008;116:141-8.

Unanue E. Perspective on antigen processing and presentation. *Immunol Rev.* 2002;185:86-102.

Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* 1999;401:811-5.

Upham JW, Lee PT, Holt BJ, Heaton T, Prescott SL, Sharp MJ, Sly PD, Holt PG. Development of interleukin-12-producing capacity throughout childhood. *Infect Immun.* 2002;70:6583-8.

Vadillo E, Pelayo R. Toll-like receptors in development ahd function of the hematopoietic system. *Rev Invest Clin.* 2012;64:461-76.

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.

van der Graaf CA, Netea MG, Verschueren I, van der Meer JW, Kullberg BJ. Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans blastoconidia* and *hyphae*. *Infect Immun.* 2005;73:7458-64.

Varfolomeev EE, Ashkenazi A. Tumor necrosis factor: An apoptosis JuNKie? *Cell.* 2004;116:491-7.

Vasselon T, Detmers PA. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect Immun.* 2002;70:1033-41.

Velilla PA, Rugeles MT, Chougnet CA. Defective antigen-presenting cell function in human neonates. *Clin Immunol.* 2006;121:251-59.

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.

Wang C, Han C, Li T, Yang D, Shen X, Fan Y, Xu Y, Zheng W, Fei C, Zhang L, Xue F. Nuclear translocation and accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase involved in diclazuril-induced apoptosis in Eimeria tenella (E. tenella). *Vet Res.* 2013;44:29.

Weighardt H, Jusek G, Mages J, Lang R, Hoebe K, Beutler B, Holzmann B. Identification of a TLR4- and TRIF-dependent activation program of dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2004;34:558-64.

WHO, World Health Statistics: 2010, World Health Organization, 2010.

Wynn JL, Wong HR. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. *Clin Perinatol*. 2010;37:439-79.

Wu YC, Huang YF, Lin CH, Shieh CC. Detection of defective granulocyte function with flow cytometry in newborn infants. *J Microbiol Immunol Infect*. 2005;38:17-24.

Yamamoto M, Takeda K. Current views of toll-like receptor signaling pathways. *Gastroenterol Res Pract*. 2010;2010:240365.

Yan SR, Qing G, Byers DM, Stadnyk AW, Al-Hertani W, Bortolussi R. Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 2004;72:1223-9.

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.

Zhang B, Hirahashi J, Cullere X, Mayadas TN. Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: Cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation. *J Biol Chem*. 2003;278:28443-54.

Zhang J, Bui TN, Xiang J, Lin A. Cyclic AMP inhibits p38 activation via CREB-induced dynein light chain. *Mol Cell Biol*. 2006;26:1223-34.

Zhang Y, Jiang T, Yang X, Xue Y, Wang C, Liu J, Zhang X, Chen Z, Zhao M, Li JC. Toll-like receptor -1, -2, and -6 polymorphisms and pulmonary tuberculosis susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8:e63357.

Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007;81:584-92.

Zinkernagel RM. Maternal antibodies, childhood infections, and autoimmune diseases. *N Engl J Med*. 2001;345:1331.

APÊNDICE

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão 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, em sessão de 10/03/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0101/10**, 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**" apresentado pelo Departamento de **PEDIATRIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Patricia Palmeira**
Pesquisador (es) Executante(s): **Ana Lúcia Silveira Lessa Marques, Camila Quinello Gomes de Faria, Maria Esther J.R. Ceccon, Gerlândia Neres Pontes, Marco Antonio Cianciarullo, Euler João Kernbichler, Magda M.S. Carneiro Sampaio**

CAPPesq, 15 de Março de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

São Paulo, 5 de fevereiro de 2010.

Il^mo(a)^. S^r(a)^.

Dra. Patrícia Palmeira

Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "Avaliação da resposta imune após estimulação de diferentes células apresentadoras de antígenos via Toll-Like Receptor 2 (TLR-2) em recém-nascidos a termo e pré-termo" - **Pesquisador(a) Responsável**: Dra. Patrícia Palmeira - **Co-Investigador(es):** Camila Cristina Quinello Gomes de Faria, Maria Esther Jurfest Rivero Ceccon, Marco Antônio Cianciarullo, Magda Maria Carneiro-Sampaio, Gerlândia Neres Pontes, Euler João Kernbichler - **Registro CEP-HU/USP**: 972/09 – **SISNEP CAAE:** 0087.0.198.015-09

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 5 de fevereiro de 2010, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO,** bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, inciso IX.2, letra "c".

O primeiro relatório está previsto para 5 de fevereiro de 2011.

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA USP
Avenida Professor Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – 05508-000 São Paulo – SP
Tels.: (11) 3091-9457 – Fax: (11) 3091-9452 - E-mail: cep@hu.usp.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

da Universidade de São Paulo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - TÍTULO DA PESQUISA: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE APÓS ESTIMULAÇÃO DE DIFERENTES CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS VIA *TOLL-LIKE RECEPTOR 2* (TLR-2) EM RECÉM-NASCIDOS A TERMO E PRÉ-TERMO.

1. **Justificativa e objetivos da pesquisa:** *Prezada Senhora,* como já lhe foi falado, a senhora apresenta produção de anticorpos no sangue e secreções que são importantes para a defesa do seu organismo e do organismo de seu(a) filho(a) contra as doenças. Além disso, o recém-nascido possui fatores de defesa imunológicos que nascem com ele, as células, que serão utilizadas por ele na defesa contra doenças, mas muitos desses fatores estão em processo natural de amadurecimento com o passar da idade. Em virtude destas condições de imaturidade do sistema imunológico do recém-nascido, o objetivo deste estudo é avaliar como se encontram alguns aspectos do sistema imunológico inato do bebê quando nasce em diferentes idades gestacionais, visto que ele está exposto a bactérias no meio ambiente que podem causar sepse (infecção generalizada). Por este motivo, será necessária a coleta de sangue do cordão umbilical, para a realização de exames laboratoriais para avaliarmos o sistema de defesa do seu filho contra determinadas bactérias causadoras de doença em recém-nascidos. Não haverá qualquer desconforto para o recém-nascido, pois o sangue não será retirado dele e sim do cordão umbilical, depois da retirada da placenta. Caso a senhora e seu filho(a) não queiram participar da pesquisa, você tem todo o direito de se recusar. Caso comece na pesquisa e depois deseje desistir, também estará garantida assistência médica para a sua criança.

2. **Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:** Será colhido sangue do cordão umbilical para avaliar imunidade inata do recém-nascido a termo e do pré-termo.

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 a susceptibilidade dos neonatos humanos às infecções por bactérias Gram-positivas está relacionada, em

parte, à imaturidade funcional da resposta imune inata. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

II - OBSERVAÇÃO:

- A senhora terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para diminuir eventuais dúvidas.
- A senhora terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
- A senhora terá total confidencialidade, sigilo e privacidade dos dados deste estudo.
- Disponibilidade de assistência, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa;
- Se for detectado, algum problema de saúde previamente ao início da pesquisa, a senhora será encaminhada ao Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento.
- Se houver intercorrência de saúde decorrente da pesquisa, a senhora será atendida no HU/USP segundo o critério de assistência do mesmo (hospital de atendimento secundário). Se houver necessidade de atendimento de maior complexidade, a encaminharemos ao SUS.
- A duração prevista da pesquisa é de quatro (4) anos.

III - INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:

NOME DOS PESQUISADORES ENVOLVIDOS:

Pesquisadora executante: Camila Cristina Quinello Gomes de Faria
Pesquisadora responsável: Dra. Patricia Palmeira

CEP-HU: Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900 – São Paulo – SP - Telefones: 3039-9457 ou 3039-9479 - E-mail: cep@hu.usp.br.

IV - INFORMAÇÕES DO PACIENTE:

NOME DO PACIENTE.:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M ˜ F ˜
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO:.....CIDADE:.....
CEP:.....TELEFONE: DDD(.....).....

V – ENCERRAMENTO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

"DECLARO QUE, APÓS CONVENIENTEMENTE ESCLARECIDO PELO PESQUISADOR E TER ENTENDIDO O QUE ME FOI EXPLICADO, CONSINTO EM PARTICIPAR DO PRESENTE PROJETO DE PESQUISA."

SÃO PAULO, ... DE ..... DE 200.....

_____	_____
assinatura do paciente ou responsável legal	assinatura e carimbo do pesquisador

FICHA DE ANAMNESE DAS PARTURIENTES

O OK

GRUPO:	Pré-termo abaixo de 34 semanas ( ) Pré-termo acima de 34 semanas ( ) Termo ( )	PT < 34 PT < 37 T
Hospital Universitário da USP		
Caso nº		Caso nº:
Data do atendimento:		DataA:
Data do nascimento:		DataNasc:

Identificação

Dados Maternos					
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

Morbidades maternas				
Circlagem	(0) Ausente	(1) Presente		Circlagem:
Infecção:	(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

Sorologias				
Sífilis/ VDRL	(0) Não reagente	(1) Reagente	Título:	Sifilis/VD
Sífilis/TPPA	(0) Não reagente	(1) Reagente	(2) Não pesquisado	Siffilis/TP
Sífilis/FTA-Abs	(0) Não reagente	(1) Reagente	(2) Não pesquisado	Sífilis/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	Rubéloa/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 avidez	(0) Alta	(1) Baixa	(2) Indeterminado	Toxo/avidez
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

Outros Citar	(0) Não reagente	(1) Reagente		
Doenças Maternas				
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-imunes 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:	(0) Não	(1) Sim	Quais?	Medicamentos
Citar:				
Corticóides	(0) Não	(1) Sim		Corticoide

Dados Intraparto

Dados Intraparto				
Tipo de parto	(0) normal	(1) fórcipe	(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		

Recém-nascidos

Recém-nascidos				
Peso de Nascimento (PN):	PN:			
Gênero	(1) Masc	(2) Fem	(3) Indeterm	Gênero:
Apgar:	Apgar1:			Apgar1:
	Apgar5:			Apgar5:
Classificação RN:				
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
Risco Infeccioso	(0) Não	(1) Sim		
Bolsa Rota > 18 horas	(0) Não	(1) Sim		

