

AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DE CÉLULAS T, B E NK EM RECÉM-NASCIDOS A TERMO E PRÉ-TERMO

EVALUATION OF T, B AND NK CELLS PHENOTYPIC PROFILE IN FULL-TERM AND PRETERM NEWBORNS

Dante Aguacã Accioly Pereira da Silva

Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC-CNPq/IMIP) 2013. Acadêmico do curso de Medicina Faculdade Pernambucana de Saúde. Recife, PE. Brasil.

Renato Tenorio de Castro Macêdo Júnior

Acadêmica do curso de Medicina. Faculdade Pernambucana de Saúde. Recife, PE. Brasil.

Henrique Ferreira Wagner

Acadêmico do curso de Medicina. Faculdade Pernambucana de Saúde. Recife, PE. Brasil.

Leuridan Cavalcante Torres

Biomédica, Doutora em Imunologia pela USP. Pesquisadora da pós-graduação *IMIP*.

Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP. Recife, PE. Brasil.

José Roberto da Silva Junior

Fisioterapeuta, Doutorando em Saúde Materno Infantil (IMIP). Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP. Recife, PE. Brasil.

João Guilherme Bezerra Alves¹

Médico, Doutor em Medicina (UFPE). Pesquisador da pós-graduação *IMIP*. Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP. Recife, PE. Brasil.

Fontes de auxílio:

CNPq: Bolsa de Iniciação Científica

Facepe: Bolsa de Doutorado

Autor responsável pela troca de correspondência.

RESUMO

Introdução: O desenvolvimento adequado do componente celular do sistema imune adquirido durante a gestação pode ser influenciado pela duração da mesma. Esse desenvolvimento pode ser avaliado ao nascer através da análise citológica quantitativa e qualitativa das células do sistema imune pela citometria de fluxo, capaz de quantificar as subpopulações e analisar suas características físicas, químicas e biológicas. **Objetivo:** O estudo teve como objetivo buscar valores de referência para células T, B e NK em recém-nascidos a termo. Além disso, os valores obtidos das 38 amostras de RNs a termo foram comparadas com as 8 amostras de RNs pré-termo, a fim de determinar se havia, ou não, diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. **Métodos:** Foram obtidas amostras de sangue de 46 recém-nascidos saudáveis, sendo 38 a termo e 8 pré-termo, sendo as mesmas submetidas à lise de hemácias, lavagem com solução salina, centrifugação com descarte do sobrenadante e adição de anticorpos monoclonais conjugados a fluoróforos. Posteriormente foi realizada a aquisição dos grupos celulares de cada amostra através de um citômetro de fluxo, por meio de uma análise por *software* e determinação dos valores percentuais de células T, B e NK em relação ao total de linfócitos, sendo ,então, calculados os valores absolutos dos grupos celulares e, posteriormente, feita uma comparação entre os grupos de recém-nascidos a termo e pré-termo. **Resultados:** Foram determinados os valores de referência das subpopulações de células T, B e NK para recém-nascidos a termo e realizou-se uma análise comparativa entre os valores de referência de recém-nascidos a termo e pré-termo, a qual não mostrou diferenças estatisticamente

significantes, apesar de os valores para os percentis 25 e 75 das medianas terem apresentado uma ligeira predominância para as células T CD4+ e CD8+, B e NK no grupo dos recém-nascidos a termo. **Conclusão:** Os valores de referência encontrados para recém-nascidos a termo foram, em sua maioria, similares aos encontrados na literatura. Ademais, o estudo concluiu que os resultados obtidos revelam uma pequena diferença entre os valores para recém-nascidos a termo e pré-termo, porém, devido ao tamanho limitado da amostra, não se pode afirmar se há, ou não, uma diferença significativa entre esses dois grupos.

Palavras-chave: linfócitos B; linfócitos T; células NK; recém-nascidos; citometria de fluxo.

