

Sônia Christina Leme Stach

**Transferência transplacentária de anticorpos em gestações
gemelares**

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

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dra. Maria de Lourdes Brizot

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Stach, Sônia Christina Leme

Transferência transplacentária de anticorpos em gestações gemelares /
Sônia Christina Leme Stach. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientadora: Maria de Lourdes Brizot.

Descritores: 1.Gravidez de gêmeos 2.Imunoglobulinas 3.Imunoglobulina G
4.Placenta 5.*Streptococcus agalactiae* 6.Lipopolissacarídeos 7.Klebsiella
8.Pseudomonas

Dedicatória

À minha mãe, **Maria Isabel** (in memorian), obrigada por seu sorriso, por seu incentivo, por sua fé e acima de tudo, obrigada por seu amor. Sinto tua falta.

À minha avó, **Nympha** (in memorian), minha segunda mãe, obrigada por me guiar, por me ensinar e por me fazer sonhar. Você será sempre muito importante em minha vida.

Ao meu pai, **Waldemar**. Obrigada por sua docilidade, por ter sempre me apoiado e pela segurança que você sempre me transmitiu. Te amo demais.

Ao meu irmão, **Nelson**, primeiro gemelar que sempre esteve ao meu lado. Nunca estive só, graças a você. Obrigada por estarmos juntos desde nossa vida intrauterina. Obrigada por todo o seu apoio.

Aos meus queridos fantasmas, que carrego comigo e que me levam pela vida. A vocês, que um dia amei, obrigada por sua existência.

A **Deus**, sem o qual nada mais teria sentido.

Agradecimentos especiais

À Professora Dra Maria de Lourdes Brizot, obrigada por todos os ensinamentos e por sua excepcional competência como médica, pesquisadora, mulher e mãe. Sua força e determinação são admiráveis.

Ao Professor Dr Adolfo Wenjaw Liao, com o qual iniciei esta jornada na pós-graduação. Obrigada por ter me guiado neste caminho da pesquisa. Você para mim é um grande mestre, que admiro muito.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Marcelo Zugaib, Professor Titular de Obstetrícia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por permitir esta oportunidade nesta renomada instituição.

À **Professora Dra. Rossana Pulcineli Vieira Francisco**, presente na banca de qualificação, pelas valiosas considerações para o aprimoramento deste trabalho.

Ao **Dr. Marco Aurelio Knippel Galletta**, também presente na banca de qualificação, por suas valiosas contribuições que ajudaram na finalização deste projeto.

À **Professora Dra. Magda Maria Sales Carneiro-Sampaio**, obrigada por sua valiosa ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À **Professora Dra. Vera Lúcia Jornada Krebs**, obrigada por sua ajuda para a realização deste projeto.

À **Dra. Patricia Palmeira Daenekas Jorge**, muito obrigada por sua ajuda e orientações acerca deste projeto. Seu trabalho no LIN foi de fundamental importância para a realização deste projeto.

Ao **Professor Dr. Vitor Bunduki**, o primeiro a me incentivar a realizar a pós-graduação. Obrigada pela ajuda.

À **Dra. Maria Rita de Figueiredo Lemos Bortolotto**, por sua incansável ajuda e orientação nestes muitos anos de convivência.

Aos colegas do Setor de Gestações Gemelares da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, especialmente à **Dra. Fernanda Cristina Ferreira Mikami**, ao **Dr. Wagner Rodrigues Hernandez** e à **Dra Mariana Yumi Miyadahira**.

À **Dra Eliane Azeka Hase**, obrigada, acima de tudo, pela amizade.

Às grandes amigas **Dra Nanci Utida**, **Dra Fernanda Spadotto**, **Dra Erika Ussami**, **Dra Diva Glasser Leme**, **Sabine Dittmers** e **Nympha Savalle**. Obrigada por sua amizade e apoio nos momentos difíceis. Guardo vocês no meu coração.

Às Sras **Soraia Cristina Ferreira da Silva** e **Lucinda Cristina Pereira**, secretárias da Clínica Obstétrica, por toda ajuda.

A todos os **Mestres da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo**, que com sabedoria me ensinaram a arte da obstetrícia, desde a minha graduação.

À **equipe de enfermagem da Clínica Obstétrica**, por sua disponibilidade em ajudar.

Às **pacientes** do Setor de Gestações Gemelares da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo que consentiram em participar deste projeto. Meu profundo obrigado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pelo apoio financeiro a este projeto (2011/13587-4).

Adagietto da Quinta Sinfonia

Gustav Mahler

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

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

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

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

Sumário

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1- Introdução	1
2- Resumo do plano inicial	11
2.1- Objetivos	13
3- Projeto de pesquisa	15
4- Publicações	38
4.1- Paper 1 – Transplacental total IgG transfer in twin pregnancies	40
4.2- Paper 2- Placental transfer of IgG antibodies specific to <i>Klebsiella</i> and <i>Pseudomonas</i> LPS and to Group B <i>Streptococcus</i> in twin pregnancies	59
5- Discussão	80
6- Conclusões	95
7- Anexos	97
8- Referências bibliográficas	113

Listas de abreviaturas, siglas e símbolos

Listas de abreviações em português

BAM	Berçário Anexo à Maternidade
CAPPesq	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
cDNA	DNA complementar
DUM	Data da última menstruação
DO	Densidade óptica
EGB	Streptococcus do grupo beta hemolítico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Fc	Fragmento cristalizável
FcRn	Receptor Fc neonatal
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
LIM-36	Laboratório de Pediatria Clínica
LPS	Lipopolissacarídeos
MHC	Complexo de histocompatibilidade

RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RNPT	RN pré-termo
RNT	RN de termo
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfato com <i>Tween</i>

Lista de abreviações em inglês

ATCC	American type culture collection
AU	Arbitrary units
BHI	Brain Heart Infusion
CAPPesq	Institutional ethics committee
CVID	Common Variable Immunodeficiency
DTaP	Diphtheria, tetanus and acellular pertussis
ECL	Enhanced Chemiluminescent
Fab	Fragment antigen binding
GAD	Gestational age at delivery
GBS	Group B <i>Streptococcus</i>
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> type B
HRP	Horseradish peroxidase
ICU	Intensive care unit
IgG	Immunoglobulin G
LPS	Lipopolysaccharide
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffered saline
SD	Standard deviation
SLE	Systemic Lupus Erythematosus

Lista de figuras

- | | | |
|--------------|--|---|
| 1- Figura 1: | Estrutura da Imunoglobulina G | 3 |
| 2- Figura 2: | Estrutura do Receptor Fc neonatal
(FcRn) | 4 |
| 3- Figura 3: | Ligaçāo do Receptor Fc neonatal
(FcRn) à Imunoglobulina G | 5 |
| 4- Figura 4: | Transporte da Imunoglobulina G
através do sinciciotrofoblasto | 6 |

Resumo

Stach SCL. *Transferência transplacentária de anticorpos em gestações múltiplas* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Há poucos dados na literatura sobre o transporte transplacentário de imunoglobulinas em gestações múltiplas. O objetivo deste estudo foi observar fatores que influenciam a concentração de imunoglobulina G (IgG) no cordão umbilical dos neonatos e a transferência transplacentária de IgG total e de IgG contra o *Streptococcus* grupo B (EGB), e lipopolissacarídeos (LPS) de *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp.. Métodos: estudo prospectivo realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no período de 2012 a 2013. Foram coletadas amostras de sangue materno e de cordão umbilical no momento do parto. Os critérios de inclusão foram gestações gemelares com ausência de sinais de infecção por HIV, citomegalovírus, Hepatites B e C, toxoplasmose e rubéola e ausência de doenças autoimunes, malformação fetal e síndromes genéticas. A análise multivariada foi realizada para avaliar a associação entre os níveis de IgG em cordão umbilical e as taxas de transferência de anticorpos com a concentração materna de IgG, a corionicidade da gestação, a presença de insuficiência placentária, a restrição de crescimento intrauterino, a idade gestacional de nascimento, o peso de nascimento, o tabagismo, a doença materna e a via de parto. Resultados: a concentração de IgG total em cordão umbilical apresentou correlação positiva com os níveis maternos séricos de IgG total e a idade gestacional do parto. Os níveis de IgG total em cordão umbilical foram

significativamente menores em gestações monocoriônicas quando comparadas às dicoriônicas. A taxa de transferência de IgG total apresentou correlação positiva com a idade gestacional do parto, mas negativa com as concentrações maternas de IgG total. As concentrações de IgG contra EGB e LPS de *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp. apresentaram associação com os níveis maternos de IgG específicos contra esses抗ígenos e com o diabetes. Os níveis de IgG contra LPS de *Klebsiella* spp. também foram associados com o peso de nascimento e com hipertensão materna. As taxas de transferência de IgG contra EGB e LPS de *Pseudomonas* spp. apresentaram correlação com os níveis maternos de IgG específicos contra os抗ígenos referidos. A taxa de transferência de IgG contra EGB também esteve associada com a idade gestacional do parto, enquanto a taxa de transferência de IgG contra LPS de *Pseudomonas* spp. apresentou correlação com diabetes. Não houve correlação entre a taxa de transferência de IgG contra a LPS de *Klebsiella* spp. com nenhum fator analisado. Conclusão: em gestações gemelares, a concentração total de IgG em cordão umbilical foi influenciada pela concentração materna de IgG total, pela idade gestacional do parto e pela corionicidade placentária. As concentrações de IgG total foram significativamente menores em gestações monocoriônicas que em dicoriônicas. As concentrações séricas de IgG contra EGB e LPS de *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp. em cordão umbilical apresentaram associação com os níveis maternos de IgG específicos contra esses抗ígenos e com a presença de diabetes. Todos os outros parâmetros estudados apresentaram diferentes associações com as concentrações de IgG e com as taxas de transferências de IgG específicas contra cada抗ígeno investigado.

Descritores: gravidez de gêmeos; imunoglobulinas; imunoglobulina G; placenta; *Streptococcus agalactiae*; lipopolissacarídeos; klebsiella; pseudomonas.

Abstract

Stach SCL. *Placental transfer of immunoglobulins in twin pregnancies* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016".

