

# Produção deficiente de citocinas Th1 em camundongos BALB/c jovens

Pelizon, A.C.<sup>1</sup>; Denadai, B.<sup>1</sup>; Schiavon, E.V.<sup>1</sup>; Martins, D.R.<sup>1</sup>; Zorzella, S.F.G.<sup>1</sup>; Sartori, A.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

Recebido 17/07/07 / Aceito 21/11/07

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi comparar a produção de IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-4 entre camundongos jovens (5, 12 e 19 dias de idade) e adultos (30 dias de idade). As avaliações foram feitas por estimulação, *in vitro*, de células esplênicas com Concanavalina A (ConA), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e lipopolissacarídeo (LPS). Diferentes concentrações de cada estímulo foram testadas e os sobrenadantes das culturas foram coletados após 48 horas de incubação e as concentrações de IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-4 determinadas por ELISA. Células de camundongos jovens e adultos produziram níveis igualmente elevados de IFN- $\gamma$  após estímulo com ConA. Somente animais adultos produziram IFN- $\gamma$  em resposta ao estímulo com *S. aureus*. Em culturas estimuladas com LPS, a produção desta citocina foi baixa e similar nos animais jovens e significativamente elevada nos animais adultos. Somente células de animais adultos estimuladas com *S. aureus* foram capazes de produzir IL-12. O único estímulo capaz de induzir níveis detectáveis de IL-4 foi ConA, sendo que estes níveis foram mais elevados nos animais com 12 e 19 dias de idade em comparação com animais neonatos e adultos. A diminuição das doses ótimas dos estímulos não mudou o perfil de produção de cada citocina nos animais jovens. Estes resultados permitem concluir que a idade afeta a produção de citocinas: ocorre maior produção de IL-4 em camundongos jovens e maior produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  em animais adultos. Estas informações são importantes devido ao papel destas citocinas na polarização das respostas imunes nos sentidos Th1 e Th2.

*Palavras-chave:* camundongo; citocina; interferon-gama; interleucina-4; interleucina-12.

## INTRODUÇÃO

A caracterização de subpopulações de células T helper é considerada um avanço indiscutível na imunologia moderna. Mosmann et al. (1986), descreveram, pela primeira vez, a existência de duas subpopulações de células T helper (Th1 e Th2), definidas de acordo com perfis distintos de

secreção de citocinas. Células Th1 favorecem o desenvolvimento de resposta imune celular, estão envolvidas principalmente na defesa contra patógenos intracelulares e são caracterizadas pela secreção de IFN- $\gamma$  e linfotóxina. Por outro lado, células Th2 favorecem o desenvolvimento de resposta imune humoral, ativam a defesa contra patógenos extracelulares e são caracterizadas pela secreção de IL-4, IL-5 e IL-13 (Abbas et al., 1996; Gumy et al., 2004). Apesar da caracterização mais recente de outras subpopulações celulares tais como Th17 e T reguladoras, a contribuição fundamental das subpopulações Th1 e Th2 para as respostas imunes celular e humoral, respectivamente, continua sendo um dos paradigmas da imunologia (Romagnani, 2006). Linfócitos Th1 e Th2 se desenvolvem a partir de células precursoras virgens e vários fatores contribuem para esta diferenciação como, por exemplo, o tipo de célula apresentadora de antígeno, a natureza dos sinais co-estimulatórios, via e dose de administração do antígeno e presença de citocinas. Dentre estes sinais polarizadores para Th1 ou Th2, a contribuição do micro-ambiente de citocinas é considerado um fator crucial (Gumy et al., 2004). IL-12 é descrita como fator dominante na diferenciação de células Th1 a partir da célula virgem precursora T CD4+ (Trinchieri, 1995; Del Vecchio et al., 2007). Este comprometimento para Th1 é otimizado por IFN- $\gamma$  o qual aumenta a expressão de receptores para IL-12, além de inibir o desenvolvimento de células Th2 (O'Garra, 1998; Foulds et al., 2006). Por outro lado, a produção de IL-4 no início de uma resposta imune é descrita como fator indispensável para a polarização no sentido Th2 (Swain, 1993).