ABSTRACT

Introduction: The proper development of the cellular component of the acquired immune system during pregnancy may be influenced by its duration. This development can be evaluated at birth by quantitative and qualitative cytological analysis of immune cells by flow cytometry, which is able to quantify and analyze the physical, chemical and biological characteristics of the immune cells subpopulations. **Objective:** The study aimed to look for reference values for T, B and NK cells in newborns at term. Furthermore, the values of 38 newborn term samples were compared with 8 preterm newborn samples, in order to determine whether there was or not statistically significant differences between these groups. **Methods:** Blood samples of 46 healthy newborns were obtained, with 38 full-term and 8 preterm, which were subjected to lysis of red blood cells, washing with saline, centrifuging and discarding the supernatant with addition of conjugated monoclonal antibodies fluorophores. Subsequently, the acquisition of cell groups from each sample was performed using a flow cytometer, using analysis software and determination of the percentage values of T, B and NK cells regarding the percentage of total lymphocytes, and then calculated the absolute values of cell groups and then made a comparison between groups of full-term and preterm newborns. **Results:** We determined the reference values of the subpopulations of T, B and NK cells for newborns at term and carried out a comparative analysis between reference values of newborns at term and preterm, which showed no statistically significant differences, although the values for the 25th and 75th percentiles of the medians have showed a slight predominance of T CD4+ and CD8+, B and NK cells in the group of term newborns. **Conclusion:** Reference values found for

newborns at term were mostly similar to those found in the literature. Furthermore, the study concluded that the results show a small difference between the values for newborns at term and preterm, however, due to limited sample size, we cannot say if there is or not a significant difference between these two groups.

Key words: lymphocytes T; lymphocytes B; NK cells; newborn; flow cytometry.

I. INTRODUÇÃO

O sistema imunológico ou imune tem como uma das principais funções a defesa do organismo contra processos infecciosos. Esse sistema começa a se desenvolver na fase embrionária e continua o seu desenvolvimento até a idade adulta. Por exemplo, por volta da oitava semana, pode-se encontrar, no fígado e no timo do feto, precursores de células T. Entre a 12^a e 17^a semanas, são encontradas, no sangue, baço, fígado e timo, células T CD4+ e CD8+. No último trimestre, há um pico de produção tímica de linfócitos T. Portanto, acredita-se que qualquer alteração importante durante a gestação possa acarretar deficiências qualitativas e quantitativas significativas no sistema imunológico^[1].

As células do sistema imune desempenham as mais diversas funções conhecidas. Os linfócitos T, por exemplo, são células especializadas que, após receberem o estímulo das células apresentadoras de antígeno e serem ativados, iniciam a sua resposta a novos antígenos por meio da produção de citocinas que amplificam e regulam os múltiplos aspectos da resposta imunológica^[2]. Além das funções efetoras, essas citocinas participam de efeitos-chave para a proliferação de células NK, monócitos, linfócitos B e na proliferação dos próprios linfócitos T. Subdividem-se os linfócitos T em vários subtipos, de acordo com seus marcadores de superfície e a sua produção de citocinas^[1]. As duas maiores subpopulações de linfócitos T importantes para a imunidade específica são os linfócitos CD4+, ou helper, e os linfócitos CD8+, ou citotóxicos. As células CD4+ têm a função de ativar macrófagos e de estimular os linfócitos do tipo B a produzirem anticorpos. A população de células CD8+, em conjunto com as células NK, medeia a maioria das

atividades citotóxicas contra células infectadas com vírus ou células tumorais. Os linfócitos B, por sua vez, são importantes células apresentadoras de antígenos e sua função mais notória é a produção de anticorpos em resposta a antígenos externos^[3]

Entretanto, não há, no Brasil, valores de referência definidos para recém-nascidos (RNs), e, no mundo, são poucos os que determinam as quantidades de células T, B e NK no sangue do cordão do RN. Um estudo polonês revelou que podem ser encontrados cerca de $3.800 \times 10^9/L$ linfócitos no sangue do cordão de um RN a termo. Com isso, pouco se sabe ainda sobre os valores de referência dessas células na população brasileira e se há alguma diferença entre RNs a termo e pré-termo^[4].

Para análise do perfil fenotípico dos linfócitos B, linfócitos T CD4+ e CD8+ e células NK em recém-nascidos tem sido utilizada a técnica de citometria de fluxo ^[5], um método útil para determinar e quantificar os subtipos celulares por meio da utilização de anticorpos monoclonais específicos para os marcadores de superfície de cada tipo celular^[8]. Esse método permite a avaliação de características físicas, químicas e biológicas de vários tipos celulares (humanas e outros seres vivos), previamente preparados e marcados, como já dito anteriormente, com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, com afinidade por determinada molécula de interesse. Esses fluorocromos são excitados por uma radiação laser e emitem um comprimento de onda (cor) que é detectado por um sensor, chamado de fotomultiplicador (PMT), capaz de converter a luz captada em sinais eletrônicos, que são enviados ao computador, possibilitando, através de um *software* específico, uma análise multiparamétrica para obtenção dos resultados. Esta análise é

realizada através de representações gráficas da intensidade de fluorescência emitida pelo fluorocromo e as respectivas características morfológicas das células^[8].