There is a lack of data in the literature regarding the placental transport of immunoglobulins in twin pregnancies. The objective of this study was to examine factors that influence the concentration of immunoglobulin G (IgG) in cord serum and the placental transfer of total IgG and of IgGs against *Klebsiella* spp. LPS and *Pseudomonas* spp. LPS, and Group B *Streptococcus* (GBS). Methods: A prospective study was conducted at the Hospital das Clinicas in the São Paulo University Medical School between 2012 and 2013. Maternal and umbilical cord samples were collected at birth. The inclusion criteria were twin pregnancies with no evidence of infection with HIV, cytomegalovirus, hepatitis B or C, toxoplasmosis, or rubella. Twin pregnancies with evidence of autoimmune disease, fetal malformations or genetic syndromes were also excluded. Stepwise multivariate regression analysis was used to evaluate the association between cord serum concentrations of IgG and IgG transfer ratios as well as the associations between cord serum concentrations of IgG and maternal serum concentrations of IgG, pregnancy chorionicity, the presence of an abnormal umbilical artery pulsatility index, intrauterine growth restriction, gestational age at delivery (GAD), birth weight, placental weight, smoking during pregnancy, maternal disease, and mode of delivery. Results: Total IgG concentrations in cord sera were positively correlated with total IgG concentrations in maternal sera. Cord serum concentrations of IgG were also positively correlated with GAD. Cord serum concentrations of total IgG were significantly lower in

monochorionic versus dichorionic pregnancies. The total IgG transfer ratio was positively correlated with GAD but was inversely correlated with total IgG concentration in maternal serum. Cord serum concentrations of IgGs against GBS, *Klebsiella* spp. LPS and *Pseudomonas* spp. LPS were significantly associated with maternal concentrations of specific IgGs and the presence of maternal diabetes. Cord serum concentrations of anti-*Klebsiella* spp. LPS IgG were also correlated with birth weight and the presence of maternal hypertension. The transfer ratios of IgGs against GBS and *Pseudomonas* spp. LPS were related to maternal concentrations of specific IgGs. The transfer ratios of IgGs against GBS and *Pseudomonas* spp. LPS were also associated with GAD and the presence of diabetes, respectively. None of the examined parameters were found to be correlated with the transfer ratio of IgG against *Klebsiella* spp. LPS. Conclusions: In twin pregnancies, in addition to the influences of maternal serum concentrations of total IgG and of GAD, chorionicity was also found to influence cord serum concentrations of total IgG. Compared with dichorionic twins, monochorionic twins were found to have lower concentrations of total IgG in cord sera. Umbilical cord serum concentrations of IgGs against GBS, *Klebsiella* spp. LPS and *Pseudomonas* spp. LPS were associated with maternal serum concentrations of specific IgGs and with maternal diabetes. All of the remaining parameters that were investigated had varying associations with concentrations of specific IgGs in cord serum and with placental transfer and were dependent on the antigen being studied.

Descriptors: pregnancy, twin; immunoglobulins; immunoglobulin G; placenta; *Streptococcus agalactiae*; lipopolysaccharides; klebsiella; pseudomonas.

1-Introdução

A incidência de gestações gemelares tem aumentado globalmente nos últimos anos. Para exemplificar esse fato, podemos citar o aumento na taxa de nascimento de gestações múltiplas da ordem de 76%, entre 1980 e 2009, nos Estados Unidos, saltando de 18,9 para 33,3 a cada 1000 nascimentos nesse período ⁽¹⁾. No Brasil, essa taxa foi de 15,7 para 19, a cada 1000 nascidos vivos, no período entre 1994 e 2009 ⁽²⁾. Esse fenômeno está relacionado basicamente com o uso de técnicas de reprodução assistida e ao fato de mulheres postergarem a gestação até idades mais avançadas ^(3,4).

Gestações múltiplas apresentam piores resultados perinatais quando comparadas com gestações únicas. Assim, gestações gemelares apresentam maior risco de prematuridade, restrição de crescimento intrauterino, baixo peso ao nascimento, mortalidade geral e mortalidade por causas infecciosas ⁽⁵⁾. Gêmeos têm também maior incidência de admissão em unidade de terapia intensiva ⁽⁶⁾.

Globalmente, a infecção é uma importante causa de morte neonatal ⁽⁷⁾. O recém-nascido pré-termo apresenta uma maior susceptibilidade à infecção ⁽⁸⁾.

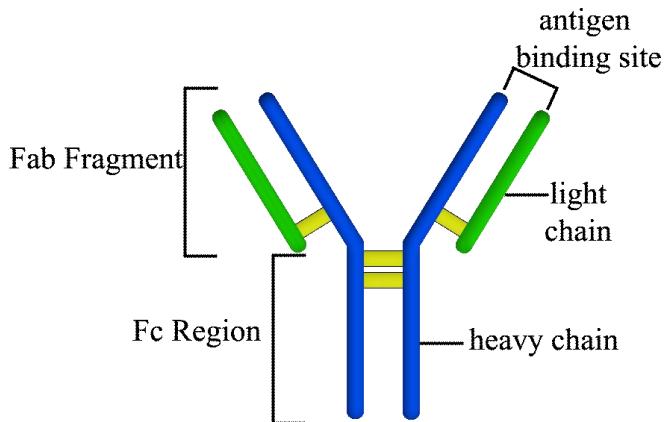
Em 1892, Ehrlich observa que a imunidade neonatal depende da transferência intrauterina de anticorpos, após a realização de uma série de experiências com ratos, ocasião em que observa que a prole de ratas imune a determinada toxina era também imune a esse antígeno ⁽⁹⁾. Na década de 60, Brambell e Lond observam que a transferência de anticorpos da mãe para os

descendentes é realizada, em coelhos, por meio do saco vitelínico na vida intrauterina, e em ratos, principalmente via intestino, na vida pós-natal. Os autores postulam a hipótese de que, nestas espécies, a transferência de imunoglobulina G (IgG), a única transportada de modo eficiente para a descendência, é mediada por um receptor, que se localiza em vesículas intracelulares. A IgG é captada por meio de pinocitose para dentro dessas vesículas, onde se conecta a um receptor, o qual se liga à porção do fragmento cristalizável (Fc) da IgG. Grande parte da imunoglobulina não ligada ao receptor é degradada, mas a IgG ligada ao receptor é lançada na circulação da prole. Portanto, esse receptor regula tanto a transferência como o catabolismo de imunoglobulinas⁽¹⁰⁾.

Na raça humana, a transmissão de IgG ocorre por meio da placenta. Das cinco subclasses de imunoglobulinas, apenas a IgG cruza a placenta de modo eficiente. A barreira placentária é composta de sinciciotrofoblasto, citotrofoblasto, lamina trofoblástica basal, tecido conjuntivo e endotélio capilar fetal. A partir do segundo trimestre, o citotrofoblasto torna-se rarefeito, permitindo o contato direto do sinciciotrofoblasto com o endotélio fetal, formando a membrana sinciocapilar⁽¹¹⁾. Portanto, a IgG deve atravessar tanto o sinciciotrofoblasto como o endotélio fetal para a transferência intrauterina. Em 1996, autores como Simister *et al.* e Leach *et al.* comprovam a presença de um receptor que se liga à porção Fc da IgG no sinciciotrofoblasto, denominado receptor Fc neonatal (FcRn)^(12,13).

A estrutura da IgG é composta de 4 cadeias de polipeptídeos, sendo 2 cadeias leves e 2 pesadas unidas em forma de Y. Cada cadeia possui regiões constantes e variáveis. Em cada braço da estrutura em Y do anticorpo, as cadeias leve e pesada são unidas por pontes de dissulfeto. Cada braço é denominado de fragmento Fab (“*Fragment antigen binding*”) que é a região que se une ao antígeno. O tronco dessa estrutura em Y é a região denominada Fc, que interage com as moléculas efetoras, como o FcRn⁽¹⁴⁾ (Fig 1).

Figura 1: Estrutura da imunoglobulina G



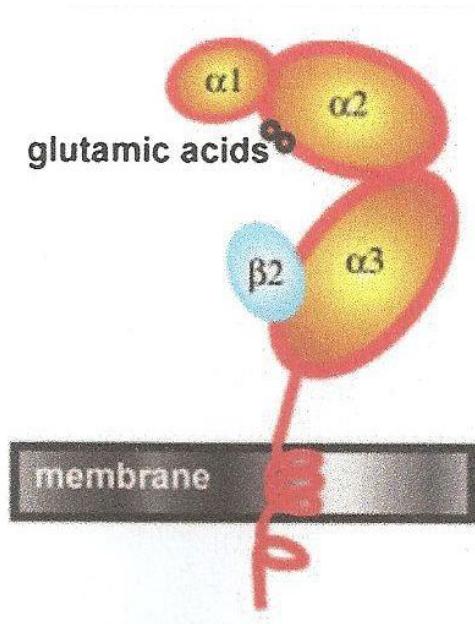
Azul= cadeia pesada; Verde= cadeia leve. Fc region= região Fc e Fab Fragment= fragmento que apresenta a região ligadora de antígenos.

A imunoglobulina G é composta por 2 cadeias leves e 2 pesadas. Apresenta uma porção Fc que se liga a moléculas efetoras e 2 fragmentos Fab, que se ligam ao antígeno.

Fonte: Cheguevara Afaneh, Meredith J. Aull and Sandip Kapur (2012). Modern Immunosuppression Regimens in Kidney Transplantation, Current Concepts in Kidney Transplantation, Dr. Sandip Kapur (Ed.), ISBN: 978-953-51-0900-6, InTech, DOI:10.5772/54092. Available from: <http://www.intechopen.com/books/current-concepts-in-kidney-transplantation/modern-immunosuppression-regimens-in-kidney-transplantation>. Obtida permissão do uso da figura.

O FcRn é uma molécula composta de uma cadeia α e de uma microglobulina $\beta 2$, estruturalmente semelhante à molécula do complexo de histocompatibilidade (MHC) classe 1 (Fig 2). A cadeia α consiste de 3 domínios extracelulares: $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, uma porção transmembrana e uma pequena porção intracitoplasmática. A microglobulina $\beta 2$ associa-se à porção $\alpha 3$, e é indispensável para a ligação à IgG (Fig 3). FcRn se liga a região CH2-Ch3 da IgG. FcRn interage com a porção Fc da IgG através de pontes de sal que ocorrem entre as histidinas da porção Fc da IgG e o ácido glutâmico do domínio $\alpha 2$ do FcRn⁽¹⁵⁾ (Fig 3).

Figura 2: Estrutura do receptor Fc neonatal (FcRn)

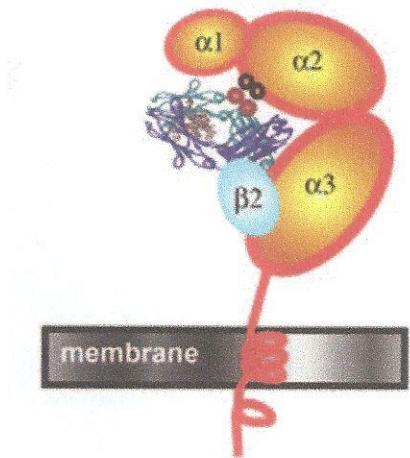


Cadeia α = vermelho. Microglobulina $\beta2$ = azul. Glutamic acids= ácido glutâmico. Membrane= membrana

FcRn é composto de uma cadeia α (vermelho) e de uma microglobulina $\beta2$ (azul). Os ácidos glutâmicos são importantes para a ligação pH dependente à IgG. O FcRn se liga à porção Fc da imunoglobulina.

Fonte: Ellinger I, Fuchs R. hFcRn-mediated transplacental immunoglobulin G transport: Protection of and threat to the human fetus and newborn. Wien Med Wochenschr. 2012; 162 (9-10): 207-213. Obtida permissão do uso da figura.

Figura 3: Ligação do Receptor Fc neonatal (FcRn) à Imunoglobulina G



Cadeia α do FcRn= vermelho. Microglobulina $\beta2$ do FcRn= azul.

FcRn se liga à IgG por meio de pontes de sal que ocorrem entre a histidina da porção Fc da IgG e o ácido glutâmico do domínio $\alpha2$ do FcRn. A microglobulina $\beta2$ do FcRn também é fundamental para essa interação.