O período neonatal da vida é caracterizado por elevada suscetibilidade aos agentes infecciosos (Marshall-Clarke et al., 2000), a qual tem sido atribuída a várias diferenças entre o sistema imune do adulto e do neonato. As principais diferenças podem ser observadas nos componentes da imunidade inata (Levy, 2007), nas células apresentadoras de antígenos (Hunt et al., 1994; Velilla et al., 2006) e nos linfócitos B (Kovarik & Siegrist, 1998) e T (Buzby et al., 1996; Schultz et al., 2007). Deficiências também são descritas em monócitos, macrófagos, sistema complemento e citotoxicidade associada com células NK e outras células (Kovarik & Siegrist, 1998; Siegrist, 2007). Por causa destas diferenças, os neonatos foram considerados durante muito

\*Autor correspondente: Alexandrina Sartori - Departamento de Microbiologia e Imunologia - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista, UNESP - Distrito de Rubião Júnior s/n - CEP: 18618-000 - Botucatu - SP - Fone: (14) 3811-6240 - Fax: (14) 3815-3747 - e-mail: sartori@ibb.unesp.br

tempo como imunodeficientes. Entretanto, com a descoberta das subpopulações Th1 / Th2, ficou claro que a resposta mediada por células T em neonatos murinos não era deficiente, mas sim, preferencialmente direcionada para o padrão Th2 (Pertmer et al., 2001; Bot & Bona, 2002). Entre outras causas, tem sido constatado por estudos em neonatos murinos e humanos que esta diferenciação preferencial para Th2 se deve à baixa produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  e elevada produção de IL-4 (Siegrist, 2000; Satwani et al., 2005; Rose et al., 2007).

As implicações deste cenário imunológico para a vacinação pediátrica foram comprovadas em várias publicações. Estudos mostram que crianças vacinadas no decurso do primeiro ano de vida geralmente apresentam produção discreta de anticorpos (Marshall-Clarke et al., 2000). Além disto, relatos recentes indicam resposta Th1 reduzida em crianças vacinadas com vacinas virais atenuadas (poliomielite, sarampo e caxumba), em comparação com adultos imunizados (Gans et al., 2001).

Neste contexto, o objetivo desta investigação foi avaliar a produção de IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-4 por células esplênicas de camundongos jovens (5, 12 e 19 dias de idade) e compará-la com a produção destas citocinas por camundongos adultos (30 dias de idade). Estas informações contribuirão para um melhor entendimento da imunidade em neonatos. Além disto, estes resultados permitirão definir o período neonatal no qual ocorrem diferenças imunológicas importantes em comparação com o período adulto e, desta forma, possibilitarão uma utilização mais racional de camundongos como modelo para estudo de imunologia neonatal.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c machos e fêmeas (n = 4 - 6 animais) com 5 dias de idade (neonatos), 12 e 19 dias (jovens) ou com 30 dias de idade (adultos). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu. As condições de manutenção e manipulação dos animais foram aprovadas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (protocolo nº 319).

### Indução de citocinas

Os baços de animais jovens e adultos submetidos à eutanásia foram divulsionados e as suspensões celulares individuais foram lavadas com meio de cultura RPMI 1640. As culturas dos animais neonatos foram feitas com pool de células de cinco animais devido ao baixo número de células no baço dos mesmos. O sedimento celular foi coletado através de centrifugação a 1500 rpm durante cinco minutos e o número de células foi ajustado para  $5 \times 10^6$  / ml em meio RPMI 1640 contendo penicilina (100.000 U / ml) e 10% de soro bovino fetal. A suspensão celular foi distribuída em placas de cultura e os seguintes estímulos foram adicionados: Concanavalina A (tipo IV-S, Sigma), *S. aureus* (Pansorbin,

*S. aureus* Cowan I, Calbiochem-Behring Corp.) e LPS (*E. coli*, sorotipo 055:B5, Sigma). Os estímulos foram testados nas seguintes concentrações: ConA (0,1; 1,0 e 5,0  $\mu$ g / ml de cultura), *S. aureus* (1/2500; 1 / 5000 e 1/10000 - v / v) e LPS (0,1; 1,0 e 5,0  $\mu$ g / ml de cultura); após 48 horas de incubação a 37°C em ambiente contendo 5% de CO<sub>2</sub>, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -20°C para posterior dosagem de citocinas.