ITU materna	(0) Não	(1) Sim		
Febre Materna	(0) Não	(1) Sim		
Corioamnionite	(0) Não	(1) Sim		
Procedimentos				
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:

Quadro laboratorial

		Hb	HT	Leucócitos	Neutrófilos	INN	Plaquetas
HMG	1º exame						
Leucócitos	(1) > 20.000 / mm³	(2) Entre 20.000 e 5.000 / mm³	(3) < 5.000 / mm³				
Neutrófilos	(1) > 1750 / mm³	(2) < 1750 / mm³					
INN	(1) > 0,2	(2) < 0,2					
Plaquetas	(1) > 150.000 / mm3	(2) < 150.000 / mm³					
		Hb	HT	Leucócitos	Neutrófilos	INN	Plaquetas
HMG	2º exame						
Leucócitos	(1) > 20.000 / mm³	(2) Entre 20.000 e 5.000 / mm³	3) < 5.000 / mm³				
Neutrófilos	(1) > 1750 / mm³	(2) < 1750 / mm³					
INN	(1) > 0,2	(2) < 0,2					
Plaquetas	(1) > 150.000 / mm3	(2) < 150.000 / mm³					
PCR	1º dia	Data:					
	2° 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	Proteínas	Glicose		
Glicemia							
Leucócitos	(1) > 20 leucócitos / mm³	(2) < 20 leucócitos / mm³					
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	Alta:
	Data da alta			Data Alta
	Óbito	(0) Não	(1) Sim	Óbito
	Data do óbito			Data Óbito

Diagnóstico

Diagnósticos:

Phenotypic differences in cellular immune surveillance against extracellular bacteria in healthy extreme preterm, late preterm, and full-term newborns

Camila Quinello,[1,3] Ana Lúcia Silveira-Lessa,[2,3] Maria Esther J. R. Ceccon,[1] Marco Antonio Cianciarullo,[1] Magda Carneiro-Sampaio,[1,3] and Patricia Palmeira[1,3]

[1]Department of Pediatrics, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil.

[2]Department of Parasitology, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Brazil.

[3]Laboratory of Medical Investigation (LIM-36), Instituto da Criança, Hospital das Clínicas, São Paulo, Brazil.

Corresponding Author

Dr. Patricia Palmeira

LIM-36, Department of Pediatrics, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 647 - Instituto da Criança – 5° andar

CEP: 05403-900, São Paulo, SP, Brazil

Tel/Fax: 55-11-2661-8782

(patpalm@usp.br)

Keywords: Immunophenotyping; Leukocytes; Toll-like receptors; Extreme preterm newborns; Late preterm newborns; Full-term newborns.

Abstract

We evaluated the absolute numbers and frequencies of dendritic cells (DCs) and DC subsets, monocytes, and T and B lymphocytes and lymphocyte subsets in the cord blood of healthy extreme preterm (Group 1), late preterm (Group 2), and full-term (Group 3) newborns and in the peripheral blood of healthy adults by flow cytometry. The majority of the analyses revealed statistically higher absolute cell numbers in neonates compared with adults due to the characteristic leukocytosis of neonates. We observed a lower frequency of $CD80^+$ myeloid and plasmacytoid DCs in Group 1 and reduced expression of TLR-4 on myeloid DCs in all neonates compared with adults. TLR-2^+ monocytes were reduced in number and frequency in Group 1 compared with Groups 2 and 3, and TLR-4^+ monocytes were reduced in Groups 1 and 2 compared to Group 3. The frequencies and numbers of naïve $CD4^+$T cells and naïve $CD19^+$ B cells were higher in the three groups of neonates compared with the adults, while $CD4^+$ effector and effector memory T cells and $CD19^+$ memory B cells were elevated in adults compared with neonates, as expected. Our study provides reference values for leukocytes in cord blood from term and preterm newborns, which may facilitate the identification of immunological deficiencies in protection against extracellular pathogens.

1. Introduction

At birth, neonates have an increased susceptibility to infectious agents due to the functional immaturity of their immune systems. Some immune functions in neonates are particularly immature, while other aspects of neonates' immune systems are functional at birth, even in extremely preterm infants. Innate immune impairment in the neonate is marked by quantitative and qualitative neutrophil defects, including a small storage pool of neutrophils at birth and reduced complement levels. Monocytes/macrophages are functionally adequate in neonates but are limited in their chemotactic responses. The lack of

adaptive immunity in neonates is reflected in the decreased number of memory T cells expressing the CD45RO isoform and the increased number of naïve T cells expressing the CD45RA isoform compared with adults as well as low production of immunoglobulin (Ig) G, IgA, and IgE by newborn B cells [1-7].

The immune system of preterm neonates is thought to be less developed at birth than term ones, but very little is known about the actual size of lymphocyte subpopulations in preterm neonates or the maturation of these subpopulations during the first months after a premature birth [8]. Studies of leukocytes from preterm newborns have been limited, and there is little data available concerning the development and function of the innate immune system during gestational aging [9]. Preterm infants are at a heightened risk of acquisition of recurrent bacterial infections during their first weeks of life due to frequent exposure to microorganisms, frequent invasive procedures such as catheterization, and intravascular or assisted ventilation, in addition to the immaturity of the immune system [10].

Immunophenotyping of blood cell populations to identify these cells and their expression of pattern recognition and activation molecules is an important tool in the diagnosis and follow up of children with immunodeficiencies and other immune disorders. Correct interpretation of the results obtained from patients requires knowledge of the normal development of the immune system during the first years of life. Most studies on the human immune system have been performed with adults, and many questions about lymphocyte development in children have not been answered. This deficiency is due to the difficulty of obtaining blood from babies in large quantities, thus representing a practical problem. Therefore, most studies of newborns have been conducted using neonatal umbilical cord blood, which can be easily obtained in larger quantities [11].

Preterm infants born before 28 weeks' gestation are at greater risk of invasive bacterial infections [12], but current studies indicate that late preterm infants also have a

significantly higher rate of complications of prematurity and experience more difficulties with feeding, hypoglycemia, jaundice, temperature instability, apnea, and respiratory distress [13]. This suggests that the last month of gestation is a critical culminating period for the maturation of the immune system [13, 14].

Due to the high incidence of extracellular bacterial infections in neonates, it is important to investigate the neonatal ability to combat these pathogens. In the present study, we used flow cytometry to evaluate monocyte and dendritic cell populations and their pattern recognition and activation markers as well as helper T and B lymphocytes and their subpopulations in umbilical cord blood from healthy extreme preterm, late preterm, and full-term newborns and, as controls, in peripheral blood from healthy adults.

2. Methods

Study population and blood samples:

We performed a cross-sectional descriptive study using umbilical cord blood from healthy adequate-for-gestational-age preterm and full-term newborns. Newborns (n=56) were classified into three groups according to their postmenstrual age at birth: newborns born at 30 - 33 $^{6}/_{7}$ gestation weeks were classified as extreme preterm newborns (Group 1, n=13); newborns born at 34 - 36 $^{6}/_{7}$ gestation weeks were classified as late preterm newborns (Group 2, n=21); and newborns born at 37–41 gestation weeks were classified as full-term newborns (Group 3, n=22) [15]. Gestational age (GA) was calculated based on last menstrual period or ultrasound measurement of fetal length in the first trimester. Exclusion criteria were genetic syndromes, Apgar score of less than 5 at 5 minutes, clinical or pathological evidence of chorioamnionitis, or clinical and laboratory signs of infection (elevated infection markers such

as C-reactive protein, IL-8, IL-6; rupture of membranes for more than 18 hours; and confirmed early-onset sepsis).

Peripheral blood was collected from healthy adult volunteers as controls (n=39).

The neonates were recruited from the Obstetric Center, University Hospital, University of São Paulo and the Obstetric Center of the Central Institute of the Hospital das Clínicas. The study was approved by the Research and Ethics Committee of the Department of Pediatrics of São Paulo University School of Medicine and by the Ethics Committee for the Analysis of Projects and Research of the Hospital das Clínicas. Informed consent was obtained from each participant.

Neonatal cord blood was collected from the fetal side of the placenta immediately after delivery by umbilical cord venipuncture after clamping in EDTA-coated tubes and in special clot activator tubes for serum separation and cytokine measurement. Blood in EDTA tubes was maintained at room temperature and processed within 24 hours of collection.

The cytokines IL-8 and IL-6 were measured with a cytometric bead array (Becton Dickinson BD Biosciences, San Jose, CA, USA) using sera from cord blood from the three groups of neonates.

Immunophenotyping by Flow Cytometry:

The number of total blood leukocytes from the umbilical cord blood and peripheral blood samples was determined with an automatic counter (Abbott Cell-Dyn CD-1700 Hematology Analyzer, Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA). To analyze cell populations, 1×10^6 leukocytes were placed in a tube and subjected to two 20-minute erythrocyte lysis steps using BD Pharm Lyse™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). After centrifugation and washing with staining buffer (phosphate-buffered saline with 1% fetal calf serum and 0.1% sodium azide), the cells were stained with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies

against each cell population under study for 30 minutes. After washing, the cells were resuspended in staining buffer and immediately analyzed to prevent the loss of fluorescence. Data were acquired with a BD LSRII Flow Cytometer™ (BD Biosciences) with FACSDiva software (Becton Dickinson), and the analysis was performed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA). Data are presented as the means of absolute numbers or frequencies.

The same fluorochromes were used for all experiments: FITC (fluorescein isothiocyanate) or Alexa Fluor™ 488; PE (phycoerythrin); PE-Cy5 (phycoerythrin-cyanine 5) or PerCP-Cy5.5 (peridinin chlorophyll protein-cyanine 5.5); PE-Cy7 (phycoerythrin-cyanine 7); APC (allophycocyanin) or Alexa™ 647; APC-Cy7 (allophycocyanin-cyanine 7); Pacific blue™ or V450 or Brilliant Violet 421™ (BioLegend, San Diego, CA, USA); AmCyan or V500, all from BD Biosciences unless otherwise stated.