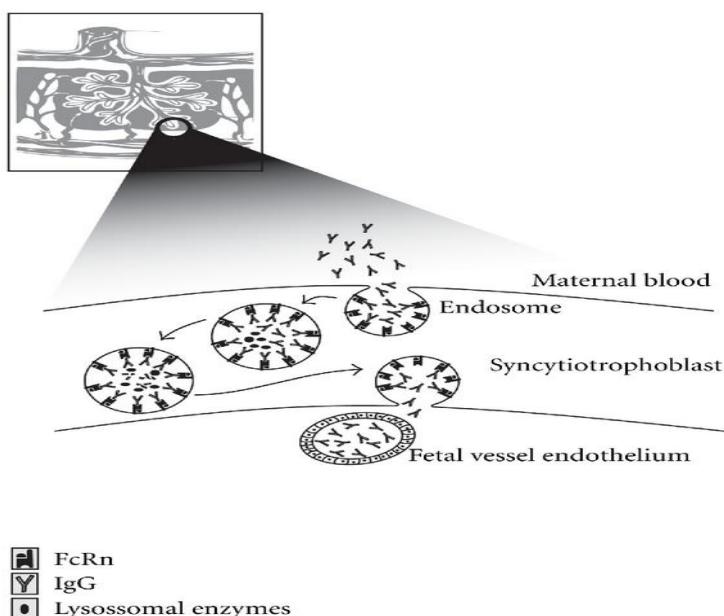
Fonte: Ellinger I, Fuchs R. hFcRn-mediated transplacental immunoglobulin G transport: Protection of and threat to the human fetus and newborn. Wien Med Wochenschr. 2012; 162 (9-10): 207-213. Obtida permissão do uso da figura.

A ligação do FcRn à IgG ocorre de modo pH dependente^(12,13,15), através dos ácidos glutâmicos do domínio $\alpha2$ do FcRn⁽¹⁵⁾. Assim, em pH ácido (pH= 6), existe alta afinidade do FcRn à IgG, mas em pH fisiológico (pH=7,5), ela é baixa. Portanto, o FcRn não é capaz de se ligar à IgG na porção apical do sinciciotrofoblasto. O modelo aceito atualmente é que a IgG, presente em altas quantidades na circulação materna, sofre um processo de pinocitose no sinciciotrofoblasto. Aqui, dentro de endossomas, onde o pH é ácido, ocorre a ligação com o FcRn. A IgG ligada ao FcRn é transportada à porção basolateral do sinciciotrofoblasto, onde, na presença de pH fisiológico é liberada^(12,13,15,16) (Fig 4).

Leach *et al.* propõem que o FcRn tem também função de proteção ao catabolismo da IgG, como proposto por Brambell⁽¹³⁾. O FcRn também é

expresso em células endoteliais, epiteliais e hematopoiéticas⁽¹⁵⁾. Assim, a IgG que se liga ao FcRn dentro de endossomas é protegida da degradação intracelular nos lisossomos⁽¹³⁾. Acredita-se que este processo ocorra principalmente em células endoteliais⁽¹⁵⁾. Isto explica a longa meia-vida da IgG no plasma, quando comparado a outras proteínas⁽¹⁵⁾. Atualmente é controverso na literatura se o FcRn é expresso também no endotélio fetal. Assim, é possível a existência de outro receptor para o transporte através do endotélio fetal⁽¹⁶⁾.

Figura 4: Transporte da Imunoglobulina G através do sinciciotrofoblasto



O transporte da IgG ocorre através do sinciciotrofoblasto. A IgG sofre endocitose. O FcRn presente nos endossomas, em pH ácido, liga-se à IgG. A IgG ligada ao FcRn é protegida da degradação nos lisossomos e sofre uma transcritose à membrana basolateral. Aqui o endossoma se funde à membrana e, na presença de pH fisiológico, promove a liberação da IgG do FcRn.

Fonte: Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG Placental Transfer in Healthy and Pathological Pregnancies. Clin Develop Immunol. 2012, Article ID 985646, 13 pages, 2012. doi:10.1155/2012/985646. Obtida permissão do uso da figura.

Atualmente sabe-se que o transporte de IgG pela placenta depende de sua subclasse. Existem 4 subclasses de IgG: 1, 2, 3 e 4. Estas subclasses apresentam diferentes regiões Fc, que promovem diferentes afinidades pelo

receptor FcRn. Há um transporte preferencial de IgG1, seguido por IgG4, depois IgG3 e por último IgG2, que apresenta a menor afinidade pelo FcRn (17,18,19). A resposta imunológica, ou seja, o tipo de imunoglobulina produzida, depende do estímulo antigênico. Assim, os anticorpos produzidos contra proteínas virais e antitoxinas geralmente são da classe IgG1, enquanto os anticorpos produzidos contra bactérias encapsuladas (Ex: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* do grupo B) são predominantemente IgG2 e as imunoglobulinas produzidas contra os lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram-negativas são principalmente IgG1 e IgG2 (16,17,20,21). Dessa maneira, a menor transferência de imunoglobulinas IgG2 e IgG3 poderia estar implicada em maior susceptibilidade dos neonatos a determinadas infecções (17).

Outro fator que influencia a transferência de anticorpos transplacentários é a idade gestacional. Assim, a passagem de imunoglobulinas pela placenta se inicia por volta de 13 semanas de gestação e apresenta um aumento gradual, atingindo o seu pico no último mês de gestação (16,18,21,22). A concentração de IgG no cordão umbilical ao nascimento, em gestações de termo, tende a exceder os níveis maternos, indicando um transporte ativo através da placenta (16,18,21,22,23). Observa-se aumento linear na transferência de IgG total, bem como de todas as suas subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) durante a gestação (17,18,21). Entretanto, o maior aumento ocorre para IgG1, que é a principal classe de imunoglobulina presente no termo da gestação (18,22,23). IgG2 apresenta o menor aumento de concentração ao longo da gestação quando comparado com outras imunoglobulinas (18,23). Portanto, uma consequência direta desse fato é que recém-nascidos pré-termo apresentam menor concentração de imunoglobulinas circulantes, o que pode estar implicado em maior risco infeccioso (24). Assim, foi demonstrado que neonatos prematuros apresentam menor concentração de anticorpos contra sarampo, rubéola, varicela zoster, caxumba, difteria e tétano, herpes vírus tipo 1, vírus sincicial respiratório, *Haemophilus influenzae* e pneumococo (24,25,26).

Atualmente, sabe-se que o transporte intrauterino de anticorpos depende dos respectivos níveis maternos. Existe uma forte correlação entre os níveis maternos e os do cordão umbilical de imunoglobulinas (16). Assim, Van der Zwet

et al. observam que o principal determinante dos níveis neonatais de anticorpos contra o vírus de *Varicella Zoster* é o nível materno desses anticorpos⁽²⁷⁾. Van den Berg *et al.* também observam uma forte correlação entre os níveis maternos e neonatais de anticorpos contra coqueluche, difteria, tétano, *Haemophilus influenzae* do tipo b e *Neisseria meningitidis* do serogrupo C⁽²⁴⁾. Entretanto, o transporte de imunoglobulinas por meio do FcRn pode estar saturado diante dos altos níveis maternos de anticorpos. Assim, Mäntyjärvi *et al.* observam, na Finlândia, que em gestações de termo, os níveis de anticorpos contra o vírus influenza A2/Hong kong tendem a ser maiores que os maternos em 33,1 % das gestações, quando a concentração materna desse anticorpo é normal ou baixa. Porém, nos casos em que a concentração materna desses anticorpos é alta, apenas 11,8% dos recém-nascidos apresentam valores acima dos maternos⁽²⁸⁾. Hartter *et al.*, estudando a transferência transplacentária de anticorpos na população alemã e nigeriana, observam que o alto nível materno de imunoglobulinas presente na população africana reduz a concentração de anticorpos total e contra o sarampo que atravessa a placenta. Isso resulta uma concentração neonatal de anticorpos contra o sarampo duas vezes menor na população nigeriana⁽²⁹⁾. Okoko *et al.* também observam que a hipergamaglobulinemia materna reduz a transferência transplacentária de anticorpos contra o vírus *Herpes simplex*, o vírus sincicial respiratório, o vírus da varicela zoster e o Pneumococo. Os autores observam que, nessa condição, há a diminuição da transferência de IgG1 e IgG2, mas não de IgG3 e IgG4⁽³⁰⁾.

Algumas patologias, como a malária e a infecção por HIV, podem afetar a transferência transplacentária de anticorpos. Assim, é descrita menor transferência placentária de anticorpos antimalaria, contra o vírus do herpes tipo 1, o vírus sincicial respiratório e o vírus da varicela zoster em pacientes com malária^(30,31). Acredita-se que isso esteja relacionado a lesões placentárias provocadas por essa patologia⁽³⁰⁾. Menor transporte de anticorpos contra a malária, o vírus da varicela zoster, o toxoide tetânico, o vírus do sarampo, a estreptolisina O e o *Streptococcus pneumoniae* é descrito em pacientes com infecção pelo HIV^(31,32).

O recém-nascido apresenta maior susceptibilidade a infecções devido à imaturidade do seu sistema imunológico⁽¹⁶⁾ relacionada à menor resposta tanto humoral como celular do seu sistema de defesa^(16,33). Assim, a transmissão de anticorpos intrauterino, basicamente IgG como descrito acima, é importante para conferir uma imunidade passiva a curto prazo ao neonato, até que o seu organismo tenha melhores condições de defesa. Após o nascimento, o recém-nascido, ao amamentar, recebe um suporte imunológico adicional com a aquisição da imunoglobulina A (IgA)⁽¹⁶⁾.

Em países em fase de desenvolvimento, as principais bactérias envolvidas nas infecções neonatais, em unidade de terapia intensiva, são as gram negativas, como a *Klebsiella spp.* e a *Pseudomonas spp.*, enquanto, em países desenvolvidos, os principais agentes etiológicos envolvidos nessas infecções são as bactérias gram positivas, como o *Streptococcus* do grupo B e o *Stafilococcus coagulase negativo*^(8,34).

Um estudo multicêntrico realizado por Couto *et al.*, no Brasil, revela que as principais bactérias causadoras de sepsis em unidades de terapias intensivas neonatais são a *Klebsiella spp.*, seguido da *E coli* e da *Pseudomonas spp.*⁽³⁵⁾. Lipopolissacarídeos (LPS) são moléculas na membrana externa de bactérias gram-negativas relacionadas com uma maior virulência. Silveira Lessa *et al.* observam que a concentração em cordão umbilical de anticorpos contra LPS da *Klebsiella spp.* é menor em recém-nascidos pré-termo que em suas mães e a concentração de IgG anti-LPS de *Pseudomonas* é maior em recém-nascidos de termo que em suas mães⁽³⁶⁾.

O *Streptococcus* do grupo B permanece como o principal causador de sepsis neonatal em países desenvolvidos, mesmo com a quimioprofilaxia intraparto⁽³⁷⁾. Esse agente pode estar envolvido tanto na ocorrência da sepsis precoce (antes do 7º dia de vida) como na tardia. O *Streptococcus* do grupo B apresenta vários sorogrupos, sendo que o sorogrupo 1 A está mais relacionado com a sepsis precoce, enquanto o sorogrupo 3 é o agente causador de 90% dos casos de sepsis tardia. Lin *et al.*, em 2 estudos multicêntricos americanos, observam que o risco de sepsis precoce diminui com o aumento dos níveis maternos de IgG contra esse patógeno. Os autores notam que os neonatos

cuja mãe apresenta níveis de IgG contra o sorogrupo 1 A $\geq 5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ apresentam 88% menor risco de desenvolvimento de sepsis precoce, enquanto níveis maternos $\geq 10 \text{ }\mu\text{g/mL}$ contra o sorotipo 3 produzem um bom nível de proteção neonatal^(38,39).