### Quantificação de citocinas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-12p70 e IL-4 foram avaliados utilizando os seguintes pares de anticorpos (captura e detecção) adquiridos da PharMingen: IFN- $\gamma$  (AN18 / C15.16), IL-12p70 (9A5 / C17.8) e IL-4 (11B11 / BVD6-24G2). Placas de 96 poços (Nunc) foram recobertas com solução contendo anticorpos de captura para as diferentes citocinas, diluídos 1:1000 em tampão fosfato de sódio (pH 9.0). As placas foram incubadas a 4°C, durante 12 h. Após cinco lavagens com solução PBS - Tween 20 (0,05%), foi adicionada a solução de bloqueio, constituída de PBS com 10% de soro bovino fetal, com incubação por uma hora, à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e incubadas durante 12 h, a 4°C, com as amostras e as respectivas curvas de citocinas, diluídas na base 2 em tampão PBS contendo 10% soro bovino fetal e 0,05% de Tween 20. As seguintes concentrações iniciais foram utilizadas para confecção das curvas: IFN- $\gamma$  (1250 pg/ml); IL-12 (625 pg/ml) e IL-4 (1250 pg/ml). Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-IFN- $\gamma$ , IL-12p70 ou IL-4 biotinizados, diluídos 1:1000 em tampão PBS contendo 10% de soro bovino fetal e 0,05% de Tween 20, durante uma hora, à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram incubadas com a solução AB (estreptoavidina + peroxidase) diluída 1:1000 segundo as instruções do fabricante (Dako, Carpinteria) durante 30 minutos, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e reveladas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30V (10  $\mu$ l) / ortofenilenodiamina - Sigma (0,01g) diluídas em 12,5 ml de tampão citrato-fosfato, a reação interrompida por adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 16% e a leitura realizada em 490 nm.

### Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados empregando-se o programa Graph Pad Software, 1993 (San Diego, CA, USA). Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguida de comparação pelo método de Tukey. Os resultados são mostrados como a média do grupo experimental  $\pm$  erro padrão médio (EPM). Valores com  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## RESULTADOS

### Produção de IFN- $\gamma$

A produção de IFN- $\gamma$  induzida por ConA tanto nas

culturas de animais jovens quanto adultos foi significativamente elevada. Apesar dos níveis observados nos animais jovens serem um pouco menores do que nos animais adultos, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Os resultados observados em neonatos foram similares aos dos animais jovens. Estes resultados são mostrados na Figura 1a. Ensaio com 1 e 0,1 µg de ConA /

