Elaine Cristina Cardoso

**AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA MATERNO-INFANTIL DE ANTICORPOS
SÉRICOS E SECRETORES DIRIGIDOS AO POLISSACARÍDEO DA CÁPSULA DE
HAEMOPHILUS INFLUENZAE TIPO B (HIB) EM AMOSTRAS PRÉ E PÓS-
VACINAIS DE MÃES IMUNIZADAS COM PRP CONJUGADO AO TOXÓIDE
TETÂNICO (PRP-T)**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de Mestre em
Imunologia.**

Área de concentração: Imunologia

Orientadora:

Dra. Magda Maria Sales Carneiro-Sampaio

SÃO PAULO

2008

RESUMO

Cardoso EC. Avaliação da transferência materno-infantil de anticorpos séricos e secretores dirigidos ao polissacarídeo da cápsula de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) em amostras pré e pós vacinal de mães imunizadas com PRP conjugado ao toxóide Tetânico (PRP – T) [dissertação/dissertation de mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciencias Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008

Introdução: O *Haemophilus influenzae* type b (Hib) é a primeira maior causa de meningites e pneumonias provocadas por bactérias encapsuladas. Trabalhos revelam que anticorpos maternos, séricos e secretores, podem proteger recém nascidos (RN) destes patógenos encapsulados e contribuem para a maturação do sistema imune do infante. **Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo investigar a transferência materno-infantil de anticorpos anti-Hib em mães vacinadas e que não receberam a vacina anti-Hib. **Materiais e Métodos:** Nós avaliamos 29 mulheres saudáveis, das quais 13 foram vacinadas e 16 não receberam a vacina ActHib®. Destas mães foram obtidas amostras de sangue periférico e do cordão umbilical, colostro e leite, sendo determinadas as imunoglobulinas totais (IgG e IgA) e suas subclasses (IgG1 e 2) por Imunodifusão Radial Quantitativa (IDR) e nefelometria. A concentração de anticorpos IgG, as subclasses (IgG1 e 2) e IgA anti-Hib foram analisados por ensaio imunoenzimático (ELISA), também utilizado para determinar a avidéz dos anticorpos IgG e IgA anti-Hib. Avaliação qualitativa destes anticorpos foi realizada a partir de ensaios de immunoblotting (IB). **Resultados:** As amostras maternas de mães vacinadas não apresentaram diferenças quantitativas de imunoglobulinas secretoras (IgA), séricas (IgG) e suas subclasses (IgG1 e 2) totais, comparadas às amostras de mães que não receberam a vacina anti-Hib. O grupo vacinado mostrou maior concentração e avidéz de anticorpos específicos para o Hib quando relacionados ao grupo de mães não vacinado. Os soros de cordões umbilicais de mães imunizadas apresentaram menor taxa de passagem transplacentária que os cordões de mães não vacinadas. Em ambos os grupos, as amostras de colostro apresentaram maior concentração de imunoglobulinas totais e

específicas para o Hib que as amostras de leite. O IB revelou o mesmo padrão de reconhecimento antigênico para o Hib entre as amostras maternas, nas duas populações. **Conclusão:** Os resultados revelaram que o perfil de resposta humoral de mães vacinadas pode proteger mais o infante que as mães não vacinadas, pois o primeiro grupo transferiu maior quantidade de anticorpos com melhor avidéz para a criança, conferindo proteção eficaz com relação às doenças causadas por Hib.

Palavras-chave: *Haemophilus influenzae* tipo b; transferência placentária; colostro; leite; anticorpos; recém-nascido.

ABSTRACT

Cardoso EC. Avaliação de transferência materno-infantil de anticorpos séricos e secretórios reativos aos capsos polissacarídicos *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) em amostras pré e pós vacina de mães imunizadas com PRP conjugado com toxoide tetânico (PRP-T). [Tese de mestrado]. São Paulo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008

Background: *Haemophilus influenzae* type b (Hib) has been one of the major causes of bacterial meningitis and pneumonia. Recent works show that maternal, serum and secretory antibodies, may protect the newborn and contribute the maturation of the infant immune system. **Objective:** The present study has as aim to investigate the maternal-infantile transfer of anti-Hib antibodies in immunized and not immunized mothers' with anti-Hib vaccine. **Material and Methods:** We evaluated 29 healthy women, from which 13 mothers were immunized and 16 not immunized mothers with the ActHib® vaccine. From these mothers it were obtained peripheral and cord serum, colostrum and milk samples, the total immunoglobulin (IgG and IgA) and its subclass (IgG1 and IgG2) was determined by Quantitative Radial Immunodiffusion (IDR) and nephelometry. The concentration of anti-Hib IgG, subclass (IgG1 IgG2) and IgA antibodies were analyzed by immunoenzymatic assay (ELISA), it also were utilized to determine the antibodies avidities'. Qualitative evaluation these antibodies were determined by Immunoblotting assays (IB). **Results:** The results didn't show difference between maternal samples of the immunized and not immunized mothers in the concentration of the total secretory and serum immunoglobulins as well as its total immunoglobulins subclasses. The immunized set showed higher avidity and anti-Hib antibody levels comparing to the non-immunized mother sets. The umbilical cord serums' from immunized mothers revealed lower rate of placental transfer than the cord serum of not immunized mothers. In both sets, the colostrum sample showed higher antibody levels comparing to the milk samples. IB revealed the same recognition pattern of Hib antigens between mother and cord serum IgG and colostrum and milk IgA, in both populations. **Conclusion:** The results shows that the antibodies profile response of the immunized mother can protect more the infant than

the not immunized mother, because the first set transported higher quantity of antibodies with better avidity for the children, these antibodies confere an efficient protection to infections provoked by Hib.

Keywords: *Haemophilus influenzae* type b, Placental transfer, colostrums, Milk, Antibodies, Newborn.