Dessa forma, o presente estudo realizou uma análise dos grupos células T, B e NK em RN a termo e pré-termo através da citometria de fluxo, para determinar quais os valores dessas células no sangue do cordão umbilical.

II. METODOLOGIA

Realizou-se um estudo do tipo corte transversal com componente analítico. Foram incluídas na pesquisa recém-nascidos cujo parto foi assistido no Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), instituição vinculada à rede pública de saúde da cidade do Recife, Nordeste, Brasil, no período de setembro a dezembro de 2013.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do IMIP e seguiu as normas estabelecidas pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Para inclusão na pesquisa, as gestantes ou responsáveis pelo recém-nascido assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foi considerado para o estudo: RN com boas condições de vitalidade ao nascimento (Apgar > 7 no 5'). Foram analisados recém-nascidos prematuros (<37 semanas) e a termo (37 até 41semanas e 6 dias). Foram excluídos do estudo: RN portadores de malformações; RN portadores de doenças metabólicas; RN com evidências de infecção congênita.

Após o consentimento foi realizado um questionário para caracterização da amostra e em seguida, foram colhidas as amostras do sangue do cordão umbilical dos recém-nascidos incluídos na pesquisa e realizada a análise das amostras através da técnica de citometria de fluxo descrita abaixo.

Imunofenotipagem de células T, B e NK pela Citometria de Fluxo.

Em alíquota de 100 μ L de amostra de sangue periférico foi adicionado 2ml de solução de lise de hemácias 1x concentrada (BD Pharm Lyse™, BD

Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA) que foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. Para lavagem das células, foi adicionado 2 mL de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) 1X concentrado (pH 7,4), centrifugado a 2000 RPM por 5 minutos a 10 °C em centrífuga Universal 320R (Hettich, Germany), e descartado o sobrenadante.

Em seguida, foram adicionados os anticorpos monoclonais conjugados a fluoróforos (BD, Pharmingen®, San Diego, CA) e as amostras foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz. Os anticorpos utilizados são descritos na Tabela 1. Após incubação, foram realizadas mais duas etapas de lavagem.

A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo (FACSverse®, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Foram adquiridos 20.000 eventos celulares e as análises dos resultados foram realizadas com o programa BD FACS SUITE™ ou BD FACSDIVA™ (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e expressas em valores percentuais, através da utilização de *dotplots* para análise das subpopulações de linfócitos marcados. Inicialmente, a população de linfócitos foi selecionada através de um *gate* aplicado ao *dotplot* cujos parâmetros dispõem as células de acordo com seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), como mostra a imagem 1. Posteriormente, os linfócitos T foram selecionados através do *dotplot* que utiliza como parâmetros a granulosidade e a presença de receptores celulares CD3 (imagem 2), tendo sido o mesmo feito para seleção de linfócitos CD4+ (imagem3), linfócitos CD8+ (imagem 4), linfócitos B (imagem 5) e linfócitos B CD27+ de memória (imagem 6). Os resultados dos percentuais dos pacientes foram comparados aos valores de referência para faixa etária ou comparados aos dos indivíduos controle saudáveis.

Tabela 1 – Anticorpos utilizados na imunofenotipagem de células T, B e NK

Painel 1 – CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD28⁺, CD8⁺CD28⁺	
CD4	FITC
CD28	PE
CD3	PerCP
CD8	PE-Cy7
Painel 2 – CD3⁺CD4⁺CD62L⁺	
CD3	FITC
CD4	PE
CD62L	PE-Cy5
CD45RO	PE-Cy7
Painel 3 – CD3⁺CD8⁺CD62L⁺	
CD3	PE
CD8	FITC
CD62L	PE-Cy5
CD45RO	PE-Cy7
Painel 4 – CD20⁺, CD20⁺CD27⁺	
CD20	FITC
IgM	PE
IgD	PerCP-Cy5.5
CD27	PE-Cy7
Painel 6 – CD3⁻CD16⁺CD56⁺	
CD3	FITC
CD16	PE
CD56	PE-Cy5