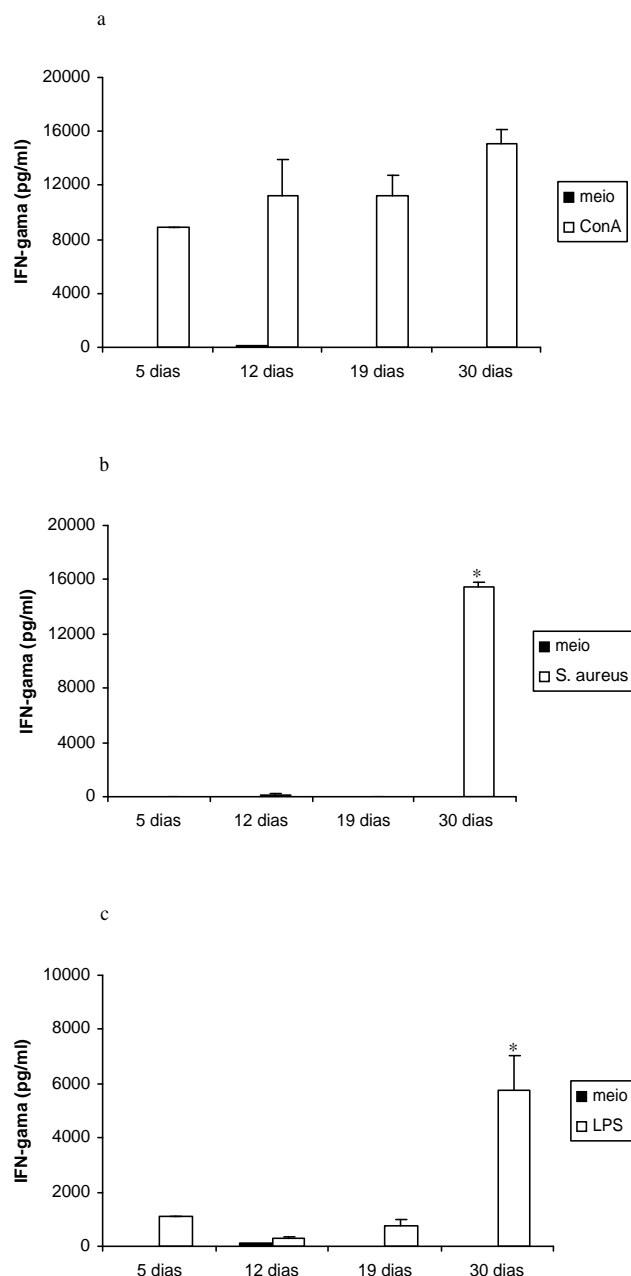


Figura 1. Produção de IFN- $\gamma$  por células esplênicas de camundongos BALB/c com 5, 12, 19 e 30 dias de idade, estimuladas com ConA (5 µg / ml de cultura) (a); *S. aureus* (1/5000 v / v) (b) ou LPS (5 µg / ml de cultura) (c). Após 48 h de incubação a 37°C / 5% CO<sub>2</sub> os sobrenadantes foram coletados e as concentrações de IFN- $\gamma$  determinadas por ELISA. Média de 4 - 6 animais  $\pm$  EPM. \* p< 0,05 em relação aos demais grupos experimentais.

ml de cultura não mudaram este perfil ou não induziram resposta, respectivamente (dados não mostrados). A produção de IFN- $\gamma$  induzida por *S. aureus* foi observada somente em animais adultos (Figura 1b). Ensaio com outras concentrações de *S. aureus* (diluições finais de 1:2500 e 1: 10000) não provocaram alteração deste perfil (dados não mostrados). Em culturas estimuladas com LPS, a produção desta citocina foi discreta e similar nos três grupos de animais jovens, incluindo os neonatos, e elevada, de forma significativa, nos animais adultos (Figura 1c). Ensaio com concentrações menores de LPS (1 e 0,1 µg / ml de cultura) não mudaram este perfil (dados não mostrados).

### Produção de IL-12

A indução de IL-12 só foi observada nas culturas estimuladas com *S. aureus* e os resultados apresentados na Figura 2 mostram claramente a produção desta citocina pelas células dos animais adultos, mas não pelas células dos neonatos ou jovens. Nas outras concentrações de *S. aureus* testadas (1/2500 e 1/10000) não foram observadas alterações deste perfil (dados não mostrados).

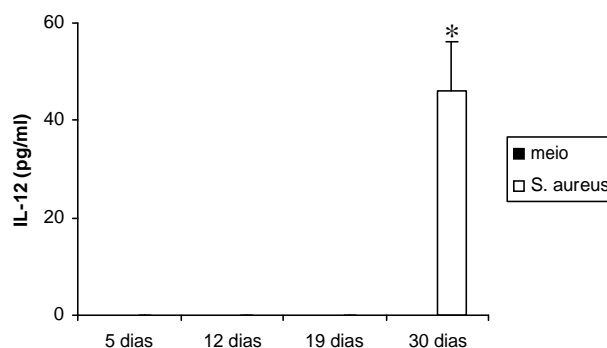


Figura 2. Produção de IL-12 por células esplênicas de camundongos BALB/c com 5, 12, 19 e 30 dias de idade, estimuladas com *S. aureus* (1/5000). Após 48 h de incubação a 37°C / 5% de CO<sub>2</sub>, os sobrenadantes foram coletados e as concentrações de IL-12 determinadas por ELISA. Média de 4 - 6 animais  $\pm$  EPM. \* p<0,05 em relação aos demais grupos experimentais.