1 Introdução

O *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) é um importante agente etiológico de infecções graves como meningite, pneumonia, sepse, endocardite, artrite, celulite, e epiglote (Mäkelä et al., 1992). Esta bactéria possui uma cápsula protetora, composta por polissacarídeos, que a protege da fagocitose, conferindo ao microrganismo maior resistência e patogenicidade. Tal patógeno acomete crianças até cinco anos de idade, principalmente, a faixa etária entre seis semanas a dois anos de vida (Funkhouser et al., 1991; Bijlmer, 1994).

A prevalência de doenças causadas pelo Hib nos menores de dois anos (Mäkelä et al., 1992; Gray e Dillon, 1986), ocasionou a elaboração de estudos relacionados à imunidade passiva materno-infantil, via transplacentária, e após o nascimento, pela amamentação. Durante a gestação, o puerpério e a lactação, a mãe oferece anticorpos que são fundamentais para adaptação do neonato no ambiente extra-uterino. A gestante transfere para o feto, por meio da placenta, anticorpos IgG e após o parto, durante a amamentação anticorpos IgA, além de outros fatores de resistência anti-infecciosa.

Os anticorpos transferidos para a criança durante a gestação e lactação são conseqüentes da resposta imunológica frente a antígenos, os quais a mãe entrou em contato ao longo de sua vida. Logo, durante os primeiros meses de vida do neonato, as imunoglobulinas maternas, adquiridas durante a transferência transplacentária e o aleitamento materno irão conferir ao infante, proteção contra agentes infecciosos, como o Hib.

1.1 *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib)

1.1.1 Histórico e epidemiologia do Hib

O *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) é um cocobacilo Gram-negativo, identificado por Pfeifer em 1852, o qual tem o homem como hospedeiro exclusivo. No final da década de 90, estimava-se que o Hib seria responsável por três milhões dos casos de doenças graves e de mortes anualmente (WHO, 1998). Nos Estados Unidos, a morbidade anual estimada em estudos de vigilância, antes do licenciamento da vacina em 1985, foi de 20.000 casos por ano. Em 1998, após a introdução da vacina, a morbidade foi de 61 casos de doença invasiva em crianças com menos de cinco anos de idade, representando o percentual de diminuição superior a 99% (American Academy of Pediatrics, 2000; Garpenholt et al., 1996).

A doença invasiva por Hib apresenta uma incidência maior nos países em desenvolvimento. Tal agente etiológico provoca infecções, principalmente, em crianças com idade inferior a 12 meses (Funkhouser et al., 1991; Bijlmer, 1994). O prognóstico da meningite por Hib foi pior nos países em desenvolvimento. Em Saharan, na África, 20 a 40% dos pacientes que chegam aos serviços de saúde morrem da doença, e proporção significativa dos sobreviventes evolui com seqüelas neurológicas (Bijlmer, 1994). A incidência de indivíduos que apresentaram colonização por Hib em nasofaringe foi maior e mais precoce nos países em desenvolvimento (Bijlmer et al., 1989).

No Brasil, entre 1987 a 1991, o Hib foi o principal agente identificado como causador de meningite bacteriana em crianças menores de cinco anos, sendo detectado em mais de 40% dos casos (Nery-Guimarães et al., 1981). Em 1991, o coeficiente de doença invasiva por Hib em crianças menores de cinco anos foi de 18,4 por 100.000 habitantes (Bouskela, 1995).

Após a introdução da vacina na rede pública, em julho de 1999, dados do Ministério da Saúde indicam diminuição dos casos notificados de meningite por Hib. A média anual de 1.548 casos, observada na década de 90, caiu para apenas 106 casos em todo o Brasil, no ano de 2000 (Ministério da Saúde, 2003).

1.1.2 Características do polissacarídeo da cápsula do *Haemophilus influenzae* tipo b (PS Hib).

O PS do Hib é um polímero constituído por duas moléculas de açúcar ribosil e ribitol, e uma de fosfato poliribosilribitol fosfato (PRP). Anderson e colaboradores (1991), a partir de técnicas em gel de filtração, utilizaram o Dextram®, como padrão de polissacarídeo, e conseguiram estimar o tamanho entre 10^5 e 10^6 Da, para o PRP não degradado.

Contudo, trabalhos mais recentes avaliaram que o peso do PRP, usando o método cromatográfico de exclusão por tamanho, é 105.000 Da, correspondendo

aproximadamente a 300 unidades repetitivas, por molécula (Fujimura, 1990). Os resultados revelados pelo método cromatográfico também indicaram que a molécula de PS Hib é rígida, composta por uma estrutura secundária altamente ordenada, possivelmente com conformação helicoidal, com pouca ou nenhuma tendência para interações terciárias dentro da molécula (Takano, 1997).

A cápsula do Hib tem característica hidrofílica, pois é composto pelo PRP, o qual é constituído por ligações intramoleculares fosfodiéster eletronegativas (Barington, 1995). Estas características moleculares dificultam a fagocitose destas bactérias encapsuladas, pois impedem o contato direto do fagócito com o microrganismo. Portanto, o PRP desempenha papel importante na resistência à fagocitose e atividade do sistema Complemento por polimorfonucleares (Figura 1).

Figura 1. – Molécula do Polissacarídeo presente na cápsula do Hib – PRP

Fonte: <http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/LinkAula/Hemofilos.PDF>

O PRP do Hib favorece outros fatores importantes que repercutem na aderência ao muco e às células não ciliadas, e na penetração por meio dos espaços intercelulares. O Hib sintetiza enzimas betalactamatase e acetiltransferase que determinam resistência à penicilina e ao clorofenicol, respectivamente. Esta bactéria também produz enzimas IgA protease, capaz de destruir sIgA nas mucosas.

1.2 Resposta Imune ao Hib

1.2.1 Resposta Timo independente

Os antígenos não protéicos, como polissacarídeos e lipídios, estimulam a produção de anticorpos na ausência de células T auxiliares, e por isso são denominados antígenos timo-independentes ou T-independentes (TI). A produção de anticorpos frente a antígenos TI difere, em vários aspectos, da resposta humoral constituída para os antígenos T-dependentes (TD) (Fagarasan e Honjo, 2000).