Os estudos realizados para investigar a transferência transplacentária de anticorpos foram realizados basicamente em gestações únicas.

Apenas um estudo investigou a transferência transplacentária de imunoglobulinas exclusivamente em gestações gemelares. Bryan *et al.*, em um estudo com 50 pares de gemelares, observam nível de IgG maior no cordão umbilical que no sangue materno, indicando transporte ativo de imunoglobulinas também em gestações gemelares. Os autores não observam correlação entre a zigoticidade e os níveis neonatais de anticorpos. O principal fator relacionado com o nível de IgG em um neonato é o nível de imunoglobulina do irmão⁽⁴⁰⁾.

Esse estudo foi realizado há mais de 30 anos, quando o manejo das gestações era realizado de modo diverso do atual. Hoje em dia, sabe-se que a corionicidade é mais importante que a zigoticidade como fator prognóstico dos resultados perinatais^(41,42). Assim, é de suma importância o conhecimento da corionicidade da gestação múltipla para a sua condução durante o pré-natal⁽⁴³⁾, uma vez que gestações monocoriônicas apresentam pior prognóstico, como maior risco de óbito fetal, enterocolite necrotizante, neuromorbidade, prematuridade, restrição de crescimento intrauterino, admissão em unidade de terapia intensiva neonatal e hemorragia intraventricular grau 3 e 4^(44,45).

Assim, não é conhecida a influência da corionicidade na transferência de imunoglobulinas intrauterinas, como também não há estudos sobre a transferência de imunoglobulinas contra patógenos específicos em gestações múltiplas. Portanto, tendo em vista a escassez de estudos na literatura sobre a transferência transplacentária de anticorpos em gestações gemelares, o objetivo deste estudo é investigar os fatores que se relacionam com a passagem intrauterina de IgG total, IgG contra o *Streptococcus* do grupo B e contra o LPS da *Klebsiella* sp e da *Pseudomonas* sp em gestações múltiplas.

2- Resumo do plano inicial

O projeto de pesquisa original foi dividido em 2 projetos, sendo uma parte realizado pelo departamento de obstetrícia e outra pelo departamento de pediatria. O projeto de pesquisa original tinha como objetivos:

1- Estabelecer os valores de referência de IgG total em sangue de cordão umbilical de gestações gemelares e examinar sua correlação com a concentração de IgG total no sangue materno. Também seria analizado sua correlação com a idade gestacional do parto, com o peso de nascimento, com a corionicidade da gestação, com o sexo dos recém-nascidos, com a zigoticidade e com a presença de insuficiência placentária.

2- Estudar a concentração de anticorpos anti-*Streptococcus B* e anti-lipopolissacáideos de *Klebsiella spp.* e de *Pseudomonas spp.* presentes no cordão umbilical de cada gêmeo e comparar com as respectivas concentrações encontradas no sangue materno, além de comparar com o status da colonização materna por *Streptococcus B* durante a gestação. Também apresentava como objetivos descrever a evolução clínica dos recém-nascidos durante a internação e analisar a associação entre episódios de infecção neonatal e a concentração de imunoglobulinas totais e contra anti-*Streptococcus B* e anti-LPS de *Klebsiella spp.* e de *Pseudomonas spp.* no sangue do cordão umbilical.

3- Estudar a presença do FcRn na interface materno-placentária de gestações gemelares.

A evolução clínica dos recém-nascidos e a análise da correlação entre a presença de infecção neonatal com a concentração de imunoglobulinas em sangue de cordão umbilical foi realizada pelo departamento de pediatria.

Os outros objetivos que constavam do projeto inicial estão em nosso subprojeto de pesquisa. Entretanto, o estudo da presença do FcRn na interface materno-placentária não foi ainda realizado por nós, não sendo, portanto, parte desta tese.

O tamanho amostral calculado na ocasião do projeto foi de 44 gestações gemelares. Foram incluídas no projeto 58 gestações gemelares que cumpriram os critérios de inclusão. Uma gestação foi excluída das análises devido ao diagnóstico pós-natal de malformação cardíaca em um dos gêmeos. Em duas gestações (1,72%) a quantidade de sangue coletado nos cordões foi suficiente apenas para dosagem de IgG total. Assim, para o estudo de IgG total fizeram parte 57 gestações e 114 recém-nascidos. Já para o estudo de IgG anti-LPS de *Klebsiella* spp. e de *Pseudomonas* spp. e anti-*Streptococcus B* fizeram parte 55 gestações e 110 recém-nascidos.

2.1 Objetivos

Esta tese teve como objetivos:

1. Estabelecer as concentrações de IgG total em sangue de cordão umbilical e sua taxa de transferência em gestações gemelares no momento do parto:
 - 1a. Examinar a correlação com as concentrações no sangue da mãe;
 - 1b. Examinar a correlação, segundo a idade gestacional;
 - 1c. Examinar a correlação com o peso de nascimento e a presença de restrição de crescimento intra-uterino;
 - 1d. Examinar a correlação com a corionicidade, o sexo das crianças, a presença de sinais de insuficiência placentária, o peso da placenta, a via de parto, a idade materna, a cor materna, a presença de doença materna pré-gestacional, a presença de diabetes e de hipertensão na gestação.
2. Estudar a concentração de anticorpos anti-*Streptococcus* B e anti-lipopolissacarídeos de *Klebsiella* spp. e de *Pseudomonas* spp. presentes no cordão umbilical de cada gêmeo e suas respectivas taxas de transferência no momento do parto:
 - 2a. Comparar com as concentrações encontradas no sangue materno;
 - 2b. Comparar com o status da colonização materna por *Streptococcus* B durante a gestação.
 - 2c. Examinar suas correlações com a idade gestacional de nascimento, o peso de nascimento, a presença de restrição de crescimento intrauterino, a corionicidade, o sexo das crianças e a presença de sinais de insuficiência placentária.

2d. Examinar suas correlações com o peso da placenta, a via de parto, a idade materna, a cor materna, a presença de doença materna pré-gestacional, a presença de diabetes e de hipertensão na gestação.

3- Projeto de Pesquisa

Projeto de Pesquisa

Transferência de anticorpos em gestações múltiplas

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Adolfo Wenjaw Liao

Pesquisador executante: Sonia Christina Leme Stach

Co-autores:

Departamento de Obstetrícia e Ginecologia – Disciplina de Obstetrícia:
Profa. Dra. Maria de Lourdes Brizot, Prof. Dr. Marcelo Zugaib

Departamento de Pediatria – Disciplina de Neonatologia: Profa. Dra. Vera Lúcia Jornada Krebs, Prof. Dr. Werther Brunow de Carvalho

Departamento de Pediatria – Disciplina de Imunologia: Dra. Ana Lúcia Silveira Lessa-Marques, Dra. Simone Corrêa da Silva, Dra. Patricia Palmeira Daenekas Jorge, Profa. Dra. Magda Maria Sales Carneiro-Sampaio.

INTRODUÇÃO

Com o avanço das técnicas de reprodução assistida, tem-se observado um aumento progressivo do número de recém-nascidos gemelares nas Unidades de Terapia Intensiva neonatal. Estes neonatos apresentam risco elevado de eventos mórbidos e óbito no período neonatal, relacionados a fatores como prematuridade, restrição de crescimento intrauterino, baixo peso ao nascimento e outros.

As gestações múltiplas apresentam maior risco de complicações maternas, fetais e neonatais, portanto, a Clínica Obstétrica do HC-FMUSP possui ambulatório específico para acompanhar essas gestações e, após o nascimento, os recém-nascidos são acompanhados no Berçário Anexo à Maternidade (BAM). Devido a esta característica, a freqüência de recém-nascidos múltiplos é maior nesse serviço em relação à população geral, associando-se à elevada morbimortalidade e maior tempo de internação. O BAM contém 63 leitos e recebe em média 180 recém-nascidos por mês. Para enfatizar o maior risco associado aos recém-nascidos múltiplos ilustraremos a casuística do ano de 2006, em que nasceram vivos 2.062 RN, dos quais 6,7% ($n=139$) foram provenientes de gestações múltiplas e 64% ($n=89$) desses, pré-termo, enquanto a taxa de prematuridade entre os não gemelares foi de 28,4%. As freqüências nos gemelares comparada aos únicos também foi significativamente maior para os seguintes parâmetros: RN de baixo peso (73,4% *versus* 24,6%); RN de muito baixo peso (14,4% *versus* 5,1%) e mortalidade (7,9% *versus* 3,7%). Todos os RN gemelares que faleceram eram pré-termo, enquanto a taxa de prematuridade entre os óbitos de RN únicos foi de 84,5%. Analisando-se a mortalidade por faixa de peso de nascimento, verificou-se influência da gemelaridade sobre a taxa de óbitos apenas entre os RN de muitíssimo baixo peso.

No início deste século, alguns autores destacaram que infecções representam uma das principais causas de mortalidade e seqüelas tardias entre recém-nascidos de muito baixo peso nas Unidades de Terapia Intensiva. Entre os principais fatores de risco relacionados à sepse nestes neonatos destacam-se: culturas maternas (vaginal ou anorretal) positivas para *Streptococcus* do grupo beta hemolítico (EGB) no momento do parto, rotura prematura de membranas (igual ou superior a 18 horas), corioamnionite, baixo peso ao nascimento, prematuridade e febre materna intraparto.

Lin *et al.* (2001) demonstraram que os RN filhos de mães com níveis de anticorpos anti-EGB sorotipo Ia maior que 5 μ g/ml, apresentavam risco de desenvolver sepse por esta bactéria 88% menor em relação aos filhos de mães com níveis de anticorpos anti-EGB inferiores a 0,5 μ g/ml. Estudo semelhante realizado em 2004 mostrou que os RN filhos de mães com níveis de anticorpos anti-EGB sorotipo III acima de 10 μ g/ml apresentavam risco de desenvolver sepse por esta bactéria 91% menor em relação aos filhos de mães com níveis inferiores a 2 μ g/ml (Lin, 2004).

No Berçário anexo à Maternidade do Hospital das Clínicas (BAM), dois estudos analisaram a passagem transplacentária de anticorpos para *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, respectivamente. Carvalho *et al.* (1999) avaliaram os anticorpos anti-*Streptococcus pneumoniae* sorotipos 1, 3, 6B, 9V e 14, em recém-nascidos de termo e pré-termo entre 32 e 36 semanas de idade gestacional. A transmissão transplacentária para os RN pré-termo (RNPT) foi menor em relação aos RN de termo (RNT) para todos os sorotipos. Nagao *et al.* demonstraram concentrações mais baixas de anticorpos anti-*Haemophilus influenzae* tipo B em RN pré-termo, quando comparados aos RNT.

Em relação ao *Streptococcus* B, a ocorrência de passagem transplacentária de anticorpos contra proteínas específicas da cápsula do EGB foi demonstrada recentemente. Não foram consideradas, entretanto, as diferenças entre o RN de termo e o pré-termo (Manning, 2006).