Dendritic cells:

Dendritic cells were defined as lineage cocktail (Lin^-)-negative and HLA-DR^-positive according to Koumbi et al. [16] and Shin et al. [17], and myeloid DC populations (Lin^-HLA-DR^+/$CD11c^+$) and plasmacytoid DC populations (Lin^-HLA-DR^+/$CD123c^+$) were characterized as described by Sorg et al. [18] and Schreibelt et al. [19] (Fig. 1A and B). Within each subpopulation, the dendritic cell pattern recognition, maturation, and activation markers were analyzed using CD1a, CD80, CD86, TLR-2, and TLR-4. The results were expressed as the percentage of total DCs of all nucleated cells. Absolute numbers of DCs were calculated from complete blood leukocyte counts. Subpopulations of myeloid DCs and plasmacytoid DCs were expressed as percentages and absolute numbers of total DCs.

Monocytes:

To analyze monocyte populations, a P1 gate on $CD14^+$/HLA-DR^+ cells was established (Fig. 2). The expression levels of the costimulatory molecules CD80, CD86, and CD40 and the pattern recognition receptors TLR-2 and TLR-4 were analyzed on cells within this P1 gate. The results were expressed as the percentage of total monocytes of all nucleated cells. Absolute numbers of monocytes were calculated from complete blood leukocyte counts. The monocyte activation markers were expressed as percentages and absolute numbers of total monocytes.

T lymphocytes:

T cell subsets were identified based on the expression of CD45RA and CCR7 as depicted in Fig. 3.

Characterization of the $CD4^+$ T cell compartment was performed using combinations of markers gating on $CD3^+$/$CD4^+$ cells within the total lymphocyte population. Within the $CD3^+$/$CD4^+$ helper T lymphocytes gate, $CD4^+$/$CD45RA^+$/$CCR7^+$/$CD27^+$/$CD62L^+$ cells were classified as naïve T lymphocytes; $CD4^+$/$CD62L^{low}$/$CD69^+$ cells were classified as effector T lymphocytes; $CD4^+$/$CD45RA^-$/$CCR7^+$/$CD27^+$ cells were classified as central memory T lymphocytes; and $CD4^+$/$CD45RA^-$/$CCR7^-$/$CD27^+$ cells were classified as effector memory T lymphocytes.

Absolute numbers of T cell subsets were calculated by multiplying the frequency of the indicated subset obtained by flow cytometry by the absolute lymphocyte number as determined from complete blood cell counts.

B lymphocytes:

B cells were identified as $CD19^+$ cells within the total lymphocyte population (Fig. 4). Definitions of B cell subsets were performed using the following markers: $CD19^+$/$CD27^-$ cells were classified as naïve B lymphocytes; $CD19^+$/$CD27^+$ cells were classified as memory B

lymphocytes; and $CD19^+/CD69^+/CD40^+$ cells were classified as activated B lymphocytes. Within the $CD19^+$ B cell population, TLR-2 and TLR-4 expression were also analyzed.

Absolute B cell subset numbers were calculated by multiplying the frequency of the indicated subset obtained by flow cytometry by the absolute lymphocyte number determined from complete blood leukocyte counts.

Statistics:

Statistical analyses were performed using MedCalc 12.7.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). The Kruskal-Wallis non-parametric statistical test followed by Dunn's post-hoc test for multiple comparisons were performed to compare groups that were not normally distributed. A significance threshold of 0.05 was used for all tests unless otherwise stated.

3. Results

Characteristics of preterm and term newborns

A total of 56 neonates, 13 extreme preterm neonates born before 34 gestation weeks, 21 late preterm neonates born between 34 - 36 $^6/_7$ gestation weeks, and 22 full-term neonates born after 37 gestation weeks were enrolled in the study as shown in Table 1. These groups were divided according to the classification proposed by Engle [20]. Leukocyte subset data from these neonates were compared with the leukocyte subset data from 39 adult controls. All 56 newborns included in this study were born without signs of infection; they were excluded if any indication of a pathologic background in the mother's clinical history was detected. The C-reactive protein, IL-8, and IL-6 levels in the newborns' sera also indicated that they were healthy.

Given the increased risk of infection in preterm infants and the pathophysiological role of cytokines as mediators of infection, measurement of neonatal cytokine levels may

provide an earlier biomarker for the diagnosis of infection than downstream markers such as C-reactive protein and absolute changes in white blood cell counts. The concentration of IL-8 depended on the mode of delivery and was higher in neonates delivered vaginally than those delivered by elective cesarean section, which resulted in slightly higher, although not statistically significant, IL-8 levels in Group 3 compared with the other groups. IL-6 concentrations were low in all newborn samples and were statistically equivalent between groups.

Table 2 shows the total leukocyte counts of our study subjects. Statistical analysis demonstrated that newborns from Group 3 had higher leukocyte numbers than the other groups ($p<0.05$) and that adults had significantly lower leukocyte numbers than the three groups of newborns ($p<0.05$).

We determined the absolute leukocyte subpopulation counts in preterm and full-term infants by 8-color flow cytometry. We compared these data with data obtained from healthy adults.

Dendritic Cell Subsets

The data in Table 3 show specific comparisons of adult cell populations with populations from all neonates and those from full-term neonates with those from preterm neonates after determination of statistical significance across all study groups using the Kruskal-Wallis test as described elsewhere. The frequencies and absolute numbers of dendritic cells (Lin^-/HLA-DR^+) among all nucleated cells were significantly higher in full-term and preterm neonates than in adults. Group 3 had lower percentages of myeloid and plasmacytoid DCs than either of the preterm groups or the adults. The numbers of myeloid and plasmacytoid DCs did not differ among the neonate groups, but were higher in neonates than in adults. Myeloid and plasmacytoid DCs expressing the activation markers CD80 and

CD86 were also present at the same frequencies among neonates and adults, with the exception of Group 1, which displayed a reduced frequency of $CD80^+$ cells in both DC subsets compared with Group 3 and adults. No differences in frequencies were detected among the groups with regard to immature mDCs and pDCs expressing CD1a. The absolute numbers of $CD80^+$ mDCs and pDCs were equivalent when Group 1 was compared with adults, while Group 1 had significantly less of these cells compared to Groups 2 and 3. These results were influenced by the low frequencies of these cell subsets in neonates from Group 1. The absolute numbers of $CD1a^+$ and $CD86^+$ mDCs and pDCs were significantly higher in the three groups of neonates compared to the adults, likely due to the higher number of circulating leukocytes in newborns.

The percentages of mDCs and pDCs expressing the activation marker TLR-2 gradually increased in the three groups of neonates, but no significant differences were detected between these groups or in comparison with adults. All newborns had lower frequencies of TLR-4^+ mDCs than adults, while TLR-4^+ pDCs were present in similar percentages in neonates and adults.

The majority of the analyses revealed statistically higher absolute numbers of DCs and DC subsets in neonates compared with adults, as was also observed for TLR-2 and TLR-4 expression in both DC subsets, but these results reflected the higher numbers of leukocytes in the umbilical cord blood.

Monocytes

The percentages of $CD14^+$HLA-DR^+ monocytes were similar between all neonate groups and the adults with the exception of Group 2, which had a higher frequency of these cells than adults. However, the absolute counts revealed a significantly higher number of these cells in preterm and full-term neonates when separately compared to adults and a

lower number of these cells in Group 1 compared with the other neonates (Table 4). The analyses of the frequency of activation markers CD80 and CD86 on the surface of monocytes revealed no significant differences with the exception of Group 2, which showed a reduced frequency of $CD80^+$ monocytes compared with adults (*p<0.05*) and a higher frequency of $CD86^+$ monocytes than Group 3 (*p<0.01*). The frequencies of TLR-2- and TLR-4-expressing monocytes were similar among all groups, but the number of these cells was higher in neonates compared with adults, with the exception of TLR-2 in Group 1. In addition, Group 1 had a lower number of TLR-2^+ monocytes compared with other newborns, while Group 3 had a higher number of TLR-4^+ monocytes compared to Groups 1 and 2 and adults.

T Lymphocyte Subsets

Based on the expression of CD45RA, CCR7, and CD62L, the $CD4^+$ T cell compartment was divided into naïve, memory, effector memory, and effector T cells. The data in Table 5 show that the percentage of $CD3^+CD4^+$ helper T cells varied across the groups but was not significantly different except between Group 3 and adults. Due to the significantly higher number of lymphocytes in neonates, the three neonate groups had higher numbers of $CD3^+CD4^+$ T helper cells than adults, but the numbers of these cells were not different among the groups of neonates.

Study of the memory and naïve subsets of $CD4^+$ T cells revealed further differences. Higher percentages and numbers of naïve $CD4^+CD45RA^+CCR7^+CD27^+CD62L^+$ T cells were observed in all newborns compared with adults. The percentages of $CD4^+CD45RA^-CCR7^+CD27^+$ central memory T cells varied significantly across groups and were equivalent among neonates and adults, while the absolute numbers of these cells were higher in neonates from Groups 1 and 2 due to the increased $CD4^+$ T cell compartment found in these groups. By

contrast, all neonates had strikingly lower frequencies and numbers of effector memory T cells ($CD4^+CD45RA^-CCR7^-CD27^+$) compared with adults, as expected.

Effector $CD4^+CD62L^{low}CD69^+$ T cells were present in low percentages in blood, but adults showed significantly higher frequencies of these cells compared to full-term and preterm newborns.

B Lymphocyte Subsets

As shown in Table 6, the percentages of blood $CD19^+$ B lymphocytes were equivalent among all groups. The absolute numbers of these cells were equivalent among neonates and were significantly higher in neonates than in adults. Naïve $CD19^+CD27^-$ B cell percentages and numbers indicated that these cells constituted the largest peripheral B cell subset in preterm and full-term neonates. Neonates had statistically higher numbers and frequencies of naïve B cells than adults. By contrast, adults had a strikingly higher percentage of memory $CD19^+CD27^+$ B cells compared with the full-term and preterm groups, as expected. The activated $CD19^+CD69^+CD40^+$ B cell subset was present in similarly low percentages in adults and newborns, but these cells were present in higher numbers in full-term neonates compared with adults. TLR-2 and -4 expression on $CD19^+$ B lymphocytes was insignificant (data not shown).