Os antígenos protéicos são fagocitados e processados por células apresentadoras de antígenos (APCs) que expõem o peptídeo, no contexto do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), classe I ou II, ao linfócito T CD8 ou T CD4, respectivamente. Após a interação APC e linfócito T, as células T auxiliares promovem a mudança de isótipos, a maturação da afinidade e a memória imunológica a partir da expressão e da interação das moléculas de CD40L com CD40 presente na célula B, entre outras moléculas co-estimuladoras (Brandzaeg e Johansen, 2005).

Diferentemente, os antígenos TI não são processados e apresentados em associação com as moléculas de MHC, e por isso não são reconhecidos pelas células T auxiliares. Muitos dos antígenos TI são polivalentes, os quais são compostos por inúmeros determinantes antigênicos, fato que induz uma agregação máxima das imunoglobulinas presentes na membrana das células B, levando a ativação destes linfócitos sem a necessidade da cooperação das células T (Fagarasan e Honjo, 2000).

Em adição, muitos polissacarídeos ativam o sistema Complemento pela via alternativa, gerando C3d, que se liga ao antígeno, formando o complexo antígeno-anticorpo que é reconhecido pelas moléculas CD21 e Imunoglobulinas de membrana, respectivamente. A molécula de CD21 é expresso nas células B maduras formando um complexo com outras duas proteínas de membrana, CD19 e CD81. Os anticorpos produzidos durante a resposta TI caracterizam-se por serem de baixa afinidade, com predomínio de anticorpos IgM, e mudança de classe para IgA e subclasses de IgG (Fagarasan e Honjo, 2000) (figura 2).

Bactérias polissacarídeas podem estimular a produção de isótipos, como IgG e IgA, na ausência de CD40L, devido a presença de outras moléculas indutoras. A

mudança de classes das imunoglobulinas pode se iniciar quando as APCs expressam uma proteína que estimula os linfócito B (BLyS também conhecida como BAFF, TALL-1, THANK e zTNF4) (Stavnezer, 1996; Mond et al., 1995; Fagarasan e Honjo, 2000; Hahne, et al., 1998 Rennert et al., 2000).

Para tanto, as células B expressam receptores para BLyS que são: o ligante interador de *cyclophilin*, modulador de cálcio e ativador transmembrânico (TACI), antígeno de maturação de células B (BCMA) e o receptor para BAFF (BAFF-R). As APCs induzem também um segundo sinal, o ligante indutor de proliferação (APRIL), o qual se liga com alta afinidade com BCMA e de baixa afinidade com TACI (Hahne, et al., 1998 Rennert et al., 2000).

Portanto, a ligação de BLyS com TACI, BCMA e BAFF-R ativa e modula a resposta imune via TI, proporcionando a sobrevivência das células B, por meio da regulação de moléculas antiapoptóticas, como NFkB e Bcl2 (Do et al., 2000). Estas interações entre moléculas sinalizadoras, também, possibilitam a constituição de resposta humoral com mudança de classes de imunoglobulinas para IgG e IgA (Figura 2).

Figura 2 – Reconhecimento de antígenos TI e constituição de reposta imune

Fonte: Adaptado de Fagarasan e Honjo, 2000

Embora, o mecanismo de resposta frente a antígenos TI necessite de mais estudos, pesquisadores pressupõem que a proteína BLyS esteja envolvida com outros mecanismos de sinalização em relação à célula B. Infere-se que estes sinais

emitidos possam estimular proliferação e diferenciação de células B da zona marginal (ZM) e subpopulação B1 – presente no peritônio e na mucosa.

Fagarasan e Honjo (2000) postulam que células B da ZM produzem respostas específicas a antígenos polissacarídeos, enquanto, linfócitos B1 sejam responsáveis pela produção de anticorpos naturais – estimulados por bactérias que colonizam o trato gastrointestinal. Muitos destes anticorpos naturais são reativos com carboidratos e são de baixa afinidade. Eles estão presentes na circulação de indivíduos normais e são aparentemente produzidos sem estimulação antigênica (Fagarasan e Honjo, 2000).

A literatura mostra que há 2 tipos de antígenos TI: os antígenos TI 1 e TI 2. Os TI 1 em elevadas concentrações são ativadores policlonais das células B, induzindo a proliferação e diferenciação destas células independente da especificidade antigênica (Fagarasan e Honjo, 2000). Um típico antígeno TI 1 é o LPS, reconhecido por receptores *Toll-like* (TRL), especificamente o TLR-4, presentes em células dendríticas e fagócitos (Ogata et al., 2000). Estudos *in vivo*, em camundongos, evidenciaram que as subpopulações de células do B-1 estejam envolvidas nas respostas de TI-1, pois camundongos *XID*, que apresentam deficiência de linfócitos B-1, são incapazes de responder a antígenos TI-1 (Fagarasan e Honjo, 2000).

Já os antígenos TI-2 estimulam células B específicas da ZM e não funcionam como ativadores policlonais. Antígenos TI-2 são geralmente carboidratos com seqüências repetitivas multivalentes que fazem ligação cruzada com os receptores de linfócitos B (BCRs) (Snappere Mond, 1996). Estes açúcares, como o @Dextran e o PRP do Hib, não funcionam como mitógenos, mas seus epitopos repetitivos e multivalentes fazem ligação cruzada com os receptores de linfócitos B (BCRs) (Snappere Mond, 1996), podendo ativá-los (Fagarasan e Honjo, 2000).

1.2.1 Vacinas Polissacarídeas e Conjugadas

As vacinas compostas de antígenos polissacarídeos induzem a imunidade protetora longa que pode estar relacionado a não degradação deste antígeno, o qual pode ficar por longo período nos tecidos linfóides estimulando células B *naive*. Entretanto, não se conhece muito o mecanismo de resposta utilizado, mas sabe-se que uma típica, rápida, eficiente resposta secundária com mudança de isótipo de

anticorpos é elaborada frente à reapresentação destes antígenos ao sistema imune (Fagarasan e Honjo, 2000).