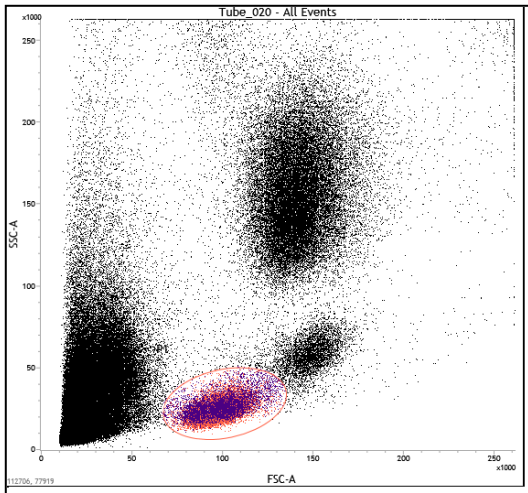


Imagem 1 – Determinação do *gate* de linfócitos T e B e de células NK.

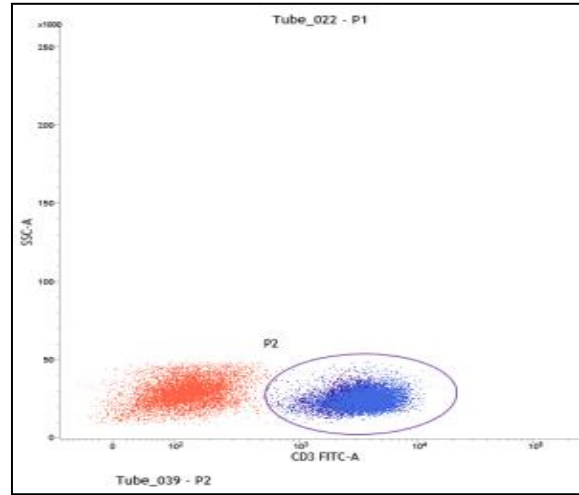


Imagem 2 - Determinação do *gate* de linfócitos T.

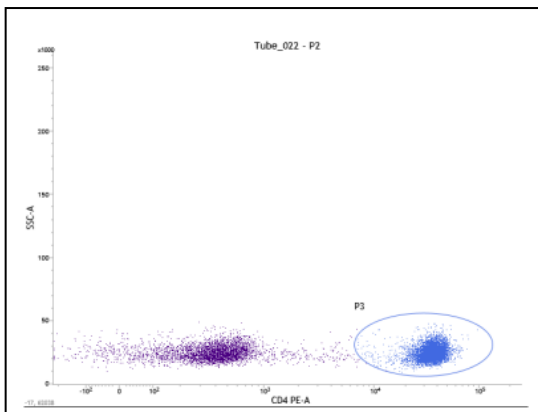


Imagem 3 – Determinação do *gate* de linfócitos T CD4+.

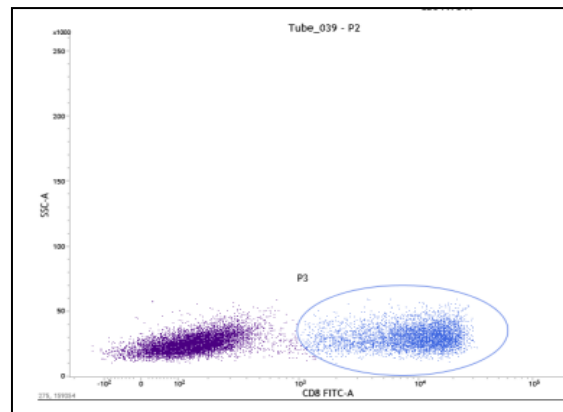


Imagem 4 – Determinação do *gate* de linfócitos T CD8+.