Recentemente, em nosso meio, Brasil *et al.* (2008) analisaram a transferência transplacentária de anticorpos anti-Streptococcus B nos recém-nascidos de termo e pré-termo e demonstraram que a transferência de IgG e de anticorpos anti-EGB foi menos eficiente nos RNPT. A correlação positiva entre a concentração sérica de IgG e de anticorpos anti-EGB com a idade gestacional comprova a importância da prematuridade como fator determinante das baixas concentrações séricas destes componentes no repertório imunológico do recém-nascido.

Silveira-Lessa *et al.* (2011) estudaram a aquisição passiva de anticorpos IgG maternos reativos com os lipopolissacarídeos (LPS) de enterobactérias incidentes em infecções neonatais por recém-nascidos pré-termo e a termo. Observou-se que os níveis de IgG anti-LPS de *Klebsiella*, e de *E. coli* O26, O111 e O6 nos recém-nascidos pré-termos foram significativamente mais baixos quando comparados às suas respectivas mães, com taxas de transferência significativamente menores nos pré-termos nascidos abaixo de 33 semanas de gestação (exceto para O26) e nos pré-termos nascidos entre 33 e 36 e 6/7 semanas de gestação (exceto para *Klebsiella* e O111) quando comparados aos de termo ($p <0,05$). No entanto, entre os neonatos, níveis mais baixos de anticorpos IgG específicos foram observados somente para o LPS O111 no grupo de RNs pré-termo extremos ($p <0,05$) e para LPS O26 e *Pseudomonas* no grupo de RNs pré-termo tardios, ambos comparados aos RNs nascidos a termo ($p <0,05$). Os resultados sugeriram que, além da imunidade humoral, fatores intrínsecos e extrínsecos decorrentes da condição de prematuridade sejam preponderantes no desenvolvimento de infecções neonatais.

As primeiras evidências de transmissão de imunoglobulinas da mãe para o feto surgiram com Brambell e colaboradores há aproximadamente sessenta anos (Brambell *et al.*, 1949). Hoje sabemos que a única classe de anticorpo capaz de ser transportada da mãe para o feto é a imunoglobulina G (IgG). A passagem transplacentária inicia-se lentamente com aproximadamente 16 semanas de gestação, mas entre a 22^a e 26^a semana o nível de IgG fetal

aumenta rapidamente e dobra de concentração ao final da gestação (Simister, 2003).

A IgG se desloca da circulação materna aos capilares fetais mediada pelo receptor Fc neonatal (FcRn). Em humanos, este receptor é expresso no sinciciotrofoblasto e liga-se com alta afinidade à IgG, quando em pH ácido (<6,5), mas não em pH fisiológico (7,4).

Assim, a passagem da IgG ocorre a partir do momento em que o sinciciotrofoblasto internaliza fluido materno em endossomos; as moléculas de IgG ali presentes, juntamente com os receptores, são gradualmente acidificados permitindo a forte ligação entre ambos e proteção contra a ação de enzimas lisossomais. A vesícula se funde à membrana na face fetal do sinciciotrofoblasto, a IgG é dissociada pela ação do pH fisiológico e cai na circulação (Simister & Story, 1997).

A quantidade de IgG transmitida depende da quantidade de receptores na superfície celular e a taxa de transmissão depende das taxas de ligação e de liberação de moléculas de IgG desses receptores. O caráter seletivo do processo depende de uma ou de ambas as taxas e da variação entre diferentes subclasses de IgG, ocorrendo preferencialmente para IgG1>IgG3>IgG4>IgG2.

A análise da estrutura co-cristal da ligação Fc-FcRn revela que o FcRn liga-se a região de dobradiça CH2-CH3 dos anticorpos IgG, uma região versátil que também se liga a proteína A estafilocócica e proteína G estreptocócica e fator reumatóide (Roopenian & Akilesh, 2007).

Além de seu papel crítico na transferência de IgG para o feto ou neonato, o FcRn é responsável por aumentar a meia-vida da IgG no soro de adultos. O FcRn é também expresso em muitos outros tecidos em animais adultos, incluindo o homem, tais como barreira hemato-encefálica, glomérulos dos rins e epitélio intestinal. No entanto, a expressão deste receptor nestes locais ainda necessita de mais estudos com o objetivo de modular o transporte específico de IgG para promover a defesa do hospedeiro ou para controlar a deposição de imune-complexos (Roopenian & Akilesh, 2007).

Em recém-nascidos gemelares não há estudos sobre a expressão de receptores FcRn na placenta e sobre possíveis diferenças na transferência de anticorpos maternos.

JUSTIFICATIVA

Não há estudos na literatura examinando o efeito da gestação múltipla nas concentrações séricas de anticorpos de recém-nascidos.

HIPÓTESE

O presente estudo baseia-se na hipótese de que, em gestações múltiplas, a passagem transplacentária de anticorpos maternos para os fetos ocorre de forma diferente da observada em gestações únicas. Essa diferença pode ser atribuída fundamentalmente ao desenvolvimento concomitante de dois conceptos no ambiente uterino, com massa placentária total distinta daquela encontrada habitualmente em gestações únicas. Essas diferenças induzem necessidades adaptativas extremas no organismo materno e pode repercutir na dinâmica de transferência placentária de anticorpos durante a gestação.

Conhecer os fatores que interferem na passagem transplacentária de anticorpos em gestações múltiplas constitui elemento importante para adequar o manejo clínico destas gestações, com o intuito de reduzir as taxas de morbidade e letalidade perinatais observadas, principalmente relacionadas a complicações infecciosas durante os primeiros dias e semanas de vida.

O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP é centro de referência terciário para o atendimento obstétrico e perinatal. Apresenta elevada freqüência de atendimento a gestações múltiplas, e sendo assim, constitui local propício para o desenvolvimento de estudo prospectivo para investigar a hipótese formulada.

OBJETIVOS

Objetivo Principal:

Examinar a transferência de anticorpos maternos nas gestações gemelares.

Objetivos Secundários: uma vez que a gestação gemelar tem várias particularidades que poderiam influenciar a transferência de anticorpos e a interpretação dos resultados é necessário avaliar os diferentes aspectos que possam interferir nesse processo:

1. *Estabelecer os valores de referência de IgG total em sangue de cordão de gestações gemelares:*

- 1a. Examinar a correlação com as concentrações no sangue da mãe;
- 1b. Examinar a correlação segundo a idade gestacional;
- 1c. Examinar a correlação com o peso e percentil de nascimento;
- 1d. Realizar análise comparativa segundo a corionicidade, o sexo das crianças, a zigoticidade, e presença de sinais de insuficiência placentária.

2. Estudar a concentração de anticorpos anti-Streptococcus B e anti-lipopolissacarídeos de Klebsiella e de Pseudomonas presentes no cordão umbilical de cada gêmeo:

- 2a. Comparar com as concentrações encontradas no sangue materno;
- 2b. Comparar com o status da colonização materna por *Streptococcus B* durante a gestação.
- 2c. Descrever a evolução clínica dos recém-nascidos durante a internação.
- 2d. Analisar a associação entre episódios de infecção neonatal e a concentração de imunoglobulinas no sangue do cordão umbilical.
- 2e. Analisar a associação entre episódios de infecção neonatal e a concentração de anticorpos anti-*Streptococcus B* no sangue do cordão umbilical.
- 2f. Analisar a associação entre episódios de infecção neonatal e a concentração de anticorpos anti-LPS de *Klebsiella* e de *Pseudomonas* no sangue do cordão umbilical.

3. Estudar a presença do FcRn na interface materno-placentária de gestações gemelares

- 3a. Avaliar a associação do tipo de placentação (monocoriônica ou dicoriônica) com a expressão de receptores na placenta;

CASUÍSTICA e MÉTODOS

Estudo prospectivo transversal envolvendo uma coorte de recém-nascidos vivos provenientes de gestações múltiplas acompanhadas no Setor

de gestações múltiplas da Clínica Obstétrica do HC-FMUSP com parto nesta instituição.

Critérios de inclusão

- a. gestação múltipla com pré-natal e parto realizados na instituição;
- b. ambos os fetos nascidos vivos e sem malformações ou síndromes genéticas;
- c. idade gestacional no parto \geq 26 semanas;
- d. perfil sorológico materno negativo para doença infecciosa recente por HIV, CMV, hepatites B e C, sífilis, toxoplasmose e rubéola, durante o pré-natal;
- e. ausência de doenças autoimunes maternas;
- f. ausência de rotura das membranas ovulares com período superior a 12 horas do parto;
- g. ausência de corioamnionite;

Critérios de exclusão

- a. diagnóstico pós-natal de infecções como HIV, CMV, hepatite B ou C, sífilis, toxoplasmose ou rubéola;
- b. diagnóstico pós-natal de malformação fetal ou síndromes genéticas;
- c. quantidade insuficiente de sangue coletado;

Tamanho amostral

Para demonstrar uma redução significativa de cerca de 20% na concentração de imunoglobulinas presentes no sangue de cordão decorrente de qualquer uma das características a ser estudada (por exemplo,

monocoriônicas versus dicoriônicas), o tamanho amostral necessário é de 44 casos.

Esta estimativa assume os valores médio e desvio-padrão (550 ± 110 mg/dl) de IgG encontrados em 18 recém-nascidos pré-termo, apresentados em dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da USP (Brasil, 2008), nível de significância de 5% e poder do teste de 80%.

Coleta das amostras

As coletas de sangue materno, cordão umbilical, placenta e colostro serão realizadas após consentimento informado.

A coleta do sangue materno (10 ml, tubo com gel separador) para dosagem da concentração de anticorpos maternos será realizada após a venopunção para manutenção do acesso venoso, antes da instalação da anestesia, nos minutos que antecedem o parto. Portanto, não será necessário realizar punção extra para esse fim.

Para a coleta do sangue dos cordões umbilicais, após o nascimento e clampeamento dos cordões, será realizado um segundo pinçamento em cada cordão conectado à placenta para obtenção de segmento do qual será realizada a coleta de sangue de artéria umbilical. Os 5 a 10mL de sangue obtidos serão colocados em tubo com gel separador.

Serão obtidas amostras de placenta para a análise da expressão dos receptores FcRn. A escolha do local da placenta para coleta da amostra será feita baseada na análise macroscópica da superfície materna, em região de aspecto homogêneo e normal. Nas placentas com massa placentária única ou naquelas já sabidamente monocoriônicas, as coletas serão próximas ao cordão umbilical de cada gêmeo.

Processamento das amostras

As amostras de sangue de cordão e sangue materno serão encaminhadas ao laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP e, após a retração do coágulo, serão centrifugadas, a 2.000 rpm por 10 minutos a 20°C e os soros aliquotados e condicionados a - 86°C. A seguir, serão transportadas para o Laboratório de Pediatria Clínica (LIM-36) do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da USP, onde serão realizadas as dosagens dos níveis séricos de anticorpos.

Os fragmentos placentários serão coletados e acondicionados em PBS estéril gelado para o transporte do Centro Obstétrico ao laboratório. Estes fragmentos serão divididos, sendo parte imersa em uma solução de RNA later e o restante congelado em nitrogênio líquido. Desta forma, fragmentos refrigerados e congelados serão transportados até o Laboratório de Pediatria Clínica (LIM-36), onde serão processados.