O lactente aos 18 meses apresenta linfócitos B em estado de maturação. Para tanto, foi necessário acoplar ao PRP uma proteína carreadora para se obter uma resposta TD eficaz nestes lactentes, durante a vacinação. Desta forma, a resposta humoral passa pela estimulação dos linfócitos T, que ativam os linfócitos B por intermédio de fatores solúveis (citocinas). Isto permite uma produção precoce, a partir do segundo mês, de anticorpos IgG anti-PRP, e doses subsequentes estimulam a memória imunológica (Cavalcante, 2002).

Em 1980, Schneerson e colaboradores fizeram modificações que tornaram o polissacarídeo de *Haemophilus influenzae* tipo b mais imunogênico, ligando-o quimicamente a uma proteína carreadora. A vacina constituída por este composto foi testada em crianças de diferentes faixas etárias e o resultado foi bastante satisfatório para crianças menores de 18 meses.

Vacina anti-Hib e produção de anticorpos

Os anticorpos pós-vacinal produzidos após a imunização com a vacina anti-Hib-PS são predominantemente das subclasses IgG1 e IgG2. O repertório de anticorpos produzidos por vacinas anti-Hib-PS em humano foi relativamente restrito. Estudos moleculares da região variável da cadeia pesada (V_H) mostram que pelo menos dois genes presentes no *Locus* V_{HIII} são expressos com considerável heterogeneidade (Adderson et al., 1991).

Baseado na expressão de genes que compõe a região variável da cadeia leve (V_L), o repertório de anticorpos pode ser dividido em dois tipos: anticorpos A2 e não-A2. O primeiro grupo contém anticorpos expressos por um único gene presente no *Locus* V_{KII} , o gene A_2 , que é dominante entre os anticorpos anti-Hib-PS. Este gene é responsável pela produção de anticorpos A2, os quais estão relacionados à resposta humoral induzida pela vacinação com o PRP (Scott et al., 1989).

Em contra partida, outro repertório de resposta humoral, conseqüente da expressão de genes presentes na região V_L , é montado e menos freqüente, expresso por pelo menos dois genes no *Locus* V_{KI} , e um gene no *Loci* V_{KII} , V_{KIII} , V_{KIV} e V_{λ} , os quais parecem conter mutações somáticas. Estas imunoglobulinas

produzidas são conhecidas como anticorpos não A2 e, geralmente, não está associada à resposta pós-vacinal anti-Hib-PS (Tarrand et al., 1989). Interessantemente, anticorpos produzidos por genes A2 não têm reação cruzada com carboidratos, enquanto anticorpos produzidos por genes não A2 têm reação cruzada com outros carboidratos (Scott et. al, 1992).

1.3 Proteção Materno-Infantil

1.3.1 Transporte Transplacentário de Anticorpos Maternos e imunização das gestantes

Brambell e colaboradores (1949) elaboraram os primeiros estudos sobre transmissão de imunoglobulinas da mãe para o feto. Tal grupo de pesquisadores, a partir dos trabalhos realizados com coelhos, sugeriu que a IgG materna era transferida para o feto por meio do saco vitelino. Posteriormente, demonstrou-se que a porção Fc da molécula de IgG estava envolvida na passagem destas imunoglobulinas para o feto (Brambell et al., 1959). O mesmo grupo de pesquisadores descobriu que o mecanismo de transferência de IgG, similar ao acima descrito, ocorre em filhotes de roedores. Após o nascimento, a absorção de IgG, do leite materno, acontece a partir de receptores específicos, presentes no intestino destes filhotes recém-nascidos (Halliday, 1955).

Com base nessas evidências experimentais, Brambell e colaboradores (1958) elaboraram a hipótese de que o anticorpo entra na célula através de pinocitose de uma maneira não seletiva. Segundo estes estudiosos, receptores presentes na superfície celular sofrem processo de invaginação e recobrem a superfície interna do fagossoma. Parte das moléculas de IgG ligam-se a receptores, sendo posteriormente liberadas no espaço intercelular sem sofrer processo de digestão; as moléculas de IgG que não se ligam a receptores são degradadas por enzimas presentes nos lisossomas (Brambell et al., 1958).

Trabalhos anteriores demonstraram que o transporte de anticorpos IgG pela placenta humana, inicia-se na 20ª semana de gestação com a participação do receptor FcRN, receptor específico para a porção Fc da IgG, o qual está presente no sinciotrofoblasto e endotélio fetal. A literatura demonstra que a passagem de

anticorpos maternos inicia-se neste período e aumenta progressivamente até o nascimento (Saji et al., 1994).

Kohler e colaboradores (1966) mostraram que o transporte de anticorpos via placenta foi ativo e que a concentração de mais anticorpos no sangue de cordão que no sangue materno. Entretanto, trabalhos que analisaram pares de amostras das mães e dos cordões umbilicais das africanas e européias, observaram que o transporte de IgG foi ativo somente quando os níveis séricos maternos de IgG total são baixos ou dentro da faixa de normalidade (Michaux et al., 1966). Quando a concentração de anticorpos foi elevada (geralmente acima de 15 g/l), os níveis séricos de IgG no sangue de cordão são mais baixos que os níveis maternos correspondentes (Michaux et al., 1966).

Logo, a quantidade de IgG transferida para o feto depende da população de receptores na superfície celular e a taxa de transferência foi determinada, de acordo com a taxa de ligação e de liberação de moléculas de IgG dos receptores FcRN. O caráter seletivo do processo depende de uma ou de ambas as taxas e pode até mesmo variar entre diferentes subclasses de IgG. Outra possibilidade foi imaginar diferentes receptores modulando a taxa de transferência de várias subclasses de IgG, conforme o número e a afinidade de receptores para cada subclasse (Brambell et al., 1966).

Radulescu e colaboradores (2004) com o intuito de compreender a especificidade do receptor FcRN, trataram moléculas de imunoglobulinas da classe IgG com dietilpirocarboneto, o qual reage bloqueando o aminoácido histidina, presentes nas imunoglobulinas, modificando assim a estrutura molecular destes anticorpos. Durante os ensaios para a avaliação da internalização de IgG, foi verificado que as imunoglobulinas modificadas molecularmente não são reconhecidas pelo receptor FcRN, mostrando a especificidade deste receptor, principalmente, para com a porção Fc da subclasse IgG1 (Radulescu et al., 2004).