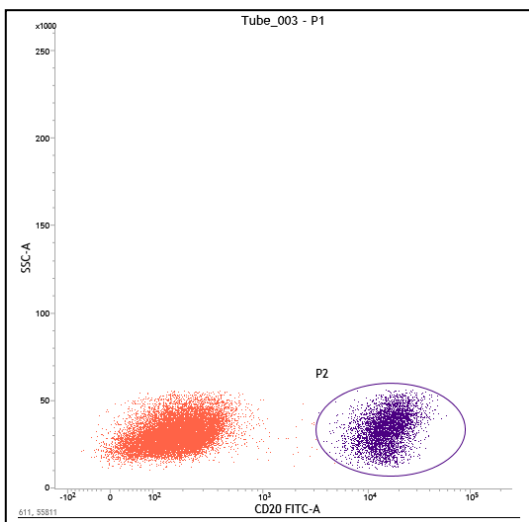


Imagem 5 – Determinação do *gate* de linfócitos B.

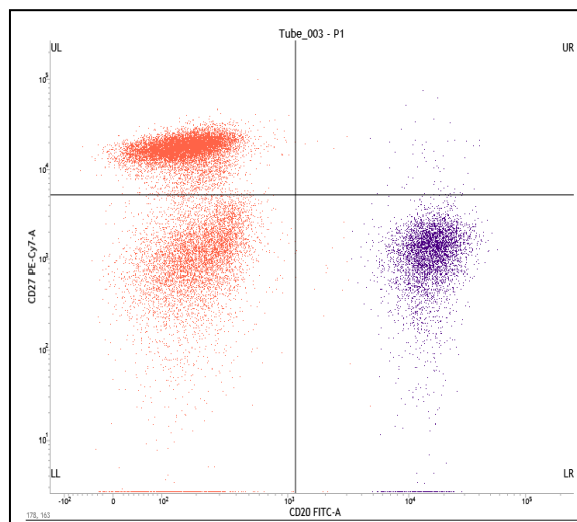


Imagem 6 – Determinação da população de linfócitos B CD27+ (memória).

Cálculo do valor absoluto das subpopulações de linfócitos

Através da coleta de dados na citometria de fluxo, foi obtido o número percentual de cada célula (CD3+,CD4+, CD8+, CD20+, CD27+, CD3- e CD1656+) no sangue do cordão umbilical de cada RN. Pelo hemograma foi obtido o número de total de leucócitos. Através disso, foi obtido o número total de linfócitos que está representa na imagem 1. Através do número total de linfócitos foi retirado o percentual de T(imagem 2). Através do percentual de células T foram retirados os valores de CD4+(imagem 3) e CD8+(imagem 4). Através do número total de linfócitos foi retirado o percentual de células CD20+(imagem 5). Para adquirir o número absoluto de linfócitos foi retirado seu percentual do número total de leucócitos obtidos no hemograma. Para adquirir o número de células CD3+ foi retirado seu percentual do número absoluto de linfócitos. Para se obter o número de células CD4+ e CD8+ foram retirados seus percentuais do número total de linfócitos CD3+. Para se obter o número total de linfócito CD20+ foi retirado seu percentual do número do número total de linfócitos. Para se obter o número total de CD16/56+ foi retirado do número absoluto de CD3- o qual teve seu número absoluto retirado dos linfócitos totais.

Análise dos dados

A análise de dados foi realizada usando o programa estatístico Stata ®13 e *GraphPad Software*. Inicialmente foram obtidas medidas de distribuição de frequência para as variáveis categóricas e calculadas medidas de tendência central e de dispersão para as variáveis numéricas. A amostra foi não paramétrica, sua normalidade foi calculada através do teste de Kolmogov-Smirnov, dessa forma, para comparação de médias foi utilizado o teste de

Mann-Whitney. Adotou-se um nível de significância de 5% e todos os valores de p foram bicaudados.

III. RESULTADOS

A população do estudo foi composta por 46 recém-nascidos, sendo 38 a termo e oito pré-termos; os recém-nascidos não apresentaram histórico de infecção durante a gestação, bem como nenhuma malformação congênita. A contagem dos linfócitos T e B foi calculada em valores absolutos e relativos, sendo os valores absolutos utilizados para a análise comparativa entre os dois grupos. Esses valores absolutos são apresentados nas tabelas 2 e 3. Não houve diferença estatística entre os grupos para as variáveis avaliadas ($p>0,05$).

Tabela 2 – Valores de referência para linfócitos T em recém-nascidos a termo comparados com os valores dos linfócitos T em recém-nascidos pré-termo.