4. Discussion

Previous studies have compared leukocyte subsets from full-term neonates with adults, but these studies rarely include samples from preterm newborns. Generally, the composition of circulating white blood cells numerically differs among neonates of different gestational ages, likely reflecting dynamic developmental phases. The proportions of both lymphoid and myeloid cells are higher in the peripheral blood of a healthy term neonate than

a preterm neonate [21-24]. Furthermore, it is difficult to compare previous data because of differences in methodology. Both relative and absolute counts have been used to illustrate the changes in leukocyte subpopulations [25-27]. However, it is important to compare absolute counts to assess the actual size of a leukocyte subpopulation [28]. In the present work, we consistently observed differences in absolute numbers of different leukocyte populations among neonates and adults, but these results reflected the higher number of circulating leukocytes found in the three groups of neonates.

The induction of different types of innate and adaptive immune responses based on the nature of the antigens and the environmental context is crucial to cope with a variety of pathogens and to concurrently avoid pathological reactions to self-antigens. Several studies have shown that the diverse immune responses are critically controlled by dendritic cells (DCs). DCs are widely distributed, potent antigen-presenting cells (APCs) that are unique based on their prominent role in the activation, polarization, and regulation of adaptive immune responses [18, 29-31].

DCs have been identified as an HLA-DR^{+} cell population that lacks the expression of antigens typical of other cell lineages (Lin^{-}) (CD3, CD14, CD19, CD20, and CD56) [18, 31, 32]. Depending on their developmental origin, cytokine activation, surface antigens, and functional capacity, DCs can be subdivided into two major distinct populations: myeloid and lymphoid/plasmacytoid DCs [33]. Myeloid DCs are CD11c^{+}/CD123$^{\pm}$ and induce Th1 cell differentiation by producing high levels of interleukin 12 (IL-12), whereas plasmacytoid DCs are CD11c^{-}/CD123^{+} and induce Th2 cell differentiation, producing abundant amounts of type I/II interferons (IFNs) [33, 34]. In the present work, we observed significantly higher relative and absolute numbers of total DCs in preterm and full-term newborns compared with adults. However, adults had an increased frequency of mDCs compared with newborns and equivalent frequencies of pDCs, with the surprising exception of Group 3, when compared

with the other neonates. This higher percentage of mDCs in adults could contribute to a more efficient Th1 response.

In cord blood, immature DCs are mainly CD1a$^+$ and have a greater ability to internalize antigens but are poor activators of T cells because they express low levels of the costimulatory molecules CD40, CD80, CD86. We observed similar frequencies of mDCs and pDCs expressing CD1a among neonates and adults. Mature dendritic cells are CD83$^+$, express high levels of CD80, CD86, and HLA-DR and are excellent stimulators of antigen-specific T cells.

TLRs are expressed on the cell surface of professional APCs, and TLR activation is central to innate and adaptive immunity. Efficient T cell activation also requires the activation of dendritic cells, which involves the induction of costimulatory molecules and cytokine production. This dendritic cell activation is initiated by the stimulation of TLRs expressed on the surface of DCs. Thus, TLRs play a crucial role in the induction of adaptive immunity as well as innate immunity. DC subsets recognize different microbial pathogens by expressing distinct TLRs on their surface and induce different types of innate and adaptive immune responses depending on environmental factors [35-37].

Dendritic cells from cord blood normally express TLR-2 and TLR-4 [32, 38]. Expression levels of TLR-2 and TLR-4 were previously shown to be normal on neonatal mDCs, in contrast to the lower levels of expression of these molecules on neonatal monocytes [39]. These results are in agreement with our data, at least with regard to TLR-4. We observed the same expression pattern on pDCs as we did not observe significant differences in TLR expression on pDCs among neonates and adults, although we observed increasing TLR-2 expression on mDCs and pDCs according to gestational age. With regard to TLR-4 expression on mDCs, we observed significantly lower frequencies of TLR-4$^+$ mDCs in both of the preterm groups and the full-term group compared with adults. Thus, the lower expression of TLR-4 on mDCs and the regulation of critical molecules involved in TLR signaling [32], which has not yet been

evaluated in neonatal DCs, could account for the relative unresponsiveness of neonatal DCs to TLR stimulation by gram-negative rods.

Monocytes were initially identified based on their expression of large amounts of CD14 (which is part of the receptor for lipopolysaccharide) and MHC class II molecules (HLA-DR) [40, 41]. We observed similar total monocyte frequencies among neonates and adults, with the exception of Group 2, which displayed a higher frequency of this population when compared with adults.

Previous studies have shown that neonatal monocytes exhibit low baseline expression of the costimulatory molecules CD86 and CD40, potentially contributing to deficient APC activity, in contrast to our data. We observed similar frequencies of monocytes expressing CD80 and CD86 among neonates and adults, but the percentages of $CD80^+$ monocytes were slightly lower in neonates than adults, although significantly different only for Group 2. We also observed reduced CD80 expression on mDCs and pDCs in neonates from Group 1 compared to Group 3 and adults, supporting the notion of deficient activity of APCs from preterm newborns.

Although neonatal monocytes express similar mRNA levels of different TLRs compared with adult monocytes, these data do not exclude possible differences in the protein expression of these receptors [32, 42, 43]. In the present work, we observed similar expression of TLR-2 and TLR-4 in monocytes from all study groups, but the numbers of $TLR\text{-}2^+$ and $TLR\text{-}4^+$ monocytes were slightly higher in Groups 2 and 3. These observations agree with previous data that describe constitutive TLR-4 expression and cytokine secretion upon LPS stimulation that increases with gestational age [9].

Upon contact with cognate MHC-peptide complexes on APCs, naïve T cells become effector cells that are highly functional. These effector cells can differentiate into effector

memory T cells and, later, into central memory T cells based on the expression of different cell surface molecules underlying homing markers, chemokines, and cytokine receptors [44-49].

We observed higher frequencies of total lymphocytes in both groups of preterm neonates compared with full-term neonates and adults. However, the percentages of T helper cells were equivalent among all groups, with the exception of the comparison between full-term neonates and adults. Naïve T cells are characterized by the expression of CD45RA and CCR7, the costimulatory receptors CD28 and CD27, and the lack of expression of cytolytic molecules. Long-lived central memory T cells home preferentially to lymph nodes because they express the lymph node-homing markers CD62L and CCR7 and share several phenotypic properties with naïve T cells but do not express CD45RA. Central memory T cells, as opposed to naïve T cells, can rapidly differentiate into cells endowed with effector function upon exposure to antigen [45], can upregulate CD40L to a greater extent than naïve cells, and are characterized by their ability to proliferate and secrete high levels of IL-2.

In the present work, higher frequencies of naïve T cells were observed in neonates compared with adults, as expected. No significant differences in naïve T cells were observed among the newborns, although the extreme newborns showed a slightly lower relative number compared to the other neonates. An overall increase in naïve T cells in neonates has been demonstrated previously, and it has also been shown that preterm neonates have reduced naïve T cell populations compared with full-term neonates [6, 8]. It has been speculated that this difference is due to decreased thymic output or to decreased peripheral expansion of naïve T cells because of more limited functional T cell capacities in extreme preterm infants [8]. The thymic output of naïve T cells in term neonates has already been shown to be normal [50].

Surprisingly, central memory T cell frequencies were equivalent among preterm neonates and adults. These finding are in contrast to previous reports of a reduced frequency

of memory T cells in neonates compared with adults. However, the effector memory and central memory T cell subsets were not distinguished [51].

Effector memory and effector T cells were strikingly higher in adults compared with the three groups of neonates, among which we did not observe significant differences. Effector memory T cells preferentially migrate to peripheral tissues, do not express CD45RA or CCR7, and may or may not express CD27/CD28 depending on their state of differentiation [46]. Effector T cells are identified by the expression of various markers, including CD69 and CD25, and low levels of CD62L [49]. Because these cells have been already activated upon previous contact with antigen, the higher frequencies found in adults in this study would be expected.

T cell-dependent antibody responses are initiated when B cells receive stimulatory signals from the antigen-triggered B-cell receptor and CD40, which is triggered by CD40L induced on helper T cells upon cognate interaction with B cells. Productive signaling events lead to B cell expansion, the generation of short-lived antibody-secreting cells, and, following the germinal center reaction, high-affinity memory B cells and long-lived plasma cells [52, 53].

Most $CD19^+$ B lymphocytes consist mainly of naïve cells in full-term and preterm newborns, and our group and others have observed significantly reduced frequencies of memory B cells in neonates compared to adults [8, 50]. Human memory and naïve B cells can be identified using a combination of markers that include, in addition to CD19, immunoglobulin isotypes and CD27, which is expressed on most memory B cells [50, 52, 54].

More recently, it has been shown that memory B cells constitutively express TLR-2 to some degree [52]. In the present work, we observed extremely low frequencies of B lymphocytes expressing TLR-2 and TLR-4 in all groups, including adults (data not shown).

A premature birth is generally caused by negative perinatal factors such as maternal pre-eclampsia or intrauterine infection, and antenatal steroids are commonly used in preterm

infants. These factors can influence lymphocyte subpopulations in neonatal cord blood [25, 27, 55, 56]. However, studies examining these factors reported relative values and not absolute values, which may lead to misinterpretation [28] as we have shown significantly increased numbers of leukocytes in preterm and term infants in the present work.

Several studies have suggested that some innate immune mechanisms are impaired in neonates. However, neonates are immunocompetent to mount mature innate as well as adult-level T cell responses [57]. In this work, we showed that neonates, even extreme preterm neonates, frequently have adequate tools to combat extracellular pathogens, as evidenced by the relative and absolute numbers of innate cells and the expression of pattern recognition and activation molecules. However, an appropriate number of cells does not indicate proper function; thus, it is imperative to clarify defective mechanisms that may underlie the immune responses in newborns and contribute to the overall risk of infection by common neonatal pathogens.