Figura 3 – Receptor de FcRn

Fonte: Adaptado do site: www.nature.com/.../v7/n9/fig_tab/nri2155_F2.html

Conseqüentemente, a passagem placentária de IgG1 foi mais eficiente do que a IgG2 (Rote, 1985). Do ponto de vista clínico, é importante lembrar que anticorpos anti-polissacarídeos em adultos são principalmente da subclasse IgG2. Dessa forma, anticorpos contra antígenos polissacarídeos têm uma menor taxa de transporte materno-fetal e estão presentes em baixa concentração no sangue de cordão umbilical (Ferrante et al., 1990).

A resposta de anticorpos específicos ao polissacarídeo do Hib é do tipo IgG1 e IgG2. Ghea (1988) demonstrou que crianças maiores de dois anos, vacinadas contra o Hib, produzem resposta humoral a este antígeno com concentrações elevadas de anticorpos IgG2. Entretanto, crianças menores de 17 meses, após a imunização, produzem anticorpos anti-Hib com predomínio da subclasse IgG1 (Costa-Carvalho, 2004).

Portanto, a mãe para proteger o RN deve dispor de níveis protetores de anticorpos séricos específicos da classe IgG, principalmente a subclasse IgG1, no seu sangue, para poder transferi-los ao seu feto. Quanto mais anticorpos específicos o feto recebe, acima do nível protetor, maior será a proteção após o nascimento. O período no qual a imunização materna é efetiva depende do tempo que a mãe leva para montar uma resposta imune à vacina, e também do transporte de IgG transplacentário (Cavalcante, 2002).

No início dos anos 90, a Organização Mundial de Saúde desenvolveu um estudo multicêntrico envolvendo 4 países em desenvolvimento (Etiópia, Gâmbia, Papua Nova Guiné e Filipinas), cujo intuito era avaliar os aspectos clínicos e os agentes etiológicos responsáveis por infecções graves entre crianças abaixo de 3 meses de idade. Em todos os estudos foi observada uma passagem de anticorpos IgG específicos significativamente maior do que a observada nos controles saudáveis não vacinados (Quiambao et al., 2003). Além disso, foi verificada uma imunidade específica na criança, que persistiu durante 6 meses pós-parto (Lehmann et al., 2003) e uma concentração significativamente maior de anticorpos IgA específicos no leite, obtido até 6 meses pós-parto de mães imunizadas em relação aos controles não imunizados (Lehmann et al., 2003; Englund e Glezen, 2003).

Diversos trabalhos foram realizados com o objetivo de induzir a resposta imune na mãe por meio da vacinação durante a gestação, e otimizar a transferência de anticorpos para o feto. A vacinação durante a gravidez resulta em níveis mais elevados de anticorpos IgG anti-PRP durante os dois primeiros meses de vida em diversas populações (Englund et al., 1997; Mulholland et al., 1996; Santosham et al., 2001). Um exemplo que demonstra o sucesso da imunização materna durante o terceiro trimestre de gestação é a vacinação com o toxóide tetânico, que resultou na prevenção do tétano neonatal e maternal nos países desenvolvidos (Miller, 1972).

Imprinting comportamental da mãe no RN

Em mamíferos, a imunização passiva materna protege a prole nos primeiros meses de vida, proporcionando sua adaptação ao meio extra-uterino. Além da proteção passiva, os anticorpos maternos, recebidos no período intrauterino neonatal, influenciam em múltiplos parâmetros o desenvolvimento do sistema imune do neonato (Lemke e Lange, 1999)

A literatura revela que diversas destas características são geralmente induzidas durante os chamados períodos sensíveis, que ocorrem logo depois do nascimento, período conhecido como “Konrad Lorenz”, no qual ocorre o *imprinting* comportamental da mãe no RN. Lemke e Lange (1999) consideram que o *imprinting* imunológico ocorre antes do desenvolvimento ontogênico do sistema imune do neonato.

A maturação do sistema imune do neonato foi influenciada por anticorpos maternos e outros fatores imunomodulatórios, como as citocinas. Dentre as imunoglobulinas maternas, transferidas via placenta e amamentação, encontram-se à passagem de anticorpos idiotipos, os quais têm seu sítio de ligação ao antígeno, reconhecidos por outros anticorpos, denominados anti-idiotipos (Hanson et al., 1999).

Figura 4 – Anticorpo Idiotipo

Fonte: Adaptado do site: <http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/LinkAula/Hemofilos.PDF>

Hanson e colaboradores (1989) observaram que anticorpos anti-idiotipos, devido sua capacidade de competir com antígeno no sítio de ligação do anticorpo idiotype, pode funcionar como a imagem do antígeno. O anticorpo anti-idiotipo e o antígeno se ajustam ao mesmo sítio de ligação, específico do idiotype (Hanson et al, 1989). Com isso, o anticorpo anti-idiotipo pode aumentar a produção de idiotype, da mesma maneira que o antígeno (Hanson et al, 1999).

Figura 5 – Esquema mostrando rede anti-idiotípica

Fonte: Adaptado de Hanson, 1989.

Conseqüentemente, os anticorpos maternos também exercem estimulação ativa indicando sua influência na regulação da expressão de isótipos. Os anticorpos anti-idiotipos provocam alterações ao longo do tempo como: determinação do repertório de células B e T no adulto, aumento precoce da afinidade dos anticorpos produzidos na resposta primária, proteção antimicrobiana por meio de anticorpos não-reativos ao antígeno, os anticorpos anti-idiotipos, supressão alérgeno-específica da responsividade de IgE, e sob condições patológicas, a transferência de doenças auto-imunes (Lemke et al., 2004).