Expressão do FcRn Por RT-PCR

As porções da interface materno-placentária das gestantes serão descongeladas, divididas em fragmentos de pequenas dimensões e submetidos à extração do RNA total através do kit Allprep Mini Kit (Qiagen), que pode ser utilizado para isolar tanto RNA, como proteínas de células totais ou de tecidos. O método é baseado na lise diferencial de membranas celulares plasmáticas e nucleares por detergentes não-iônicos. O RNA é, então, isolado e a alta qualidade do RNA recuperado pode ser utilizada para qualquer aplicação, incluindo RT-PCR, hibridização, tradução *in vitro* e síntese de cDNA.

A estimativa da concentração de DNA nas amostras extraídas será realizada por espectrofotometria UV (Nanovue Plus, GE) em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm. O índice de pureza será determinado por meio da razão 260nm/280nm e considerado adequado na faixa de 1,8-2,0. O RNA total extraído será submetido à transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit SuperscriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Dois microgramas da amostra de RNA total serão

adicionados numa solução contendo 50µM de oligo (dT) “primer” e a solução será completada para um total de 12 µl com água DEPC 1:10.000. O oligo (dT) hibridiza na cauda 3' poli (A) presente no RNA mensageiro maduro em que o processo de “splicing” já foi realizado. Assim utilizaremos para as nossas análises apenas o ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) já processado.

A reação de PCR quantitativo (PCR em tempo real) será realizada com Máster Mix em aparelho Real-Time PCR One-Step Plus (Applied Biosystems, Forster City, California).

Os primers e a sonda com marcação do tipo TaqMan usados para a detecção do FcRn por PCR Real-Time serão: FCGRT (Identificação do teste: Hs01108967_m1, marcado com Fam-MGB) e GAPDH (controle endógeno, VIC-marcado com MGB), ambos obtidos da Applied Biosystems.

As condições da reação serão: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. Cada amostra será analisada em duplicata utilizando-se valores médios de CT para a determinação da expressão do FcRn. Mudanças na expressão relativa serão calculadas usando-se o método do Delta-CT ($2^{-(\text{Ct FCRN}-\text{Ct GAPDH})}$), como descrito por Nolan *et al.* (2006).

Extração de proteínas

As proteínas totais das células da placenta serão isoladas utilizando-se o kit Allprep Mini Kit (Qiagen), o mesmo utilizado para extração de RNA, pois este kit pode ser utilizado para isolar tanto RNA, como proteínas de células ou tecidos. O protocolo será realizado segundo instruções do fabricante. Frações protéicas totais, nucleares e citoplasmáticas podem ser utilizadas diretamente para aplicações comuns como ensaios imunoenzimáticos, imunoprecipitação, eletroforese em gel bidimensional e Western blotting. As frações resultantes serão aliquotadas e estocadas a -86°C até o momento de uso. A estimativa da concentração de proteínas nas amostras extraídas será realizada por espectrofotometria UV (Nanovue Plus, GE) em comprimento de onda de 260 nm.

Ensaios de Western blotting

As proteínas (60 µg/amostra) de cada extrato celular da placenta serão separadas por SDS-PAGE e depois transferidas para membranas de nitrocelulose por aparelho Mini Protean (Bio Rad Labs, Hercules). As membranas de nitrocelulose serão bloqueadas com tampão TBS contendo 1% de Tween 20 e 5% de leite desnatado em pó por 1 hora a temperatura ambiente. Após bloqueio, as membranas serão incubadas com os anticorpos primários específicos para o FcRn (Abcam, USA) diluídos em tampão Tris contendo 1% de Tween 20 e 5% de leite desnatado por 2 horas a temperatura ambiente. Após lavagens com PBS 0,04 Tween-20 0,1%, as membranas serão incubadas com os anticorpos secundários correspondentes conjugados com HRP (Horseradish peroxidase) (Abcam, USA) por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas serão lavadas e incubadas com reagente de quimioluminescência (Lightening Plus; Perkin-Elmer, Boston, MA) por 1 minuto. As bandas imunoreativas serão visualizadas pela intensidade de quimioluminescência, usando método Enhanced Chemiluminescent (ECL, Perkin Elmer). A mesma membrana será incubada com anticorpos anti-β-actina (Sigma) para controle do peso de proteína.

Dosagem dos níveis totais de IgG

Os níveis séricos de IgG total serão avaliados através do método de nefelometria, utilizando nefelômetro Behring com padrões e controles apropriados. As dosagens de imunoglobulinas serão efetuadas segundo protocolo de ensaio para nefelômetro (Behringer, EUA). As amostras de soro das parturientes e de seus respectivos recém-nascidos serão diluídas conforme instruções do fabricante (Berhinger, EUA).

Antígenos Utilizados nos Testes de ELISA

Será utilizada a cepa de *Streptococcus sp* do grupo B tipo III número H36C, lote 05/85 (ref. ATCC 12403).

Serão utilizados os lipopolissacarídeos de *Klebsiella pneumoniae* (L-4268, Sigma, USA), proveniente do ATCC, cepa 15380 e de *Pseudomonas aeruginosa* sorotipo 10, ATCC, cepa 27316 (L-9143, Sigma, USA), ambas isoladas de pacientes com infecção hospitalar;

Análise dos anticorpos anti-*Streptococcus B* por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Anticorpos IgG do soro materno, anticorpos IgG de soro de cordão umbilical e anticorpos IgA do colostro reativos com os抗ígenos de superfície de *Streptococcus* do grupo B serão avaliados por ensaio imunoenzimático (ELISA). Após repique do estoque de *Streptococcus* B em meio BHI (*Brain Heart Infusion*), e cultivo por 16 a 18 horas a 37°C, o crescimento bacteriano será inativado a 60° C durante 1 hora, a cultura será centrifugada a 3.000rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante desprezado e o pellet ressuspenso em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0 até a densidade óptica (D.O.) de 1,0 em espectrofotômetro Micronal no comprimento de onda 540nm. Placas de microtitulação (3590, Corning, NY, USA) serão adsorvidas com a suspensão bacteriana por 16 a 18 horas a 4°C. Cada etapa do teste será precedida por 4 lavagens com PBS-T (solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 acrescida de Tween 20 a 0,1%). As placas serão, então, bloqueadas (PBS 7,4 - leite desnatado em pó 1%) por 1 hora a temperatura ambiente e, em seguida, os Pools de Soro e Colostro Humano Controle e as amostras teste de soro e colostro serão adicionados às placas em quatro diluições seriadas e em duplicata diluídos em tampão PBS NaCl 0,35M - Tween-20 0,1% - leite desnatado em pó 10%, permanecendo por 2 horas a 37°C. Em seguida, as placas serão incubadas com os conjugados anti-IgG ou anti-IgA humanos marcados com peroxidase (A-0170 ou A-0295, Sigma, MO, USA) por 2 horas a 37°C e a solução de substrato contendo 0,4 mg/ml de ortofenilenodiamina (P-

8287, Sigma, MO, USA) em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 e H₂O₂ 0,01% será adicionada. Após 30 minutos, a reação será interrompida com ácido sulfúrico 2,5N e a leitura realizada em comprimento de onda de 492 nm (Labsystems, Finland). O programa GraphPad Prism 5.0 será utilizado para montar curvas semilog a partir das densidades ópticas obtidas por meio da leitura das placas.

Os resultados serão expressos em títulos, determinados através da curva semilogarítmica feita a partir dos resultados das D.O.s obtidas com os *pools* controle de soro e colostro e com as amostras em função do log₂ das diluições. A partir da curva, os títulos das amostras serão determinados como a recíproca da diluição correspondente a uma D.O. de 0,5.

Análise dos anticorpos anti-LPS de *Klebsiella* e anti-LPS de *Pseudomonas* por ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os testes serão realizados utilizando-se microplacas de 96 poços (Costar, USA) adsorvidas com 10 µg/ml de LPS de *K. pneumoniae*, ou de *P. aeruginosa* diluídos em PBS pH 7,4. Após incubação por 16 a 18 h a 4 °C, as placas serão lavadas com PBS-T (solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 acrescida de Tween 20 a 0,1%) e o bloqueio realizado com leite desnatado em pó a 1% em PBS 7,4, por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, o pool de soro humano normal usado como padrão, os *Pools* de Soro e Colostro Humano Controle e as amostras teste de soro e colostro serão adicionados em quatro diluições seriadas em PBS-NaCl 0,5 M Tween 0,2% e em duplicata, permanecendo incubadas por 18 h a 4°C. Depois de novas lavagens, as placas serão incubadas com conjugado anti-IgG ou anti-IgA humano marcados com peroxidase (A-0170 ou A-0295, Sigma, MO, USA) por 2 horas a 37°C e a solução de substrato contendo 0,4 mg/ml de ortofenilenodiamina (P-8287, Sigma, MO, USA) em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 e H₂O₂ 0,01% será adicionada. Após 30 minutos de incubação ao abrigo da luz, a reação enzimática será interrompida pela adição de H₂SO₄ 2,5 N. A absorbância será

mensurada em leitor para microplacas no comprimento de onda de 492 nm (Labsystems, Finland).

O programa Graphpad Prism será utilizado para montar curvas de semi-log a partir das densidades óticas (D.O.s) obtidas por meio da leitura das placas de ELISA. Os resultados serão expressos em concentração ($\mu\text{g/ml}$), determinada através da curva semi-logarítmica feita a partir dos resultados das D.O.s em função do \log_{10} das concentrações da curva padrão. A partir da curva, as concentrações das amostras serão determinadas por interpolação na curva.

Coleta dos dados

As informações referentes à gestação, parto e condições serão obtidas durante as consultas de pré-natal, dos prontuários hospitalares, do banco de dados eletrônico da enfermaria e do sistema informatizado de laudos de ultrassonografia da Clínica Obstétrica.

O diagnóstico da gestação múltipla, da restrição de crescimento e insuficiência placentária será realizado pelo setor de gestação múltipla utilizando-se de avaliação ultrassonográfica e da vitalidade fetal durante o acompanhamento pré-natal.

A definição da corionicidade será realizada pelo exame ultrassonográfico e avaliação anátomo-patológica da placenta.

A idade gestacional será determinada pela data da última menstruação (DUM) confirmada por ultrassonografia. Nos casos de DUM desconhecida será utilizado preferencialmente a ultrassonografia de primeiro trimestre, quando disponível, ou exames ultrassonográficos posteriores. Os métodos de CAPURRO (1978) para os RNT e New Ballard (1991) para os RNPT serão utilizados para avaliação clínica da idade gestacional, em casos de dúvida sobre a DUM, ausência de exame ultrassonográfico ou datação ultrassonográfica tardia na gestação.

Os dados dos recém-nascidos serão obtidos nos arquivos do Berçário Anexo à Maternidade (BAM).

O peso de nascimento será aferido em balança digital de precisão (com aproximação de 5 gramas) regularmente calibrada, ainda no centro obstétrico após o nascimento das crianças, descontando qualquer equipamento preso ao paciente por motivo da reanimação.