5. Conclusions

Our study provides a more thorough characterization of leukocyte subsets in cord blood from extreme preterm, late preterm, and full-term newborns that may facilitate the identification of immunological deficiencies in the protection against extracellular pathogens. These data may also permit the development of clinical strategies to limit invasive medical interventions, particularly in the most vulnerable groups, such as extreme preterm newborns.

Acknowledgements

Financial support was provided by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) grants 2009/54246-5, 2009/52515-9, 2009/54400-5, and 2009/53864-7. The

authors are grateful to the mothers who kindly agreed to participate in this study and Dr. Ulysses Doria Filho for statistical analysis.

References

[1.] E. Protonotariou, A. Malamitsi-Puchner, D. Rizos et al., "Age related differentiations of Th1/Th2 cytokines in newborn infants," *Mediators of Inflammation*, vol. 13, pp. 89-92, 2004.

[2.] A. Kotiranta-Ainamo, J. Rautonen, and N. Rautonen, "Imbalanced cytokine secretion in newborns," *Biology of the neonate*, vol. 85, pp. 55-60, 2004.

[3.] G. Delespesse, L. P. Yang, Y. Ohshima et al., "Maturation of human neonatal CD4+ and CD8+ T lymphocytes into Th1/Th2 effectors," *Vaccine*, vol. 16, pp. 1415-1419, 1998.

[4.] I. Malhotra, P. Mungai, E. Muchiri et al., "Distinct Th1- and Th2-Type prenatal cytokine responses to Plasmodium falciparum erythrocyte invasion ligands," *Infection and immunity*, vol. 73, pp. 3462-3470, 2005.

[5.] C. Rabian-Herzog, S. Lesage, and E. Gluckman, "Characterization of lymphocyte subpopulations in cord blood," *Bone marrow transplantation*, vol. 9, pp. 64-67, 1992.

[6.] J.D. Peoples, S. Cheung, M. Nesin et al., "Neonatal cord blood subsets and cytokine response to bacterial antigens," *American journal of perinatology*, vol. 26, pp. 647-657, 2009.

[7.] R.L. Schelonka, and A.J. Infante, "Neonatal immunology," *Seminars in perinatology*, vol. 22, pp. 2-14, 1998.

[8.] J.C. Walker, M.A. Smolders, E.F. Gemen et al., "Development of lymphocyte subpopulations in preterm infants," *Scandinavian journal of immunology*, vol. 73, pp. 53-58, 2011.

[9.] K. Sadeghi, A. Berger, M. Langgartner et al., “Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling,” *The Journal of infectious diseases*, vol. 195, pp. 296-302, 2007.

[10.] B.J. Stoll, N.I. Hansen, R.D. Higgins et al., “Very low birth weight preterm infants with early onset neonatal sepsis: the predominance of gram-negative infections continues in the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, 2002-2003,” *The Pediatric infectious disease journal*,” vol. 24, pp. 635-639, 2005.

[11.] E. de Vries, R. de Groot, S. de Bruin-Versteeg, W.M. Comans-Bitter, and J.J. van Dongen, “Analysing the developing lymphocyte system of neonates and infants,” *European journal of pediatrics*, vol. 158, pp. 611-617, 1999.

[12.] D.W. Clapp, R.M. Kliegman, J.E. Baley et al., “Use of intravenously administered immune globulin to prevent nosocomial sepsis in low birth weight infants: report of a pilot study,” *The journal of pediatrics*, vol. 115, pp. 973-978, 1989.

[13.] M.L. Wang, D.J. Dorer, M.P. Fleming, and E.A. Catlin, “Clinical outcomes of near-term infants,” *Pediatrics*, vol. 114, pp. 372-376, 2004.

[14.] D.W. Clapp, “Developmental regulation of the immune system,” *Seminars in perinatology*, vol. 30, pp. 69-72, 2006.

[15.] W.A. Engle, and M.A. Kominiarek, “Late preterm infants, early term infants, and timing of elective deliveries,” *Clinics in perinatology*, vol. 35, pp. 325-341, 2008.

[16.] L.J. Koumbi, N.G. Papadopoulos, V. Anastassiadou et al., “Dendritic cells in uninfected infants born to hepatitis B virus-positive mothers,” *Clinical and vaccine immunology: CVI*, vol. 17, pp. 1079-1085, 2010.

[17.] S. Shin, J.Y. Jang, E.Y. Roh et al., “Differences in circulating dendritic cell subtypes in pregnant women, cord blood and healthy adult women,” *Journal of Korean medical science*, vol. 24, pp. 853-859, 2009.

[18.] R.V. Sorg, G. Kögler, and P. Wernet, “Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c- population,” *Blood*, vol. 93, pp. 2302-2307, 1999.

[19.] G. Schreibelt, J. Tel, K.H. Sliepen et al., “Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy,” *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, vol. 59, pp. 1573-1582, 2010.

[20.] W.A. Engle, “A Recommendation for the Definition of “Late Preterm” (Near-Term) and the Birth Weight–Gestational Age Classification System,” *Seminars in perinatology*, vol. 30, pp. 2-7, 2006.

[21.] T.L. Milcic, “The complete blood count,” *Neonatal network: NN*, vol.29, pp. 109-115, 2010.

[22.] R.D. Christensen, E. Henry, J. Jopling, and S.E. Wiedmeier, “The CBC: reference ranges for neonates,” *Seminars in perinatology*, vol. 33, pp. 3-11, 2009.

[23.] J.E. Berrington, D. Barge, A.C. Fenton, A.J. Cant, and G.P. Spickett, “Lymphocyte subsets in term and significantly preterm UK infants in the first year of life analyzed by single platform flow cytometry” *Clinical and experimental immunology*, vol. 140, pp. 289-292, 2005.

[24.] A.A. Sharma, R. Jen, A. Butler, and P.M. Lavoie, “The developing human preterm neonatal immune system: a case for more research in this area” *Clinical immunology (Orlando, Fla)*, vol. 145, pp. 61-68, 2012.

[25.] E. Juretić, B. Uzarević, M. Petrovecki, and A. Juretić, “Two color flow cytometric analysis of preterm and term newborn lymphocytes,” *Immunobiology*, vol. 202, pp. 421-428, 2000.

[26.] E. Juretić, A. Juretić, B. Uzarević, and M. Petrovecki, “Alterations in lymphocyte phenotype of infected preterm newborns,” *Biology of the neonate*, vol. 80, pp. 223-227, 2001.

[27.] A. Kotiranta-Ainamo, M. Apajasalo, M. Pohjavuori, N. Rautonen, and J. Rautonen. “Mononuclear cell subpopulations in preterm and full term neonates: independent effect of gestational age, neonatal infection, maternal pre-eclampsia, maternal betamethasone therapy, and mode of delivery,” *Clinical experimental immunology*, vol. 115, pp. 309-314, 1999.

[28.] W.M. Comans-Bitter, R. de Groot, R. van den Beemd, “Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations,” *The Journal of pediatrics*, vol. 130, pp. 388-393, 1997.

[29.] T. Ito, Y.J. Liu, and N. Kadowaki, “Functional diversity and plasticity of human dendritic cell subsets. *International journal of hematology*,” vol. 81, pp. 188-196, 2005.

[30.] N. Kadowaki, “The divergence and interplay between pDC and mDC in humans,” *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, vol. 14, pp. 808-817, 2009.

[31.] M. Cappelletti, S. Giannelli, A. Martinelli et al., “Lack of activation of peripheral blood dendritic cells in human pregnancies complicated by intrauterine growth restriction,” Placenta, vol. 34, pp. 35-41, 2013.

[32.] P.A. Velilla, M.T. Rugeles, and C.A. Chougnet, “Defective antigen-presenting cell function in human neonates,” *Clinical immunology (Orlando, Fla)*, vol. 121, pp. 251-259, 2006.

[33.] R.M. Steinman, “Some interfaces of dendritic cell biology,” *APMIS: acta pathologica, microbiologica et immunologica Scandinavica*, vol. 111, pp. 675-697, 2003.

[34.] S. Adams, D.W. O'Neill, and N. Bhardwaj, “Recent advances in dendritic cell biology,” *Journal of clinical immunology*, vol. 25, pp. 177-188, 2005.

[35.] S. Akira, K. Takeda, and T. Kaisho, “Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity,” *Nature immunology*, vol. 2, pp. 675-680, 2001.

[36.] A. Aderem, and R.J. Ulevitch, “Toll-like receptors in the induction of the innate immune response,” *Nature*, vol. 406, pp. 782-787, 2000.

[37.] C.A. Janeway, and R. Medzhitov, “Innate immune recognition,” *Annual review of immunology*, vol. 20, pp. 197-216, 2002.

[38.] M.V. Gulubova, J.R. Ananiev, T.I. Vlaykova et al., “Role of dendritic cells in progression and clinical outcome of colon cancer,” *International journal of colorectal disease*, vol. 27, pp. 159-169, 2012.

[39.] L. Drohan, J.J. Harding, B. Holm et al., “Selective developmental defects of cord blood antigen-presenting cell subsets,” Human immunology, vol. 65, pp. 1356-1369, 2004.

[40.] E. Sohlberg, S. Saghafian-Hedengren, K. Bremme, and E. Sverremark-Ekström, “Cord blood monocyte subsets are similar to adult and show potent peptidoglycan-stimulated cytokine responses,” *Immunology*, vol. 133, pp. 41-50, 2011.

[41.] S. Gordon, and P.R. Taylor, “Monocyte and macrophage heterogeneity,” *Nature reviews. Immunology*, vol. 12, pp. 953-964, 2005.

[42.] E. Forster-Waldl, K. Sadeghi, D. Tamandl et al., “Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging,” *Pediatric research*, vol. 58, pp. 121-124, 2005.

[43.] O. Levy, K.A. Zarember, R.M. Roy et al., “Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF alpha

induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848," *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 173, pp. 4627-4634, 2004.

[44.] F. Sallusto, J. Geginat, and A. Lanzavecchia, "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance," *Annual review of immunology*, vol. 22, pp. 745–763, 2004.

[45.] F. Sallusto, D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia, "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions," *Nature*, vol. 401, pp. 708-712, 1999.