Valores de Referência	Pré-termo CD3+ (N=8)	Termo CD3+ (N=38)	Pré-termo CD4+ (N=8)	Termo CD4+ (N=38)	Pré-termo CD8+ (N=8)	Termo CD8+ (N=37)
Mínimo	2491,36	3144,15	1315,4	1748,1	433,0	686,0
Percentil 25	3666,55	4330,87	2495,2	2908,93	953,0	1010,8
Mediana	5278,24 ^a	5981,79 ^b	3846,9 ^c	4078,45 ^d	1256,55 ^e	1444,9 ^f
Percentil 75	6361,22	7168,57	4321,4	5113,97	1829,18	1864,6
Máximo	7826,25	10853,9	4484,4	7252,0	2954,4	3172,6

a=b; c=d; e=f. Teste de *Mann-Whitney* ($p>0,05$).

Tabela 3 – Valores de referência para Linfócitos B e Células NK em recém-nascidos a termo e pré-termo.

Valores de referência	Pré-termo CD20+ (N= 8)	Termo CD20+ (N=38)	Pré-termo CD16/56+ (N=8)	Termo CD16/56+ (N=38)
Mínimo	378,73	223,36	146,0	156,0
Percentil 25	696,453	840,813	337,75	591,75
Mediana	1304,94 ^a	1291,62 ^b	459,0 ^c	767,5 ^d
Percentil 75	1758,84	1722,71	1058,25	1310,0
Máximo	2039,82	2958,27	1448,0	2916,0

a=b; c=d. Teste de *Mann-Whitney* ($p>0,05$).

IV. DISCUSSÃO

O sistema imune é indispensável no que diz respeito ao combate de agentes exógenos causadores de doenças e também está relacionado a muitas outras patologias, como as doenças autoimunes e as neoplasias. Assim sendo, a maturação desse sistema é um fenômeno indispensável à vida do ser humano, uma vez que qualquer alteração nesse processo pode culminar em uma deficiência imunológica do indivíduo^[3].

Os recém-nascidos, principalmente os que nasceram prematuramente, estão entre a faixa etária mais vulnerável para a morbidade e mortalidade devido a infecções. A imaturidade do sistema imune inato e uma elevada necessidade de procedimentos médicos invasivos, no contexto de um parto prematuro faz o RN tornar-se altamente suscetíveis a patógenos neonatais comuns. Os prematuros que sobrevivem também podem sofrer deficiências permanentes devido a danos em órgãos, resultante quer da própria infecção ou a partir da resposta inflamatória gerada sob um estresse oxidativo. Infecções em recém-nascidos prematuros continuam a representar desafios importantes de saúde. No entanto, os eventos de maturação do sistema imune inato que fundamentam sua excessiva alta vulnerabilidade à infecção necessitam de mais estudos^[6].

Levando-se em conta a importância do sistema imune na saúde dos seres humanos, faz-se necessário um maior conhecimento a respeito de como esse sistema se organiza nos primeiros momentos da vida. Existem poucos estudos a respeito dos valores de referência para células do sistema imune na

literatura atual, o que dificulta a determinação dos valores de normalidade em recém-nascidos.

Em um estudo que avaliou as alterações do perfil fenotípico de linfócitos em recém-nascidos prematuros com ou sem infecção, a partir de amostras de sangue de cordão umbilical no momento do parto, através de anticorpos monoclonais de duas cores e citometria de fluxo, observou-se que a percentagem de linfócitos T (CD3+) foi significativamente mais baixa nos prematuros que apresentavam alguma infecção. A percentagem de ambos os linfócitos T citotóxicos e auxiliares foi menor. A proporção de linfócitos T ativados, os linfócitos T citotóxicos, células NK e linfócitos B não foi diferente entre o grupo de recém-nascidos prematuros infectados e não infectados. A percentagem de linfócitos T de memória auxiliar (CD45RO+ e CD4+) foi muito baixa em recém-nascidos prematuros, independentemente de apresentarem ou não infecção, não podendo ser utilizado como um marcador de infecção bacteriana nesta idade^[7].

Diante da falta de conhecimento a respeito desse tema, desenvolvemos um estudo que buscou determinar os valores de referência para algumas das principais células do sistema imune e estabelecer se há diferença na contagem dessas células entre os RN que nascem a termo ou prematuro. Para tal, fizemos a determinação dos valores absolutos de linfócitos T CD4+ e CD8+, de linfócitos B e de células NK e comparamos entre os grupos. Os valores foram determinados em números absolutos para células T CD4+ e CD8+, células B e células NK. Os valores das células CD8+, CD4+, CD20+ e CD16/56+ foram semelhantes aos achados em outras populações, como em estudos realizados na Coreia do Sul e na Polônia^{[4],[10]}.