Análise dos dados

Os dados serão analisados da seguinte forma:

1. Distribuição das concentrações de imunoglobulinas no sangue de cordão de gêmeos, em relação à:
 - a. idade gestacional no parto;
 - b. corionicidade : monocoriônica e dicoriônica;
 - c. peso dos recém-nascidos (abaixo do percentil 10, entre o percentil 10 e 90, acima do percentil 90 da curva para gêmeos de Alexander et al. (1998);
 - d. presença ou ausência de insuficiência placentária, demonstrada por índice de pulsatilidade da artéria umbilical com valor acima do percentil 95 para a idade gestacional;
 - e. sexo: masculino, feminino, dupla de feminino, dupla de masculino, dupla com um de cada sexo;
2. Comparação das concentrações dos anticorpos no sangue de cordão de gêmeos monocoriônicos e dicoriônicos em relação às variáveis apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Comparação das concentrações de anticorpos no sangue de cordão de gemelares. < : menor; > maior; P10 = percentil 10 da curva de Alexander et al. 1998 para gêmeos; M= masculino; F = feminino.

Tipos gêmeos	Idade Gestacional	Peso Nascimento		Restrição crescimento		Insuficiência placentária		Sexo	
		< p10	> p10	Não	Sim	Não	Sim	M	F
Dicoriônico									
Monocoriônico									

3. Comparar as concentrações dos anticorpos nos diferentes compartimentos: cordão umbilical, placenta e mãe.

Todos os demais dados serão analisados conforme discriminados nos itens dos objetivos 1, 2 e 3.

Analise estatística

Para a descrição dos resultados serão utilizadas as freqüências relativas (percentuais) e absolutas (n) das classes de cada variável qualitativa.

Para as variáveis quantitativas serão utilizados a média, a mediana, valor mínimo, valor máximo e desvio padrão para indicar a variabilidade dos dados.

Para caracterizar a amostra estudada, serão calculadas as tabelas de freqüências relativas (percentuais) e absoluta (n) das categorias das variáveis qualitativas. Serão calculadas as médias e medianas, erros-padrão, desvios-padrão, mínimo e máximo das medidas encontradas.

Para a comparação entre os grupos independentes de variáveis quantitativas, será utilizado teste paramétrico de t de Student e não paramétrico de Kruskal Wallis. No caso de dependência, os testes t pareado e não paramétrico de Wilcoxon serão aplicados para as comparações.

Para avaliar as correlações entre os diferentes grupos e variáveis serão utilizados os coeficientes de correlação de Pearson ou os coeficientes de correlação de Spearman.

As taxas de transferência de anticorpos IgG serão expressas em porcentagem e definidas como a razão entre títulos de IgG no soro dos cordão e títulos de IgG no soro materno multiplicados por 100.

Análise multivariada tendo como variável dependente a concentração de anticorpos, e examinando a correlação com fatores clínicos e demográficos maternos, variáveis obstétricas e neonatais. Assim as variáveis independentes serão: idade, cor e paridade materna, idade gestacional no parto, peso de nascimento, corionicidade, sexo do recém-nascido, ciclo completo de corticóide para maturação pulmonar até 7 dias do parto, presença de trabalho de parto.

Serão considerados significativos os valores de p (p-valor) menores do que 0,05.

Os programas de armazenamento de dados e análise estatística a serem utilizados serão: MS Office Excel e SPSS para Windows.

Cronograma de Execução

Tempo previsto para a realização da pesquisa: 2 anos.

Início da coleta de dados a partir de Abril de 2011.

1º e 2º Semestres

- Coleta de dados.
 - Padronização do ensaio de Western blotting;
 - Padronização do Real-Time PCR.
-

3º e 4º Semestres

- Realização dos testes de ELISA
- Realização dos ensaios de Western blotting e Real-Time PCR;
- Análise dos resultados;
- Preparação dos manuscritos para publicação.

REFERÊNCIAS

Alexander GR, Kogan M, Martin J, Papiernik E. What are the fetal growth patterns of singletons, twins, and triplets in the United States? Clin Obstet Gynecol. 1998 Mar;41(1):114-25.

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

Brambell FW, Hemmings WA. The passage into the embryonic yolk-sac cavity of maternal plasma proteins in rabbits. J Physiol. 1949 Mar 15;108(2):177-85.

Brasil, TB. Transferência transplacentária de anticorpos anti-Streptococcus B nos recém-nascidos de termo e pré-termo. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

Capurro H, Konichezky S, Fonseca D, Caldeyro-Barcia R. A simplified method for diagnosis of gestacional age in newborn infant. J Pediatr. 1978;93:120-2.

Carvalho BTC, Carneiro-Sampaio MM, Solé D, Naspitz C, Leiva LE, Sorensen RU. Transplacental transmission of serotype-specific pneumococcal antibodies in a brazilian population. Clin Diagn Lab Immunol. 1999;1:50-4.

Ghetie V, Ward ES. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. Annu Rev Immunol. 2000;18:739-66.

Lin FY, Phillips III JB, Azimi PH, Weisman LE, Clark P, Rhoads GG, Regan J, Concepcion NF, Frasch CE, Troendle J, Brenner R, Gray BM, Bhushan R, Fitzgerald G, Moyer P, Clemens JD. Level of maternal antibody required to protect neonates against early-onset disease caused by group B

Streptococcus type Ia: a multicenter, seroepidemiology study. *J Infect Dis.* 2001;184:1022-8.

Lin FY, Phillips III JB, Azimi PH, Weisman LE, Clark P, Rhoads GG, Regan J, Frasch CE, Troendle J, Brenner R, Gray BM, Moyer P, Clemens JD. Level of maternal IgG anti-group B Streptococcus type III antibody correlated with protection of neonates against early-onset disease caused by this pathogen. *J Infect Dis.* 2004;190:928-34.

Manning SD, Wood S, Kasha K, Martin D, Rioux S, Brodeur B, Davies D. Naturally occurring antibodies for the group B streptococcal surface immunogenic protein (Sip) in pregnant women and newborn babies. *Vaccine.* 2006; 24:6905-12.

Marques, ALSL. Aquisição passiva de anticorpos IgG maternos reativos com os lipopolissacarídeos de enterobactérias incidentes em infecções neonatais por recém-nascidos pré-termos e a termo. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

Nagao AT, Carvalho BTC, Arslanian C, Solé D, Carneiro-Sampaio MM. Placental transfer of IgG antibodies against *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide in brazilian term and preterm newborns. *J Trop Pediatr.* 1999; 45:171-3.

Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1559-82.

Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol.* 2007 Sep;7(9):715-25.

Simister NE, Mostov KE. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature.* 1989 Jan 12;337(6203):184-7.

Simister NE, Story CM. Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus. *J Reprod Immunol.* 1997 Dec 15;37(1):1-23.

Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. Vaccine. 2003 Jul 28;21(24):3365-9.

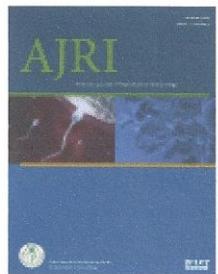
4- Publicações

4.1 Artigo 1

Stach SC, Brizot Mde L, Liao AW, Francisco RP, Palmeira P, Carneiro-Sampaio M, Zugaib M. **Transplacental total IgG transfer in twin pregnancies.** American Journal of Reproductive Immunology. 2014; 72 (6): 555-60.

4.2 Artigo 2

Stach SCL, Brizot ML, Liao AW, Palmeira P, Francisco RPV, Carneiro-Sampaio MMS, Zugaib. **Placental transfer of IgG antibodies specific to *Klebsiella* and *Pseudomonas* LPS and to Group B *Streptococcus* in twin pregnancies.** Scandinavian Journal of Immunology. 2015; 81: 135–41.



Am J Reprod Immunol. 2014 Dec;72(6):555-60. doi: 10.1111/aji.12305. Epub 2014

Aug 2.

Transplacental total IgG transfer in twin pregnancies.

Stack SC, Brizot M L, Liao AW, Francisco RP, Palmeira P, Cameiro-Sampaio M,

Zugaib M.

Abstract

PROBLEM:

In twin pregnancies, factors that influence total umbilical cord IgG concentration and IgG transfer ratio are not well known.

METHOD:

Blood samples were prospectively collected from 57 twin pregnancies. Stepwise multivariate regression analysis was used to evaluate the association between total IgG levels in the umbilical cord blood and IgG transfer ratio according to serum IgG concentration, pregnancy chorionicity, the presence of abnormal umbilical artery pulsatility index, intrauterine growth restriction, gestational age at delivery (GAD), birthweight, and placental weight.

RESULTS:

Umbilical cord IgG concentration showed a positive correlation with serum IgG concentration and GAD; levels were significantly lower in monochorionic compared with dichorionic pregnancies. IgG transfer ratio also increased with GAD but was inversely correlated with serum IgG concentration levels.

CONCLUSION:

In twin pregnancies, besides serum IgG concentration and GAD, chorionicity also influences umbilical cord IgG concentration. Monochorionic twins have lower IgG cord concentration than dichorionic twins.

© 2014 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd.

PAPER 1: Transplacental total IgG transfer in twin pregnancies.

Stach SCL, Brizot ML, Liao AW, Francisco RPV, Palmeira P, Carneiro-Sampaio M, Zugaib M. Am J Reprod Immunol 2014; 72: 555–560.
DOI: 10.1111/aji.12305

Abstract

Problem: In twin pregnancies, factors that influence total umbilical cord IgG concentration and IgG transfer ratio are not well known.

Method: Blood samples were prospectively collected from 57 twin pregnancies. Stepwise multivariate regression analysis was used to evaluate the association between total IgG levels in the umbilical cord blood and IgG transfer ratio according to serum IgG concentration, pregnancy chorionicity, presence of abnormal umbilical artery pulsatility index, intra-uterine growth restriction, gestational age at delivery (GAD), birth weight and placental weight.

Results: Umbilical cord IgG concentration showed a positive correlation with serum IgG concentration and GAD; levels were significantly lower in monochorionic compared to dichorionic pregnancies. IgG transfer ratio also increased with GAD but was inversely correlated with serum IgG concentration levels.

Conclusions: In twin pregnancies, besides serum IgG concentration and GAD, chorionicity also influence umbilical cord IgG concentration. Monochorionic twins have lower IgG cord concentration than dichorionic twins.

Keywords: IgG concentration, maternal transfer, multiple pregnancy, immunoglobulins

Introduction

Twin pregnancies are associated with higher neonatal morbidity than singleton pregnancies, mainly due to prematurity and low birth weight.¹ Neonates, specially the premature ones, are at increased risk of infection due to an immature immune system.^{2,3} Therefore during the first months of life immunological protection partly relies on maternal IgG antibodies transferred in utero, through the placenta, to modify and control the severity of neonatal diseases.⁴

In singleton pregnancies, IgG transfer ratio increases with gestational age and is inversely correlated with serum IgG concentration.^{5,6} Moreover, active transport also depends on IgG subclass.^{7,8} To the best of our knowledge, only one study, carried out more than three decades ago, investigated IgG concentrations in 50 twin pregnancies and showed that mean IgG levels were also higher in the umbilical cord than maternal sera. No differences were observed according to zygosity, however data was not analyzed according to chorionicity.⁹

Nowadays, it is well established that chorionicity is an important predictor of perinatal outcome with higher mortality and morbidity for monochorionic compared with dichorionic twin pregnancies.^{10,11} As a matter of fact, antenatal management and surveillance are tailored according to this information following first trimester ultrasound diagnosis.¹² Therefore, this study aims to investigate factors that correlate with umbilical cord IgG levels in twin pregnancies, including chorionicity information.