[46.] M.D. Hazenberg, S.A. Otto, D. Hamann et al., "Depletion of naive CD4 T cells by CXCR4-using HIV-1 variants occurs mainly through increased T-cell death and activation," *AIDS (London, England)*, vol. 17, pp. 1419-1424. 2003.

[47.] D. Masopust, V. Vezys, A.L. Marzo, and L. Lefrancois, "Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue," Science (New York, N. Y.), vol. 291, pp. 2413-2417, 2001.

[48.] T. Willinger, T. Freeman, H. Hasegawa, A.J. McMichael, and M.F. Callan, "Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets," *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 175, pp. 5895-5903, 2005.

[49.] A. Tanel, S.G. Fonseca, B. Yassine-Diab et al., "Cellular and molecular mechanisms of memory T-cell survival," *Expert review of vaccines*, vol. 8, pp. 299-312, 2009.

[50.] R. van Gent, C.M. van Tilburg, E.E. Nibbelke et al., "Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments," *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, vol. 133,pp. 95-107, 2009.

[51.] P. Szabolcs, K.D. Park, M. Reese et al., “Coexistent naive phenotype and higher cycling rate of cord blood T cells as compared to adult peripheral blood,” *Experimental hematology*, vol. 31, pp. 708-714, 2003.

[52.] A. Lanzavecchia, N. Bernasconi, E. Traggiai et al., “Understanding and making use of human memory B cells,” Immunological reviews, vol. 211, pp. 303-309, 2006.

[53.] S. Néron, P.J. Nadeau, A. Darveau, and J.F. Leblanc, “Tuning of CD40-CD154 interactions in human B-lymphocyte activation: a broad array of in vitro models for a complex in vivo situation. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, vol. 59, pp. 25-40, 2011.

[54.] S.G. Tangye, and K.L. Good, “Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or "memory" B cells?,” *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 179, pp. 13-19, 2007.

[55.] A. Kavelaars, G. van der Pompe, J.M. Bakker et al., “Altered immune function in human newborns after prenatal administration of bethamethasone: enhanced natural killer cell activity and decreased T cell proliferation in cord blood,” *Pediatric research*, vol. 45, pp. 306-312, 1999.

[56.] S. Chabra, C. Cottrill, Rayens MK et al., “Lymphocyte subsets in cord blood of preterm infants: effect of antenatal steroids,” *Biology of the neonate*, vol. 74, pp. 200-207, 1998.

[57.] L. Maródi, “Neonatal Innate Immunity to Infectious Agents,” *Infection and immunity*, vol. 74, pp. 1999-2006, 2006.

Table 1. Demographic characteristics of study subjects

Characteristics	Group 1 (G1) (13)	Group 2 (G2) (21)	Group 3 (G3) (22)	*p* value G1 X G2	*p* value G1 X G3	*p* value G2 X G3
Male/Female*	9 (69.2) / 4 (30.8)	13 (61.9) / 8 (38.1)	13 (59.1) / 9 (40.9)	-	-	-
Birth Weight (g)[Ŧ]	1606 ± 294.3	2166 ± 454	3317 ± 431.4	*p < 0.001*	*p < 0.0001*	*p < 0.0001*
Gestational age (wk)[Ŧ]	32 ± 1 2/7	35 1/7 ± 0 6/7	39 1/7 ± 1 1/7	*p < 0.001*	*p < 0.0001*	*p < 0.0001*
Apgar at 1 min [Ŧ]	7 ± 2	8 ± 2	9 ± 1	-	*p < 0.001*	*p < 0.05*
Apgar at 5 min [Ŧ]	9 ± 1	9 ± 1	10 ± 1	-	*p < 0.001*	*p < 0.05*
Delivery[*] NSVD[†] / C-section	3 (23.1) / 10 (76.9)	6 (28.6) / 15 (71.4)	11 (50.0) / 11 (50.0)	-	-	-
IL-8[Ŧ]	68.7 ± 104.7	142.5 ± 402.4	276.7 ± 568.4	-	-	-
IL-6[Ŧ]	32.7 ± 79.9	25.2 ± 56.2	14.0 ± 40.8	-	-	-

[Ŧ]Mean ± standard deviation; [*]Frequency (percent); NSVD: Normal Spontaneous Vaginal Delivery.

Table 2. Total leukocyte counts of study subjects

	Group 1 [N=13]	Group 2 [N=21]	Group 3 [N=22]	Adult [N=39]
	Mean ± Standard Deviation			
Leukocyte numbers (10^3/µl)	9.1 ± 4.1	10.4 ± 3.9	14.8 ± 5.3	6.6 ± 2.0

N: Number.

Table 3. Frequencies (%) and absolute numbers (/µL) of total dendritic cells and dendritic cell subtypes

DC subsets	Group 1		Group 2		Group 3		Adult		Group 1 versus Adult % (/µL) *	Group 2 versus Adult % (/µL)	Group 3 versus Adult % (/µL)	Group 1 versus Group 2 % (/µL)	Group 1 versus Group 3 % (/µL)	Group 2 versus Group 3 % (/µL)
	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (/µL)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (/µL)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (/µL)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (/µL)						
Total DC ($LIN^-/HLA\text{-}DR^+$)	2.2 ± 1.7	184 ± 115	1.9 ± 1.5	199 ± 166	2.4 ± 1.8	386 ± 359	0.7 ± 0.5	44 ± 34	*0.000001 (0.0001)*	*0.000001 (0.0001)*	*0.000001 (0.0001)*	- *(-)*	- *(-)*	- *(-)*
mDC ($CD11c^+$)	27.5 ± 13.3	51 ± 62	22.3 ± 16.0	47 ± 54	14.4 ± 6.6	62 ± 73	31.2 ± 13.8	15 ± 17	- *(0.0001)*	*0.0001 (0.0001)*	*0.0001 (0.0001)*	- *(-)*	*0.0001 (-)*	*0.05 (-)*
mDC $CD1a^+$	25.5 ± 20.7	55 ± 63	21.5 ± 14.3	55 ± 93	27.8 ± 19.2	121 ± 186	22.8 ± 17.4	14 ± 17	- *(0.05)*	- *(0.01)*	- *(0.0001)*	- *(-)*	- *(-)*	- *(-)*
mDC $CD80^+$	25.3 ± 20.7	49 ± 53	34.5 ± 27.4	56 ± 48	46.1 ± 23.0	158 ± 132	43.2 ± 25.1	18 ± 16	*0.05 (-)*	- *(0.01)*	- *(0.0001)*	- *(-)*	*0.01 (0.01)*	- *(0.01)*
mDC $CD86^+$	64.2 ± 24.2	110 ± 86	62.4 ± 19.5	122 ± 97	60.7 ± 27.1	238 ± 270	64.7 ± 17.5	28 ± 22	- *(0.0001)*	- *(0.0001)*	- *(0.0001)*	- *(-)*	- *(-)*	- *(-)*
mDC $TLR2^+$	28.1	53	34.4	57	42.2	175	41.0	17	-	-	-	-	-	-

	± 20.9	± 61	± 28.0	± 53	± 23.3	± 172	± 26.6	± 16	*(0.01)*	*(0.01)*	*(0.0001)*	*(-)*	*(0.05)*	*(0.05)*
mDC TLR4^{+}	33.0 ± 26.6	47 ± 42	34.0 ± 21.4	82 ± 141	28.3 ± 20.7	91 ± 106	51.2 ± 29.4	27 ± 32	*0.05 (-)*	*0.05 (0.01)*	*0.01 (0.0001)*	- *(-)*	- *(-)*	- *(-)*
pDC (CD123^{+})	36.1 ± 18.2	73 ± 58	27.7 ± 22.2	57 ± 70	14.0 ± 9.6	70 ± 117	31.8 ± 15.9	16 ± 17	- *(0.001)*	- *(0.01)*	*0.0001 (0.01)*	- *(-)*	*0.01 (-)*	*0.05 (-)*
pDC CD1a^{+}	38.4 ± 27.2	65 ± 55	40.4 ± 21.9	85 ± 90	33.3 ± 22.7	125 ± 150	39.0 ± 20.2	19 ± 18	- *(0.01)*	- *(0.0001)*	- *(0.0001)*	- *(-)*	- *(-)*	- *(-)*
pDC CD80^{+}	9.2 ± 7.4	16 ± 16	21.7 ± 19.3	42 ± 44	25.1 ± 20.9	86 ± 105	19.1 ± 12.7	9 ± 12	*0.05 (-)*	- *(0.001)*	- *(0.0001)*	- *(-)*	*0.05 (0.01)*	- *(-)*
pDC CD86^{+}	40.3 ± 18.8	75 ± 70	34.8 ± 16.1	73 ± 66	40.5 ± 20.5	154 ± 171	36.3 ± 13.1	15 ± 11	- *(0.0001)*	- *(0.0001)*	- *(0.0001)*	- *(-)*	- *(-)*	- *(-)*
pDC TLR2^{+}	14.7 ± 14.8	30 ± 45	14.9 ± 18.8	27 ± 39	21.6 ± 18.9	90 ± 114	19.9 ± 15.9	9 ± 9	- *(0.05)*	- *(0.05)*	- *(0.01)*	- *(-)*	- *(-)*	- *(-)*
pDC TLR4^{+}	21.7 ± 17.2	31 ± 29	27.5 ± 14.6	58 ± 66	27.1 ± 23.4	91 ± 105	38.2 ± 26.0	22 ± 28	- *(-)*	- *(0.001)*	- *(0.0001)*	- *(-)*	- *(0.01)*	- *(-)*

DC, dendritic cell; n/a, not applicable; mDC, myeloid dendritic cell; pDC, plasmacytoid dendritic cell; SD, standard deviation; %, frequency of cells; /µL, absolute number per microliter blood; * Differences in frequencies (%) between groups are above and differences in absolute numbers (/µL) are below in parenthesis; - No statistically significant differences were found.