A conexão entre a rede anti-idiotípica e o desenvolvimento do repertório de células B e T são guiados pela experiência imunológica da mãe. O efeito *imprinting* de anticorpos maternos nos sistema imune do neonato beneficia a estabelecimento de uma resposta imune específica, ao longo dos anos (Lemke, 2004). Portanto, as imunoglobulinas maternas, conseqüentes da experiência imunológica da mãe, são de extrema importância para o desenvolvimento ontogênico do sistema imune do neonato (Lemke e Lange, 1999).

1.3.2 Imunidade oferecida durante a amamentação

Há décadas que se investe na promoção do aleitamento materno, por meio de Programas de Saúde de organizações governamentais e não governamentais, na tentativa de reverter o desmame precoce (Pereira et al., 2004). Além da importância

nutricional, o colostro e o leite humano contêm anticorpos e polipeptídeos antibacterianos inespecíficos, incluindo, lactoferrina, lisozima e peroxidase, importantes na ação contra a colonização das mucosas por microrganismos, proporcionando proteção ao lactente (Goldman, 1993).

Para tanto, as células presentes nas glândulas mamárias produzem fatores estimuladores de colônias como GM-CSF, G-CSF e M-CSF, que estimulam a proliferação de populações celulares. O colostro e o leite humano contêm citocinas pró-inflamatórias e mediadoras da imunidade inata como IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ , e os mediadores de imunidade adaptativa como IL-2, IL-4 que apresentam ação estimuladora sobre linfócitos T e B, e a IL-10 que estimula a produção de IgA (Bernt e Walker, 1999).

Os anticorpos encontrados no leite representam um repertório variável resultante de complexas interações entre mãe e meio ambiente. Desde sua descoberta, sabe-se que a imunoglobulina A (IgA) representa 90% do conteúdo total das imunoglobulinas presentes no colostro e leite, sendo encontrada normalmente sob a forma polimérica (plgA) (Hanson et al., 1961). Este anticorpo constitui-se, geralmente, de um dímero ligado covalentemente a um polipeptídeo denominado de cadeia J, que é sintetizada por plasmócitos produtores de IgA (Xanthou, 1998; Brandtzaeg, 2003).

A plgA é reconhecida pelo receptor de imunoglobulina polimérica (plgR), o qual é produzido por células epiteliais e expresso na membrana baso-lateral das mesmas (Goldman, 1993; Brandtzaeg, 2003). Na lâmina própria das mucosas, a plgA secretada liga-se a esses receptores e, após a formação do complexo, o mesmo é transportado para a superfície apical da célula e liberada para o lúmen.

Durante a secreção o receptor plgR é clivado, formando uma nova molécula, o componente secretor (SC) que fica acoplado à molécula de imunoglobulina constituindo a IgA secretora (slgA). Este processo é regulado por hormônios produzidos no final da gestação ou durante a lactação e por citocinas como IL-5 e IL-6 (Strober et al., 2000). A concentração de IgA total pode chegar a 5.000 mg/dl no colostro e 25 mg/dl no leite (Strober et al., 2000).

Outros isótipos são encontrados no colostro e no leite materno como a IgG, que raramente excede a concentração de 100 mg/dl. As proporções das subclasses

de IgG diferem daquelas presentes no soro, pois os valores percentuais de IgG2 e IgG4 estão significativamente mais elevados no colostro do que no soro humano (Xanthou, 1998). Este dado pode ser relevante, uma vez que a IgG2 é eficaz contra polissacárides, e sua passagem transplacentária está prejudicada em relação a concentração de IgG1 e IgG3 (Costa-Carvalho et al., 1996). O leite também contém aproximadamente 25 mg/l de IgM (Xanthou, 1998).

Diante do exposto, os anticorpos séricos e secretores, os quais a mãe produz e transfere para o infante, conferem proteção com relação às doenças inerentes à infância, principalmente, as respiratórias. Além disto, estes anticorpos têm funções imuno-reguladoras e imuno-estimuladoras que podem repercutir no processo de maturação do sistema imune do neonato. Para tanto, o presente trabalho propôs a vacinação de gestante, com a vacina anti-Hib, para constituição de um grupo de mães vacinadas, o qual foi comparado a um grupo de mães não vacinado para compreender melhor a produção e a especificidade de anticorpos anti-Hib, e sua transferência para a criança.

6. Conclusão

A transferência materno-infantil de anticorpos séricos e secretores conferem proteção ao infante em relação às doenças causadas pelo Hib. Para tanto, foi proposto à vacinação de gestantes para constituição de um grupo de mães vacinadas com objetivo de compreender melhor a produção e a especificidade de anticorpos anti-Hib, e sua transferência para a criança. Os resultados demonstraram que os neonatos de mães imunizadas com Hib apresentaram maiores concentrações de anticorpos anti-Hib no soro, os quais mostraram elevado índice de avidéz. Conclui-se que a imunização da gestante pode ser uma estratégia eficaz para reduzir a morbidade e a mortalidade causada pelo Hib, nos dois primeiros meses de vida, antes da administração da vacina ao próprio lactente.

Referências Bibliográficas

Adderson EE, Chisholm N, Halperin SA. Immunization with *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccine at 18 and 24 months of age: evidence of decreased immunogenicity. *Clin Invest Med*. 1991 Aug;14(4):338-45.

Adderson EE, Johnston M, Shackelford PG, Carroll WL. Development of the human antibody repertoire. *Pediatr Res*. 1992; 32:257-63.

Adderson EE, Shackelford PG, Quinn A, Carroll AWL. Restricted Ig H chain V gene usage in the human antibody response to *Haemophilus influenza* type b capsular polysaccharide. *J Immunol*. 1991; 147:1667 – 1674.

Adderson EE, Shackelford PG, Quinn A, Carroll WL. Restricted Ig H chain V gene usage in the human antibody response to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. *J Immunol*. 1991 Sep 1;147:5:1667-74. PMID: 1908880 [PubMed - indexed for MEDLINE]

American Academy of Pediatrics. Imunização ativa e passiva. In: Pickering LK. (ed.) *2000 Red Book: report of the committee on infectious diseases*. 25. ed. Elk Grove Village, IL: *American Academy of Pediatrics*. 2000; p.2

Bernt KM and Walker WA. Human milk as a carrier of biochemical messages. *Acta Paediat* 1999;430:27-41.