### Produção de IL-4

O único estímulo que induziu níveis detectáveis de IL-4 foi a ConA. Estes resultados são apresentados na Figura 3 e mostram produção significativamente maior de IL-4 por células de camundongos jovens (19 dias) em comparação com células dos demais grupos. No 12º dia também foi observada produção maior de IL-4, mas não foi constatada diferença estatística com os demais grupos. A produção desta citocina foi similar nos neonatos e animais adultos.

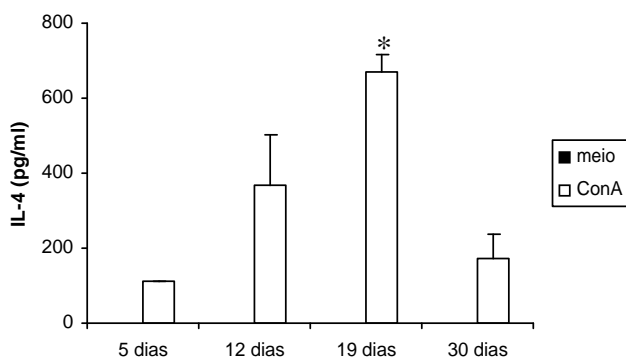


Figura 3. Produção de IL-4 por células esplênicas de camundongos BALB/c estimuladas com ConA (5 µg / ml). Após 48 h de incubação a 37°C / 5% de CO<sup>2</sup>, os sobrenadantes foram coletados e as concentrações de IL-4 determinadas por ELISA. Média de 4 - 6 animais ± EPM. \* p<0,05 em relação aos demais grupos experimentais.

## DISCUSSÃO

Neste estudo comparou-se a produção de IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-4 entre células de camundongos jovens, incluindo neonatos, e adultos. A relevância desta abordagem reside, em primeiro lugar, no papel fundamental que estas citocinas exercem na polarização das respostas imunes para Th1 e Th2 (Mosmann et al., 1986; Abbas et al., 1996; Gummy et al., 2004). Além disso, o sistema imune do neonato tem características peculiares que o distingue do sistema imune do adulto e que o torna mais suscetível às infecções (Clapp, 2006; Petrova & Mehta, 2007).

A produção de IFN- $\gamma$  foi testada após adição de diferentes estímulos: ConA, *S. aureus* e LPS. A produção de IFN- $\gamma$  induzida por ConA permite avaliar a capacidade geral de produção desta citocina, pois esta lectina se liga às glicoproteínas da superfície dos linfócitos T, ativando-os de forma policlonal. Quanto ao *S. aureus* e LPS, estes estímulos induzem produção de IFN- $\gamma$  por via indireta, ou seja, estimulam a produção de IL-12 que, por sua vez, ativa células natural killer (NK) e linfócitos T a produzirem esta citocina.

A produção esplênica de IFN- $\gamma$  em camundongos adultos e jovens, após estimulação com ConA, foi elevada e similar, não mostrando diferença estatística significativa entre os grupos. Este dado é coerente com a literatura, pois é descrito que ativadores policlonais, cuja atividade é independente dos TCR (T cell receptor), induzem níveis similares de IFN- $\gamma$  em adultos e neonatos (Adkins, 1999).