Apesar de os resultados entre os estudos apresentarem algumas divergências nos valores encontrados, elas podem representar uma diferença normal entre as populações dos estudos, haja vista as diferentes etnias e sociedades estudadas para chegar a esses valores. Assim, o estudo realizado pode ser considerado um início na busca para se determinar valores de referência para recém-nascidos a termo da população brasileira, mais especificamente do nordeste brasileiro. Contudo, mais estudos a respeito desse tema são necessários a fim de consolidar valores de referência de recém-nascidos a termo para utilização clínica.

Por outro lado, a análise comparativa entre os valores de referência de recém-nascidos a termo e pré-termo não se mostrou com diferenças estatisticamente significantes. Entretanto, notou-se que os valores para os percentis 25 e 75 e para a mediana foram, na quase totalidade das análises, maiores no grupo dos RNs a termo do que no grupo dos RNs pré-termo^[9]. Esses achados corroboram com a ideia de que, quanto maior a idade gestacional, maior o tempo disponível para o desenvolvimento do sistema imune e, conseqüentemente, maior o número absoluto de células formadas até o nascimento^[3].

Em relação às limitações do estudo, houve uma amostragem com tamanho limitado (n=46), principalmente com relação aos recém-nascidos pré-termo (n=8) devido a dificuldade de coleta em sangue do cordão umbilical, em comparação com a amostragem de RN a termo (n=36).

Dessa forma, sugerimos que estudos com amostras maiores sejam realizados para determinar os valores de referência das células avaliadas na

população em estudo, além de estabelecer se realmente há diferença ou não no número das subpopulações de linfócitos T, b e células NK entre os RN a termo e prematuros dando subsídios para diagnósticos clínicos na área da imunologia.

V. CONCLUSÃO

Os resultados do estudo são inconclusivos e não demonstraram diferenças significativas entre as populações T, B e NK de recém-nascidos a termo e pré-termo. Porém, como houve uma ligeira predominância de células imunes no grupo dos recém-nascidos a termo, caso haja uma amostra maior, pode ser que esses RNs apresentem uma quantidade maior dessas células em relação aos RNs prematuros e, conseqüentemente, possuam uma maior capacidade de resposta às infecções. Essas suposições só poderão ser confirmadas com a realização de outros estudos a respeito da determinação dos valores de células T CD4+ e CD8+, B e NK em recém-nascidos a termo e pré-termo.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sompayrac L. How the immune system works. 1st ed. Malden, MA: Blackwell Science, Inc.; 1999
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. General properties of immune response: cellular and molecular immunology. 3rd ed. Philadelphia: Abbas, AK; 1997. p. 4-33
3. Mussi-Pinhata MM, Rego MA. Particularidades imunológicas do pré-termo extremo: um desafio para a prevenção da sepse hospitalar. *J Pediatr (Rio J)*. 2005;81(1 Supl):S59-S68.
4. Piątosza B, Wolska-Kus´nierz B, Pac M, Siewiera K, Gałkowska E, Bernatowska E. B cell subsets in healthy children: Reference values for evaluation of B cell maturation process in peripheral blood. *Cytometry Part B* 2010; 78B: 372–381.
5. Quinello C¹, Silveira-Lessa AL, Ceccon ME, Cianciarullo MA, Carneiro-Sampaio M, Palmeira F. Phenotypic differences in leucocyte populations among healthy preterm and full-term newborns. *Scand J Immunol*. 2014 Jul;80(1):57-70. doi: 10.1111/sji.12183.
6. 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 Oct;145(1):61-8.
7. Juretić E, Juretić A, Uzarević B, Petrovecki M. Alterations in lymphocyte phenotype of infected preterm newborns. *Biol Neonate*. 2001;80(3):223-7.
- 8 . Instituto Oswaldo Cruz – Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular & Pós-Graduação em Biologia Parasitária – 2010.

9. Alergia e Imunologia na Criança e no Adolescente – João Guilherme Bezerra Alves e Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho.

10. Distribution of CD4+CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory T-cells in umbilical