Bijlmer HÁ, Evans NL, Campbell H. Carriage of *Haemophilus influenzae* in health Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1989;83:831-35.

Bijlmer HÁ. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* invasive disease in developing countries and intervention strategies. In: Ellis RW, Granoff DM, (eds.) *Development and use of Haemophilus b conjugate vaccines*. New York: Marcel Dekker; 1994. p. 247-64.

Bouskela MAL, Grisi S, Escobar AMU. Aspectos epidemiológicos da infecção por *Haemophilus influenzae* tipo b. *Rev Panam Salud Publica*. 2000;7:332–339.

Bouskela MAL. Revisão sobre aspectos epidemiológicos do *Haemophilus influenzae* tipo b. [Dissertação de Mestrado] São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1995.

Brambell FWR, Halliday H, Morris IG. Interference by human and bovine serum and serum protein fractions with the absorption of antibodies by suckling rats and mice. *Proc R Soc Lond Ser B, Biol Sci* 1958;149:1-11.

Brambell FWR. The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. *Lancet* 1966;2:1087-93.

Brandtzaeg P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine* 2003;21:3382-8.

Cavalcante RS. Resposta imunológica à vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo b em gestantes desnutridas e sem desnutrição. [Dissertação de Mestrado] São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2002.

Costa Carvalho BT. Avaliação da passagem transplacentária de subclasses de IgG e anticorpos específicos ao *Haemophilus influenzae* tipo b em soro de recém-nascidos de diferentes idades gestacionais e pesos. [Tese de Doutorado] São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1994.

Delneri MT, Carbonare SB, Silva ML, Palmeira P, Carneiro-Sampaio MM. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to HEp-2 cells by colostrum and milk from mothers delivering low-birth-weight neonates *Eur J Pediatr*. 1997 Jun;156:6:493-8.

Englund JÁ, Glezen WP, Thompson C, Anwaruddin R, Turner CS, Siber, GR. *Haemophilus influenzae* type b-specific antibody in infants after maternal immunization. *Pediatr Infect Dis J*. 1997;16: 1122-30.

Fagarasan S and Honjo T. T-independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science* 2000; 290:89-92.

Farhat CK, Cintra LC, Tregnani MW. Vacinas e o trato respiratório – o que devemos saber? *Jornal de Pediatria* 2002; 78:2:1-14.

Fomsgaard A. Antibodies to lipopolysaccharides some diagnostic and protective aspects. *APMIS*. 1990; 98:1-36.

Fujimura MD. Níveis séricos das subclasses da imunoglobulina G em crianças normais e nefróticas. [Tese de doutorado] São Paulo: Universidade de São Paulo, 1990.

Funkhouser A, Steinhoff MC, Ward J. *Haemophilus influenzae* disease and immunization in developing countries. *J Infect Dis* 1991; 13:S542-54.

Garpenholt O, Silfverdal AS, Hugosson S, Fedlun H, Bodin L, Romanus V, Olcém P. The impact of *Haemophilus influenzae* type b vaccination in Sweden. *Scand J Infect Dis* 1996; 28: 1965-169.

Geha RS. IgG antibody response to polysaccharides in children with recurrent infections. *Monogr Allergy* 1988;23;97-102.

Goldman AS. The immune system of human milk: antimicrobial, anti-inflammatory and immunomodulating properties. *Pediat Infect Dis J*. 1993;12: 6664-74.

[Granoff DM, Lucas AH](#). Laboratory correlates of protection against *Haemophilus influenzae* type b disease. Importance of assessment of antibody avidity and immunologic memory. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 May 31;754:278-88.

Hahn-Zoric M, Fulconis F, Minoli I, Moro G, Carlsson B, Bottiger M, Raiha N, Hanson LA. Antibody responses to parenteral and oral vaccines are impaired by conventional and low protein formulas as compared to breast-feeding. *Acta Paediatr Scand*. 1990;79:1137-42.

Halliday R. The absorption of antibodies from immune sera by the gut of the young rat. *Proc R Soc Lond Ser B, Biol Sci* 1955;143:408-13.

Hanson LA, Carlsson B, Ekre HP, Hahn-Zoric M, Osterhaus ADME, Robertson D. Immunoregulation mother-fetus/newborn, a role for anti-idiotypic antibodies. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1989;351:38-41.

Hundt M, Schmidt RE. The GPI-anchored Fc gamma receptor III in the activation of granulocytes *Immun Infekt*. 1992 Jul;20(3):89-90. German.

Kohler PF, Farr RS. Elevation of cord over maternal IgG immunoglobulin: evidence for an active placental IgG transport. *Nature*. 1966;210:1070-1.

Lehmann D, Pomat WS, Riley ID, Alpers MP. Studies of maternal immunisation with pneumococcal polysaccharide vaccine in Papua New Guinea. *Vaccine*. 2003;21:3446-50.

Lemke H, Coutinho A, Lange H. Lamarckian inheritance by somatically acquired maternal IgG phenotypes. *Trends Immunol*. 2004;25:180-6.

Lemke, H. and Lange, H. Generalization of single immunological experiences by idiotypically mediated clonal connections. *Adv. Immunol*. 2002;80: 203–241.

Lemke, H. and Lange, H. Is there a maternally induced immunological imprinting phase à la Konrad Lorenz? *Scand J Immunol.* 1999 50:4::348-54.

[Lucas AH, Granoff DM.](#) Functional differences in idiotypically defined IgG1 anti-polysaccharide antibodies elicited by vaccination with *Haemophilus influenzae* type B polysaccharide-protein conjugates. *J Immunol.* 1995 Apr 15;154(8):4195-202.

Lucas AH, Reason DC. Aging and the immune response to the *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide: retention of the dominant idotype and antibody function in the elderly. *Infect Immun.* 1998;66:1752-4.

Mäkelä PH, Takala AK, Peltola H, Eskola.- Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. *J Infect Dis.* 1992;165: 2-6.

Miller JK. The prevention of neonatal tetanus by maternal immunization. *Environ Child Health.* 1972;18:160-7.