Diferentemente dos resultados observados com ConA, nas culturas estimuladas com LPS e *S. aureus*, a produção de IFN- $\gamma$  foi discreta ou ausente em animais jovens, incluindo os neonatos, e significativamente elevada nos animais adultos. A constatação de que neonatos murinos produzem baixa quantidade de IFN- $\gamma$  não é um achado novo, pois vários relatos descrevem esta deficiência (Pioli et al., 1998; Schaub et al., 2004). Entretanto, no presente estudo não só testou-se diferentes estímulos, como também avaliou-se três concentrações distintas de cada estímulo. A utilização

de três concentrações, sendo duas sub-ótimas para as células dos animais adultos, foi fundamental para comprovar a imunodeficiência e não um efeito artificial devido ao uso de dose inadequada do estímulo. Neste contexto, a expectativa era a de que animais jovens produzissem IFN- $\gamma$  ou IL-12 em resposta a doses menores do estímulo. Esta estratégia de redução da quantidade de antígeno tem sido um aspecto muito valorizado recentemente e que se tornou um marco na imunologia neonatal. Em resumo, este novo conceito preconiza que a resposta imune em animais neonatos é altamente maleável, sendo os mesmos capazes de montar respostas imunes semelhantes às de animais adultos, desde que as condições de exposição ao antígeno sejam adequadas (Forsthuber et al., 1996; Ridge et al., 1996; Sarzotti et al., 1996; Adkins et al., 2004). Sarzotti et al. (1996), demonstraram que o efeito da dose inicial de um retrovírus murino foi crítico para o desenvolvimento de resposta imune; dose elevada induziu resposta imune tipo Th2 não protetora, enquanto que dose baixa induziu imunidade protetora mediada por linfócitos T citotóxicos. Entretanto, na presente investigação, o uso de doses menores dos estímulos não alterou o padrão de produção deficiente de IFN- $\gamma$  e IL-12.

A indução de IL-12 só foi observada nas culturas estimuladas com *S. aureus*. Os resultados obtidos mostraram claramente a produção desta citocina pelos animais adultos, mas não pelos neonatos ou jovens. A baixa produção de IL-12 também é respaldada na literatura. Estudos realizados em camundongos e humanos demonstraram baixa produção desta citocina no período neonatal (Siegrist, 2000; Satwani et al., 2005). Recentemente, Byun et al. (2007), utilizando um modelo de infecção por listéria, cuja resposta imune protetora requer um fenótipo Th1, constataram que a maior suscetibilidade dos neonatos estava associada com baixos níveis de expressão dos componentes Th1, tais como IL-12, IFN- $\gamma$  e T-bet, em comparação aos níveis encontrados nos animais adultos. A relevância desta baixa produção de IL-12 é claramente demonstrada por relatos nos quais a administração neonatal de IL-12 aumenta a eficácia protetora de vacinas anti-virais (Arulanandam et al., 2000). Essa baixa produção de IL-12 é atribuída tanto à imaturidade das células dendríticas nos neonatos quanto a defeitos na expressão e função dos receptores do tipo Toll (TLRs) presentes na superfície de monócitos e macrófagos (Goriely et al., 2004; Maródi, 2006). É importante ressaltar que a baixa produção de IFN- $\gamma$  e a não produção de IL-12 foram observadas igualmente durante os três períodos avaliados (neonatos, 12 e 19 dias de vida) antes da fase adulta. Esta constatação traz uma consideração de caráter prático importante para os pesquisadores que utilizam camundongos como modelo experimental para estudos em imunologia neonatal. É comum o emprego de animais neonatos com até cinco dias de vida. A utilização destes animais traz algumas dificuldades, uma vez que podem ser rejeitados ou sacrificados pelas mães quando submetidos ao manuseio experimental. Além disso, alguns procedimentos, como por exemplo, os protocolos vacinais, normalmente requerem mais de uma dose antes da fase adulta. Neste contexto, consideramos que estes achados contribuem para uma utilização mais racional de

camundongos jovens como modelo para estudo de imunologia em neonatos e infantes. Estes animais poderiam ser utilizados, por exemplo, para estudos de efeito de boosters e também da adição de imunomoduladores. Apesar da relevância deste assunto, a literatura é escassa no que se refere à correspondência entre deficiências imunológicas observadas em camundongos jovens e em crianças (Adkins, 2005).