Table 4. Frequencies (%) and absolute numbers (/µL) of total monocytes and monocytes CD80$^+$, CD86$^+$, TLR-2$^+$ and TLR-4$^+$

Monocytes	Group 1		Group 2		Group 3		Adult		Group 1 versus Adult % (/µL) *	Group 2 versus Adult % (/µL)	Group 3 versus Adult % (/µL)	Group 1 versus Group 2 % (/µL)	Group 1 versus Group 3 % (/µL)	Group 2 versus Group 3 % (/µL)
	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (/µL)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (/µL)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (/µL)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (/µL)						
Monocyte (CD14$^+$/HLA-DR$^+$)	3.3 ± 1.4	302 ± 121	4.7 ± 2.5	481 ± 275	4.2 ± 3.2	575 ± 421	2.9 ± 1.6	191 ± 128	- *(0.05)*	*0.01 (0.0001)*	- *(0.0001)*	- *(0.05)*	- *(0.05)*	- *(-)*
Monocyte CD80$^+$	13.0 ± 9.2	32 ± 23	10.6 ± 7.9	49 ± 53	14.7 ± 9.6	74 ± 75	19.9 ± 16.8	38 ± 50	- *(-)*	*0.05 (-)*	- *(0.01)*	- *(-)*	- *(0.05)*	- *(-)*
Monocyte CD86$^+$	94.2 ± 4.8	287 ± 177	95.2 ± 7.1	460 ± 269	89.3 ± 11.9	527 ± 410	90.7 ± 13.9	179 ± 131	- *(0.05)*	- *(0.0001)*	- *(0.0001)*	- *(0.0001)*	- *(0.0001)*	*0.01 (-)*
Monocyte TLR2$^+$	73.2 ± 25.7	200 ± 117	87.4 ± 19.7	432 ± 288	86.9 ± 16.3	493 ± 405	84.0 ± 22.8	164 ± 129	- *(-)*	- *(0.0001)*	- *(0.0001)*	- *(0.05)*	- *(0.05)*	- *(-)*
Monocyte TLR4$^+$	13.2 ± 8.5	30 ± 15	13.4 ± 12.1	80 ± 127	18.4 ± 10.9	89 ± 69	13.7 ± 11.6	25 ± 34	- *(0.05)*	- *(0.05)*	- *(0.0001)*	- *(-)*	- *(0.01)*	- *(0.05)*

SD, standard deviation; %, frequency of cells; /µL, absolute number per microliter blood; * Differences in frequencies (%) between groups are above and differences in absolute numbers (/µL) are below in parenthesis; - No statistically significant differences were found.

Table 5. Frequencies (%) and absolute numbers (/µL) of total lymphocytes, T CD4$^+$ cells and T CD4$^+$ cell subsets

CD3$^+$CD4$^+$ T lymphocyte subsets	Group 1		Group 2		Group 3		Adult		Group 1 versus Adult	Group 2 versus Adult	Group 3 versus Adult	Group 1 versus Group 2	Group 1 versus Group 3	Group 2 versus Group 3
	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (/µL)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (/µL)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (/µL)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (/µL)	% (/µL) *	% (/µL)	% (/µL)	% (/µL)	% (/µL)	% (/µL)
Total Lymphocytes	50.0 ± 10.3	4298 ± 1429	45.6 ± 13.8	4658 ± 2135	33.7 ± 10.8	4115 ± 1763	36.2 ± 11.4	2393 ± 1235	*0.001 (0.0001)*	*0.01 (0.0001)*	- *(0.0001)*	- *(-)*	*0.01 (-)*	*0.01 (-)*
CD3$^+$CD4$^+$ T lymphocyte	38.3 ± 10.7	1656 ± 730	41.7 ± 11.2	1951 ± 975	36.5 ± 7.6	1412 ± 567	43.0 ± 8.1	1042 ± 646	- *(0.01)*	- *(0.0001)*	*0.05 (0.05)*	- *(-)*	- *(-)*	- *(-)*
Naive T lymphocyte (CD4$^+$CD45RA$^+$CCR7$^+$CD27$^+$CD28$^+$CD62L$^+$)	38.9 ± 19.2	559 ± 384	47.0 ± 17.0	1004 ± 696	41.9 ± 24.7	547 ± 387	22.8 ± 14.0	265 ± 275	*0.05 (0.01)*	*0.0001 (0.0001)*	*0.01 (0.01)*	- *(-)*	- *(-)*	- *(0.05)*
Effector T lymphocyte (CD4$^+$CD62L^{low}CD69$^+$)	0.9 ± 0.9	24 ± 34	1.2 ± 2.0	21 ± 43	1.4 ± 1.3	17 ± 18	2.2 ± 1.9	24 ± 26	*0.01 (-)*	*0.001 (-)*	*0.05 (-)*	- *(-)*	- *(-)*	- *(-)*
Central memory T lymphocyte (CD4$^+$CD45RA$^-$CCR7$^+$CD27$^+$)	23.2 ± 7.4	388 ± 226	24.8 ± 14.9	463 ± 335	19.9 ± 15.1	274 ± 301	20.1 ± 8.8	233 ± 259	- *(0.01)*	- *(0.01)*	- *(-)*	- *(-)*	- *(-)*	- *(-)*
Effector memory T lymphocyte (CD4$^+$CD45RA$^-$CCR7$^-$CD27$^+$)	10.8 ± 6.4	151 ± 79	8.7 ± 6.5	151 ± 95	9.1 ± 11.1	112 ± 117	36.4 ±12.6	350 ± 172	*0.0001 (0.0001)*	*0.0001 (0.0001)*	*0.0001 (0.0001)*	- *(-)*	- *(-)*	- *(-)*

SD, standard deviation; %, frequency of cells; /µL, absolute number per microliter blood; * Differences in frequencies (%) between groups are above and differences in absolute numbers (/µL) are below in parenthesis; - No statistically significant differences were found.

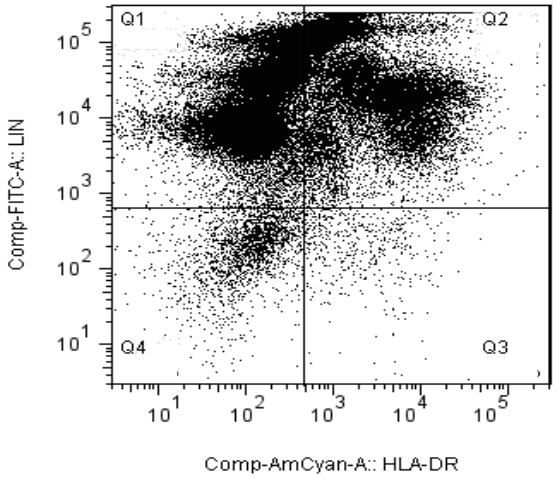
Table 6. Frequencies (%) and absolute numbers (/µL) of total CD19 B cells and B cell subsets

CD19$^+$ B lymphocytes	Group 1		Group 2		Group 3		Adult		Group 1 versus Adult	Group 2 versus Adult	Group 3 versus Adult	Group 1 versus Group 2	Group 1 versus Group 3	Group 2 versus Group 3
	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (/µL)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (/µL)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (/µL)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (/µL)	% (/µL) *	% (/µL)	% (/µL)	% (/µL)	% (/µL)	% (/µL)
CD19$^+$ B lymphocytes	16.5 ± 6.1	694 ± 312	13.0 ± 6.3	609 ± 524	14.1 ± 6.1	564 ± 330	11.6 ± 5.0	279 ± 195	- *(0.0001)*	- *(0.0001)*	- *(0.0001)*	- *(-)*	- *(-)*	- *(-)*
Naive B cell (CD19$^+$CD27$^-$)	80.9 ± 12.5	566 ± 286	80.0 ± 14.5	502 ± 460	81.5 ± 24.0	452 ± 293	62.9 ± 13.8	182 ± 149	*0.001* *(0.0001)*	*0.0001* *(0.0001)*	*0.0001* *(0.0001)*	- *(-)*	- *(-)*	- *(-)*
Memory B cell (CD19$^+$CD27$^+$)	19.1 ± 12.5	128 ± 98	20.2 ± 14.5	106 ± 91	18.2 ± 24.2	111 ± 197	37.1 ± 13.8	97 ± 76	*0.001* *(-)*	*0.0001* *(-)*	*0.0001* *(-)*	- *(-)*	- *(-)*	- *(-)*
Activated B cell (CD19$^+$CD40$^+$CD69$^+$)	1.6 ± 1.6	10 ± 9	3.6 ± 7.0	12 ± 16	4.3 ± 5.2	24 ± 30	2.8 ± 5.0	9 ± 25	- *(-)*	- *(-)*	- *(0.001)*	- *(-)*	- *(-)*	- *(-)*

SD, standard deviation; %, frequency of cells; /µL, absolute number per microliter blood; * Differences in frequencies (%) between groups are above and differences in absolute numbers (/µL) are below in parenthesis; - No statistically significant differences were found.

FIGURES

(A)



(B)

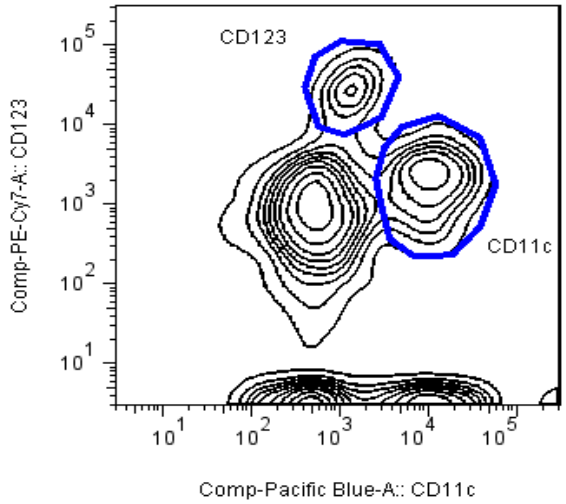


Figure 1. Representative phenotypic analysis of myeloid and plasmacytoid dendritic cell subsets by flow cytometry. (A) Lin-negative HLA-DR-positive cells were gated in Q3. (B) mDCs were identified as CD11c positive and CD123 negative and pDCs were identified as CD11c negative and CD123 positive within the $Lin^{-}HLA\text{-}DR^{+}$ cells.