Mulholland K, Suara RO, Siber G, et al. Maternal immunization with *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide tetanus protein conjugate vaccine in The Gambia. *J Am Med Assoc.* 1996;275:1182-8.

Mcintyre 95

[Nagao AT, Hahn-Zoric M, Wadsworth C, Gustafsson B, Ulanova M, Hanson LA.](#) A modified fast micro method in agarose for isotype, allotype, light chain and idotype-specific analysis of antibody clonotypes to bacterial virulence antigens. *Scand J Clin Lab Invest.* 1998 Dec;58(8):661-8.

Nery Guimarães R, Bittencourt LCM, Pastor MVA. Meningites virais e bacterianas no município do Rio de Janeiro (Brasil): algumas considerações sobre o sistema de informações em saúde e sobre a distribuição da doença no espaço urbano. *Rev Saúde Pública* 1981;15:379-94.

Quiambao BP, Nohynck II, Ollgren J, Gozum L, Gepanayao CP, Soriano V, Mäkelä PH. Maternal immunization with pneumococcal polysaccharide vaccine in the Philippines. *Vaccine.* 2003;21:3451-3454.

Quiambao BP, Nohynek H, Käyhty H, Ollgren J, Gozum L, Gepanayao CP, Soriano V, Mäkelä PH. Maternal immunization with pneumococcal polysaccharide vaccine in the Philippines. *Vaccine.* 2003 Jul 28;21(24):3451-4.

Radulescu L, Antohe F, Jinga V, Ghetie Vr, Simionescu M. Neonatal Fc Receptors discriminates and monitors the pathway of native and modified immunoglobulin G in placental endothelial cells. *Hum Immunol.* 2005; 65: 578-85.

Regueira M, Pace J, Bonfiglio R, Callejo R, Ruvinsky R, Di Fabio J, et al. Invasive *S. pneumoniae* isolates from Argentinian children: serotypes, families of pneumococcal surface protein A (PspA), and genetic diversity. 3rd International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases; May 5-8-2002; Anchorage, Alaska. ISPPD; 2002. p.102.

Rote NS. Maternal-fetal immunology. In: Scott JR and Rote NS. *Immunology in obstetrics and gynecology*. Norwalk: Appleton; 1985. p.55-75.

Saji F, Koyama M, Matsuzaki N. Human placental Fc receptors. *Placenta* 1994;15:453-66.

Santosham M, Englund JA, Melnnes P. Safety and antibody persistence following *Haemophilus influenzae* type b conjugate or pneumococcal polysaccharide vaccines given before pregnancy in women of childbearing age and their infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2001;20: 931-40.

[Scott P, Pearce E, Cheever AW, Coffman RL, Sher A](#). Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol Rev*. 1989 Dec;112:161-82. Review.

Scott, M. G., and M. H. Nahm. 1992. Characterization of the human IgG antibody VL repertoire to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide. *J Infect. Dis*. 165:s53.

Selvaraj P, Pitchappan RM. Post-hatching development of the immune system of the pigeon, *Columba livia*. *Dev Comp Immunol*. 1988 Fall;12(4):879-84. No abstract available. PMID: 3208962 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Selvaraj P, Rajiswamy, Vijayan VK, Prabhakar R, Narayanan PR. Hydrogen peroxide producing potential of alveolar macrophages & blood monocytes in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res*. 1988 Aug;88:124-9. No abstract available.

Selvaraj P, Rosse WF, Silber R, Springer TA. The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nature*. 1988 Jun 9;333(6173):565-7.

Shann F. Etiology of severe pneumonia in children in developing countries. *Pediatr Infect Dis J*. 1986;5:247-52.

Silfverda SA, Bodinz L, Ulanova M, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Olcen P. Expression of idiotypic antibodies-1 and -2 and breastfeeding in relation to antibody levels against *haemophilus influenzae* type b in children. *Scandinavian J Immunol*. 2006; 63:371-5

Simister NE, Rees AR. *Eur J Immunol*. 1985 Jul;15(7):733-8. Link Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine.

Solé D, Yamada E, Vana AT, Costa-Carvalho BT, Naspitz CK. Prevalence of asthma and related symptoms in school-age children in São Paulo, Brazil – International Study of Asthma and Allergies in Children (ISAAC). *J Asthma* 1999;36:205-12.

Solórzano-Santos F, Castellanos-Cruz RC, Echanizavilés G, Arredondo-García, JL. Actividad antimicrobiana del colostro humano contra enteropatógenos. Estudio preliminar. *Lay-Amer Microbiol.* 1993;35:1-6.

Sorensen RU, Hidalgo H, Moore C, et al. Post-Immunization pneumococcal titers and IgG subclass levels. *Pediatr Pulmonol.* 1996; 22:167-73.

Striker GA, Casanova LD, Nagao AT. Influence of type of delivery on A, G and M immunoglobulin concentration in maternal colostrums *J Pediatr (Rio J).* 2004;80:2:123-8. Portuguese.

Strober W, Fuss IJ. O sistema imunológico das mucosas. In: Sittes DP, Terr AL, Parslow TG, editores. *Imunologia Médica*. 9ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2000. p.157-62.

Takano AO. Resposta imune humoral sistêmica e secretora de crianças eutróficas à vacina de polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugado com toxóide tetânico. [PhD Thesis]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1997.

[Tarrand JJ, Scott MG, Takes PA, Nahm MH.](#) Clonal characterization of the human IgG antibody repertoire to *Haemophilus influenzae* type B polysaccharide. Demonstration of three types of V regions and their association with H and L chain isotypes. *J Immunol.* 1989 Apr 1;142(7):2519-26.

Vigilância epidemiológica de doenças e agravos específicos. In Brasil, Ministério da Saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2003. Capítulo 5.28

Wilcox AJ, Skjaerven R. Birth weight and perinatal mortality: the effect of gestational age. *Am J Public Health.* 1992 ;823:378-82.

Xanthou M. Immune protection of human milk. *Biol Neonate.* 1998; 74:121-33.