O único estímulo capaz de induzir produção de IL-4 foi ConA. A produção desta citocina foi similar e significativa em animais neonatos e adultos. Chama atenção, entretanto, o fato desta produção ser mais elevada nos animais com 12 e 19 dias de idade, comparativamente aos animais adultos. Em ampla revisão feita na literatura, não foram encontrados trabalhos sobre produção de IL-4 por camundongos empregando protocolo semelhante ao do presente estudo. Entretanto, investigações feitas com neonatos humanos mostraram produção aumentada de IL-4. Hartel et al. (2005), observaram maior nível de expressão de IL-4, IL-5 e IL-10 em neonatos e crianças do que em adultos. Zhang et al. (2005), avaliando níveis séricos de citocinas em prematuros humanos, constataram aumento seguido de queda aos 14 e 28 dias após o parto, respectivamente.

No seu conjunto, as características da produção de citocinas nos animais jovens, que incluíram maior produção de IL-4, produção discreta de IFN- $\gamma$  e ausência de IL-12, são compatíveis com o fato de que neonatos não são imunodeficientes, mas sim direcionados para um padrão Th2.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro dado a este trabalho.

## ABSTRACT

*Deficient production of Th1 cytokines in young BALB/c mice*

**In this paper we compare cytokine production (IFN- $\gamma$ , IL-12 and IL-4) by young (5, 12 and 19 days old) and adult (30 days old) BALB/c mice. Cultures of spleen cells isolated from these mice were stimulated with Concanavalin A (ConA), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and lipopolysaccharide (LPS); three different doses of each stimulus being tested. Culture supernatants were collected 48 h later and cytokine concentrations determined by ELISA. ConA induced similarly high IFN- $\gamma$  levels in cultures derived from both young and adult mice, but only adult animal cells produced IFN- $\gamma$  after stimulation with *S. aureus*. On the other hand, LPS stimulation significantly raised IFN- $\gamma$  production in adults, while this cytokine remained at a low level in young mice. IL-12 production was induced only by *S. aureus* and only in adult cells. IL-4 production was only**

**observed in ConA-stimulated cultures, where its levels were similarly low in cells from 5- and 30-day-old mice but significantly higher in 12- and 19-day-old animal cultures. Addition of a smaller dose of each stimulus did not change the profile of cytokine production. We conclude from these results that cytokine production was affected by age: higher IL-4 production was observed in cells from young mice whereas higher IFN- $\gamma$  and IL-12 production was associated with adult animals. This information is highly relevant in that these cytokines are directly involved in Th1 / Th2 polarization.**

*Keywords:* mouse; cytokine; interferon-gamma; interleukin-4; interleukin-12.

## REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383:787-93.
- Adkins B. T cell function in newborn mice and humans. *Immunol Today* 1999; 20:330-5.
- Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nature Rev Immunol* 2004; 4:553-64.
- Adkins B. Neonatal T cell function. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40:5-7.
- Arulanandam BP, Mittler JN, Lee WT, O'Toole M, Metzger DW. Neonatal administration of IL-12 enhances the protective efficacy of antiviral vaccines. *J Immunol* 2000; 164:3698-704.
- Bot A, Bona C. Genetic immunization of neonates. *Microbes Infect* 2002; 4:511-20.
- Buzby JS, Lee SM, Van Winkle P, DeMaria CT, Brewer G, Cairo MS. Increased granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA instability in cord versus adult mononuclear cells is translation-dependent and associated with increased levels of a A + U-rich element binding factor. *Blood* 1996; 88:2889-97.
- Byun HJ, Jung WW, Lee JB, Chung HY, Sul D, Kim SJ, Park CG, Choi I, Hwang KW, Chun T. An evolution of the neonatal immune system using listeria infection model. *Neonatology* 2007; 92:83-90.
- Clapp DW. Development regulation of the immune system. *Semin Perinatol* 2006; 30:69-72.
- Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, Lotze MT, Wesa A, Parmiani G, Anichini A. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res* 2007; 13:4677-85.
- Forsthuber T, Yip HC, Lehmann PV. Induction of Th1 and Th2 immunity in neonatal mice. *Science* 1996; 271:1728-30.
- Foulds KE, Wu CY, Seder RA. Th1 memory: implications for vaccine development. *Immunol Rev* 2006; 211:58-66.