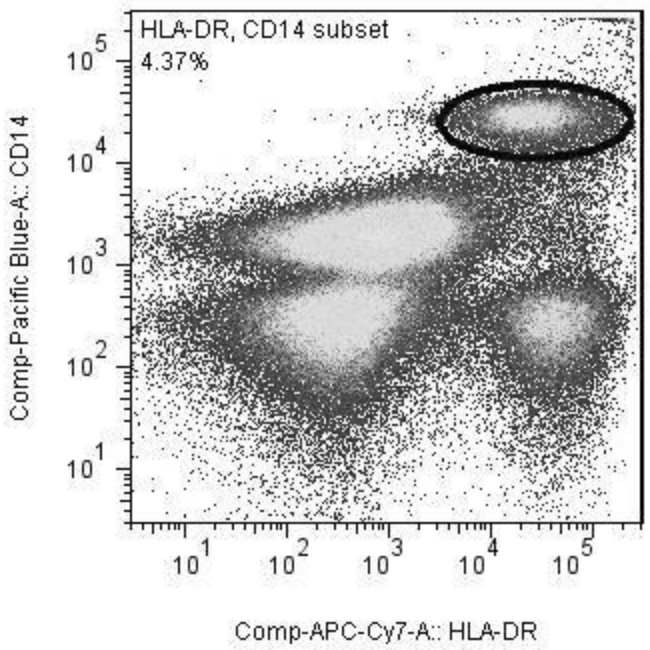


Figure 2. Representative phenotypic analysis of monocytes by flow cytometry. Monocytes were identified as CD14-positive and HLA-DR-positive cells.

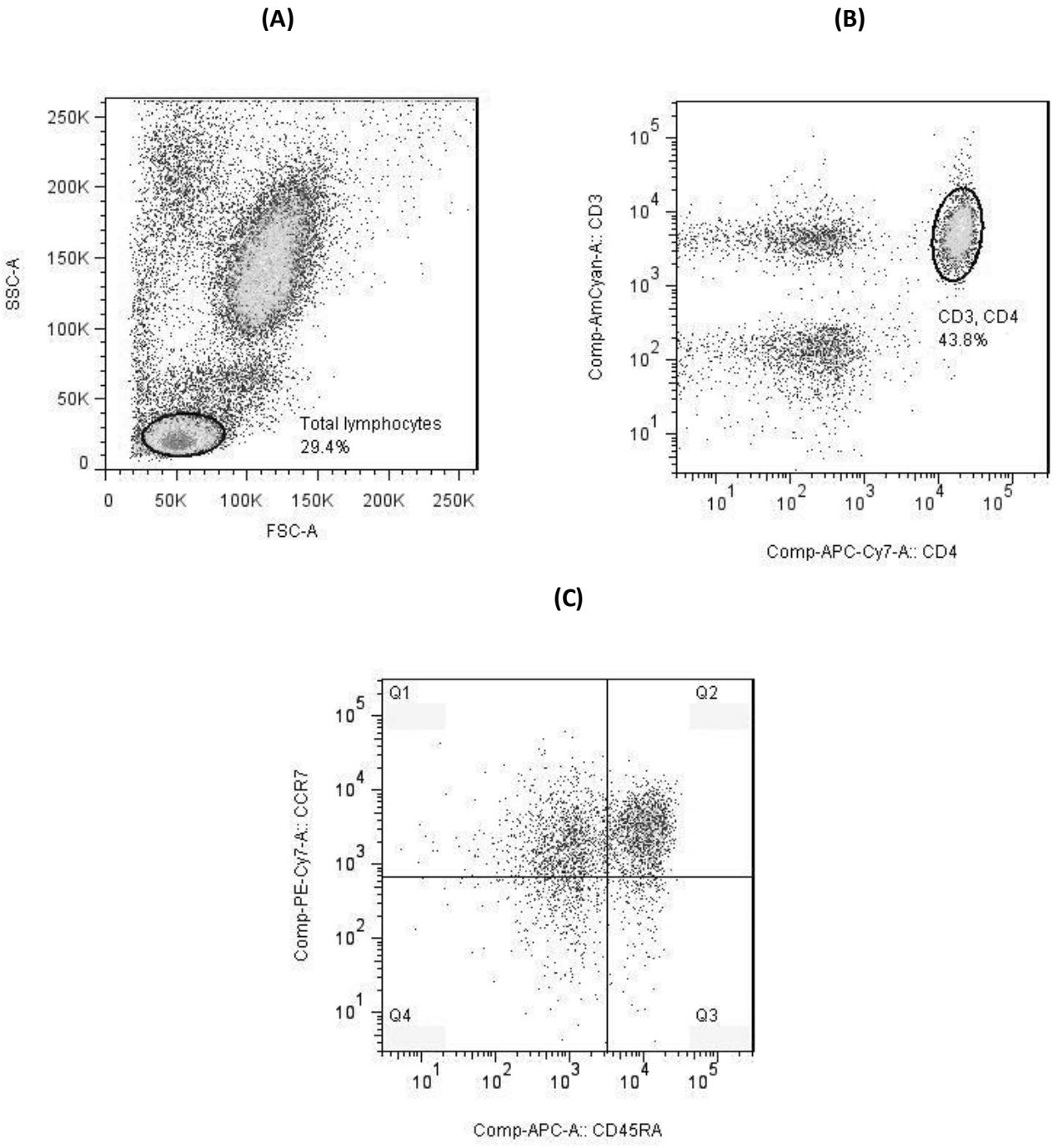


Figure 3. Representative characterization of T cell subsets by flow cytometry. T lymphocyte subsets were defined as described in Materials and Methods. (A) The total lymphocyte population was identified based on forward (FSC) and side (SSC) scatter characteristics. (B) T cells were identified by gating on CD3CD4^{bright} cells within the total lymphocyte population. (C) T cell subsets were identified based on the expression of CD45RA and CCR7 as shown. Q1: CD4^{+} central memory T cells; Q2: CD4^{+} naïve T cells; Q4: CD4^{+} effector memory T cells.

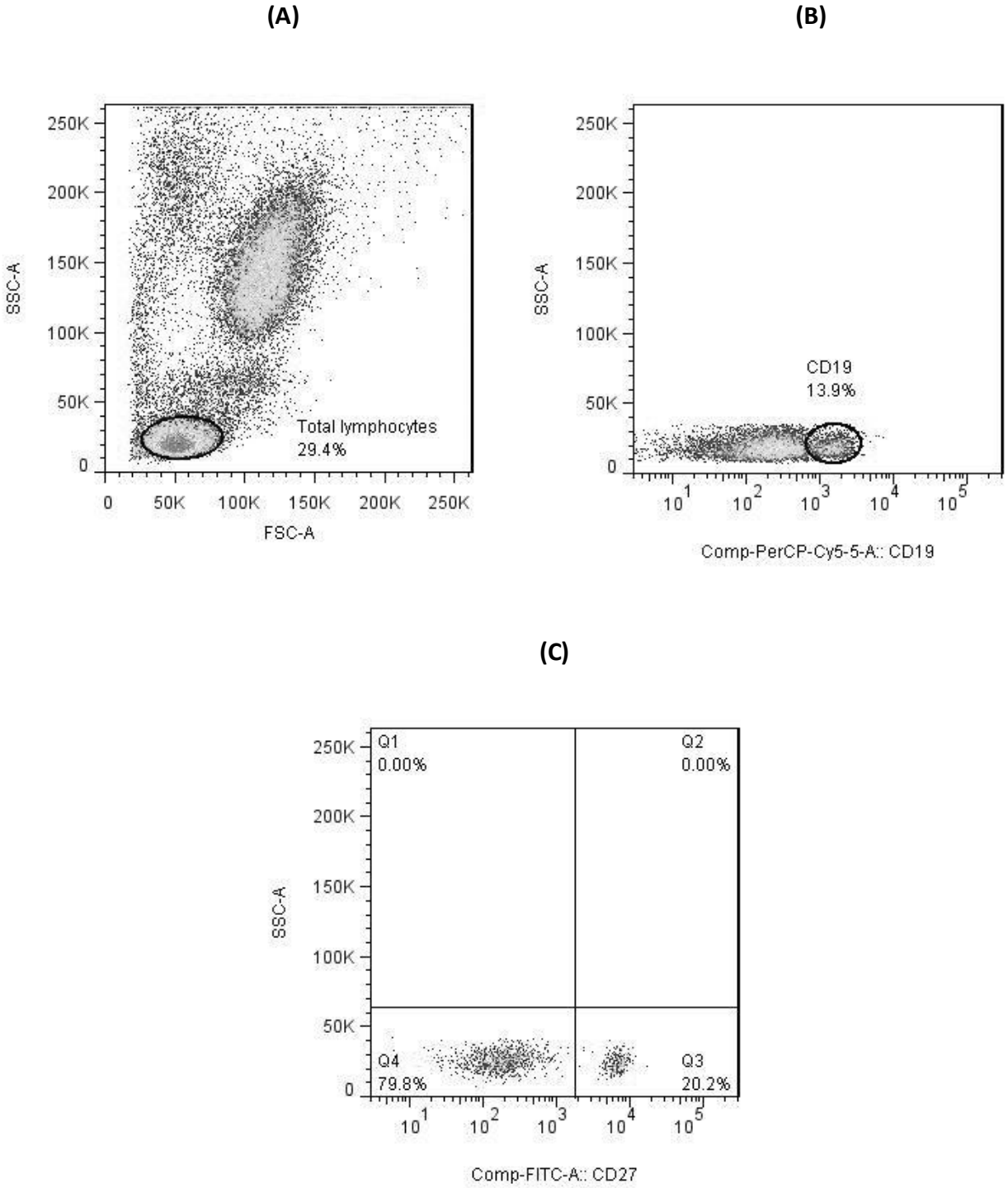


Figure 4. Representative characterization of B cell subsets by flow cytometry. (A) Total lymphocyte population was identified based on forward (FSC) and side (SSC) scatter characteristics. (B) B cells were identified by gating on CD19-positive cells within the total lymphocyte population. (C) Naïve and memory B-cell subsets were identified based on the expression of CD27 within $CD19^{+}$ cells as shown.