- Gans H, Yasukawa L, Rinki M, DeHovitz R, Forghani B, Beeler J, Audet S, Maldonado Y, Arwin AM. Immune responses to measles and mumps vaccination of infants at 6, 9 and 12 months. *J Infect Dis* 2001; 184:817-26.
- Goriely S, Van Lint C, Dadkhah R, Libin M, De Wit D, Demonte D, Willems F, Goldman M. A defect in nucleosome remodeling prevents IL-12(p35) gene transcription in neonatal dendritic cells. *J Exp Med* 2004; 199:1011-6.
- Gumy A, Louis JA, Launois P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *Int J Parasitol* 2004; 34:433-44.
- Hartel C, Adam N, Strunk T, Temming P, Muller-Steinhardt M, Schultz C. Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood. *Clin Exp Immunol* 2005; 142:446-53.
- Hunt DW, Huppertz HI, Jiang HJ, Petty RE. Studies of human cord blood dendritic cells: evidence for functional immaturity. *Blood* 1994; 84:4333-43.
- Kovarik J, Siegrist C. Immunity in early life. *Immunol Today* 1998; 19:150-2.
- Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:379-90.
- Maródi L. Innate cellular immune responses in newborns. *Clin Immunol* 2006; 118:137-44.
- Marshall-Clarke S, Reen D, Tasker L, Hassan J. Neonatal immunity: how well has it grown up? *Immunol Today* 2000; 21:35-41.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Gieddlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136:2348-57.
- O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998; 8:275-83.
- Pertmer TM, Oran AE, Madorin CA, Robinson HL. Th1 genetic adjuvants modulate immune responses in neonates. *Vaccine* 2001; 19:1764-71.
- Petrova A, Mehta R. Dysfunction of innate immunity and associated pathology in neonates. *Indian J Pediatr* 2007; 74:185-91.
- Pioli C, Pucci S, Barile S, Frasca D, Doria G. Role of mRNA stability in the different patterns of cytokine production by CD4+ cells from young and old mice. *Immunology* 1998; 94:380-7.
- Ridge JP, Fuchs EJ, Matzinger P. Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells. *Science* 1996; 271:1723-6.
- Romagnani S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 2006; 36:1357-66.
- Rose S, Lichtenheld M, Foote MR, Adkins B. Murine neonatal CD4+ cells are poised for rapid Th2 effector-like function. *J Immunol* 2007; 178:2667-78.
- Sarzotti M, Robbins DS, Hoffman PM. Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. *Science* 1996; 271:1726-8.
- Satwani P, Morris E, van de Ven C, Cairo MS. Dysregulation of expression of immunoregulatory and cytokine genes and its association with the immaturity in neonatal phagocytic and cellular immunity. *Biol Neonate* 2005; 88:214-27.
- Schaub B et al. TLR2 and TLR4 stimulation differentially induce cytokine secretion in human neonatal, adult and murine mononuclear cells. *J Interferon Cytokine Res* 2004; 24:543-52.
- Schultz C, Strunk T, Temming P, Matzke N, Hartel C. Reduced IL-10 production and - receptor expression in neonatal T lymphocytes. *Acta Paediatr* 2007; 96:1122-5.
- Siegrist CA. Vaccination in the neonatal period and early infancy. *Int Rev Immunol* 2000; 19:195-219.
- Siegrist CA. The challenges of vaccine responses in early life: selected examples. *J Comp Pathol* 2007; 137:54-9.
- Swain SL. IL-4 dictates T-cell differentiation. *Res Immunol* 1993; 144:616-20.
- Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:251-76.
- Velilla PA, Rugeles MT, Chougnet CA. Defective antigen-presenting cell function in human neonates. *Clin Immunol* 2006; 121:251-9.
- Zhang B, Ohtsuka Y, Fujii T, Baba H, Okada K, Shoji H, Nagata S, Shimizu T, Yamashiro Y. Immunological development of preterm infants in early infancy. *Clin Exp Immunol* 2005; 140:92-6.