Material and Methods

This was a prospective study carried out at the Twins Clinic of Hospital das Clinicas, Sao Paulo University Medical School, Brazil, between May 2012 and November 2013. Institutional ethics committee approved the study (CAPPesq 0500/11) and all women who participated gave informed consent.

Women with twin pregnancies, negative maternal serology for HIV, cytomegalovirus, hepatitis B and C, toxoplasmosis, rubella and no autoimmune diseases and fetal malformations or genetic syndromes were invited to take part in the study.

Maternal blood sample was collected immediately before delivery and umbilical artery blood samples were collected from each fetus soon after birth. Samples were centrifuged and the serum was separated. Total IgG levels were determined according to standard automatized turbidimetry protocols, using P modular Analyser equipment (Cobas C System), Roche. In this immunoturbidimetric assay, based on immunological agglutination, anti IgG antibodies react with antigen to form an antigen-antibody complex. After agglutination, it is measured turbidimetrically. The reagents used were R1 (TRIS buffer) and R3 (Anti-human IgG antibody-goat). The assay type was two-point end and the wavelength used was 700/340 nm (sub/main). The measuring range was 300-5000 mg/dL. The expected values for adults are 700-1600 mg/dL and for children 0-1 year are 232-1411 mg/dL. IgG values were presented as mg/dl

IgG transfer ratio between maternal and fetal compartments was also calculated for each neonate dividing total umbilical cord IgG concentration by the total serum IgG concentration multiplied by 100.

Total IgG concentration and IgG transfer ratio were examined according to pregnancy chorionicity, umbilical artery Doppler findings, serum IgG concentration, gestational age at delivery, birthweight and presence of fetal growth restriction and total placental weight.

Chorionicity was determined by first-trimester ultrasound examination and/or placental pathology examination in all cases. Doppler examination of the umbilical artery was performed in a free loop of the umbilical cord close to the abdominal wall insertion. Abnormal umbilical artery Doppler was defined as the presence of increased pulsatility index or absent / reversed end diastolic flow.¹³ Doppler results from the last scan performed before delivery were considered during the analysis. Intrauterine growth restriction was defined as birth weight below de 10th percentile according to twin charts.¹⁴

Placental weight was obtained soon after birth. In dichorionic pregnancies, placental weight was defined as the sum of both placentas; in monochorionic pregnancies, the weight of the unique placenta was considered.

Comparation between numerical variables were performed using Student T-test for normally distribution and Mann Whitney test for non normally distribution. Kolmogorov-Smirnov test was used to test the normal distribution. Continuous variables were analyzed using Pearson correlation for normally distribution or Spearman correlation for non normally distribution. Stepwise multivariate analysis was used to investigate significant predictors of total umbilical cord IgG concentration and IgG transfer ratio. Statistical analysis was performed using SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicado, IL, USA). P value < 0.05 was considered significant.

Results

During the study period 58 women took part in the study. One monochorionic twin pregnancy was excluded due to a major cardiac defect

diagnosed after birth. Therefore, a total of 57 maternal and 114 umbilical cord samples were analyzed. Maternal demographics, pregnancy and delivery information are summarized in table I. Maternal disease were observed in 18 patients, and two of them had two health problems (hypertension= nine patients, diabetes= one patient, hypothyroidism= three patients, thrombocytopenia= one patient, thromboembolic disease= one patient, asthma= three patients, cardiomyopathy= one patient and epilepsy= one patient).

Univariated analysis in serum IgG concentrations.

Mean total serum IgG concentration was 824.9 ± 204.2 mg/dl (range: 423-1326). Total serum IgG concentrations were not different according to maternal age ($r= -0.07$, $p= 0.58$), parity ($r= 0.03$, $p= 0.79$), maternal disease ($p= 0.35$), smoking habit ($p= 0.20$), hypertension during pregnancy ($p= 0.44$), gestational diabetes ($p= 0.36$), maternal color (white=793.9, non white= 911.7, $p= 0.055$) and type of delivery ($p= 0.19$).

Univariated analysis in umbilical cord serum IgG concentrations.

Mean umbilical cord IgG concentration was 827.5 ± 193.0 mg/dl (range: 273-1352). Total IgG concentrations in umbilical cord sera were significantly lower in monochorionic neonates and in neonates presented with abnormal umbilical artery Doppler during pregnancy. Significant correlations were also observed with gestational age at delivery, birthweight, placental weight and serum IgG concentrations.

No white neonates presented higher total IgG cord concentration (White= 801.8 ± 192.1 , No white= 899.3 ± 180.0 ; $p= 0.02$). Newborns whose mothers smoked during pregnancy ($n= 10$) presented lower IgG concentrations (smokers= 703.4 ± 72.2 , non smokers= 839.4 ± 196.9 ; $p= 0.0001$).

Total IgG umbilical cord concentration were not affected by delivery order ($p= 0.70$), maternal age ($r= -0.05$, $p= 0.63$), parity ($r= -0.016$, $p= 0.86$), maternal disease ($p= 0.25$), hypertension during pregnancy ($p= 0.21$), gestational

diabetes ($p= 0.32$), intrauterine growth restriction ($p= 0.20$), type of delivery ($p= 0.62$) and gender ($p= 0.38$).

Univariated analysis in IgG tranfer ratios.

Mean IgG transfer ratio was 104.4 ± 29.0 % (range: 45.2-178.2). IgG transfer ratios were significantly lower in monochorionic twins, increased with gestational age and birthweight, and had negative correlation with serum IgG concentrations. IgG transfer ratio was not influenced by placental weight and umbilical artery pulsatility index. No differences in IgG transfer ratio were observed regarding delivery order ($p= 0.71$), maternal age ($r= 0.08$, $p= 0.38$), maternal color ($p= 0.60$), parity ($r= -0.05$, $p= 0.58$), maternal disease ($p= 0.97$), smoking habit ($p= 0.79$), hypertension during pregnancy ($p= 0.75$), gestational diabetes ($p= 0.07$), intrauterine growth restriction ($p= 0.54$), type of delivery ($p= 0.30$) and gender ($p= 0.19$).

Stepwise multivariate analysis.

Multivariate analysis showed that total IgG cord serum concentrations had a positive correlation with serum IgG concentration (Fig. 1 a, Table II) and gestational age at delivery (GAD) (Fig. 1 b, Table II). Total IgG serum cord concentration was lower in monochorionic twins. Umbilical cord IgG mean levels in the monochorionic group (729.2 ± 148.8 mg/dl) were significantly lower compared with dichorionic (884.4 ± 193.5 mg/dl; mean difference= 155.6 mg/dl, 95% CI= 91.5-219.7, $p<0.001$) (Table II, Fig. 2). IgG transfer ratio correlated positively with GAD (Table II, Fig. 3b) but had a negative correlation with serum IgG concentrations (Table II, Fig. 3a).

Discussion

The present study shows that umbilical cord IgG concentration is higher in dichorionic compared with monochorionic twin pregnancies and is positively correlated with serum IgG concentration and gestational age. On the other hand, IgG transfer ratio also increases with gestation but is inversely correlated with serum IgG concentrations.

In singleton pregnancies, serum IgG levels have been shown to decrease, whereas umbilical cord IgG levels increase with gestational age.⁶ As a matter of fact, placental IgG transfer starts from 13 weeks onwards and increases linearly until term, with a substantial increment after 36 weeks.^{6,15} We also observed an increase in total IgG umbilical cord concentration and IgG transfer ratio with increasing gestational age (Figs 1b and 2b). In twin pregnancies, Bryan *et al.* observed a significantly higher level of IgG in cord than in maternal serum. This difference was not observed in our study, possibly because the earlier mean gestational age at delivery in our population (36.3 weeks) compared to their study (>37 weeks, observing the plotting data).⁹ Bryan *et al.* refer mean IgG transfer ratio of 124% while our IgG transfer ratio was 104.4%; this difference also may be explained by the lower mean gestational age at delivery in our study population. In singleton pregnancies, Van den Berg *et al.*¹⁶ also found IgG transfer ratio of 67% in preterm neonates and 134% in term neonates. Therefore, compared to singleton pregnancies the mean IgG transfer ratio observed in our study has an intermediate value between the preterm and term values.

Increased IgG transfer ratio with gestational age, despite lower levels of serum IgG concentration, reflects active transport across the placenta through Fc receptor-mediated pathways in the syncytiotrophoblast.^{2,17} This transfer mechanism is limited by receptors saturation.^{18,19} The fact that gestational age at delivery influences IgG cord concentration has an important clinical

implication, because premature neonates may be at a higher risk of infections²⁰ due to lower IgG cord concentration.²¹

A positive correlation between total serum IgG concentration and umbilical cord IgG concentrations has been demonstrated both in singleton and twin pregnancies.^{6,9,22} Bryan *et al.*, in a prospective study involving 50 twin pregnancies showed that total IgG levels are significantly higher in cord blood samples compared with serum IgG concentration. However, no differences were observed between monozygotic and dizygotic twins.⁹

To the best of our knowledge, this is the first study that examines IgG concentration in twin pregnancies according to chorionicity. Although umbilical cord IgG concentrations were not significantly different from serum IgG concentration, levels were significantly lower in monochorionic pregnancies, compared to dichorionic. As no differences were observed in IgG transfer ratio, the best explanation is that lower levels in monochorionic pregnancies are related to the fact that the amount of immunoglobulin transferred through the placenta has to be distributed amongst two fetal circulations, which are connected by placental vascular anastomosis.²³

Moreover, findings such as marginal/velamentous cord insertion, subchorial fibrin deposits, hematomas, areas of infarction, and abnormal villus maturation are found more frequently in monochorionic pregnancies and may also contribute to lower levels observed in the fetal circulation.²⁴

In uncomplicated twin pregnancies, our data show a good correlation and no significant differences in intrapair IgG levels, not only in monochorionic, but also in dichorionic twins. Nevertheless, significant differences between twin pairs have been reported in three conditions: twin-to-twin transfusion syndrome, fetal hydrops and congenital hepatic disease, and placenta edema were suggested as a possible underlying mechanism.²⁵

Therefore, our findings suggests that chorionicity not only is an important determinant of pregnancy outcome due to placenta vascular anastomosis related complications in monochorionic twins, but may also be a determinant factor for complications in the neonatal period due to lower levels of

immunoglobulin present in the circulation. As a matter of fact, the interplay between prematurity and differences in the immune system related to chorionicity may explain the higher incidence of necrotizing enterocolitis and sepsis in monochorionic compared with dichorionic twins, observed in previous studies.^{10,11,26}

In conclusion, in twin pregnancies, total IgG cord concentrations and IgG transfer ratio are significantly influenced by serum IgG concentrations and gestational age. Moreover, IgG cord concentration is lower in monochorionic pregnancies. Understanding these differences may help tailor twin pregnancy management to achieve the best perinatal outcome.

Acknowledgment

This study was supported by a grant from FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2011/13587-4)

Table I. Maternal characteristics and pregnancy information in 57 twin pregnancies.

Characteristics	Results
White; n (%)	42 (73.7)
Parity; mean (range)	1 (0 - 4)
Chorionicity	
Dichorionic; n (%)	36 (63.2)
Monochorionic diamniotic; n (%)	21 (36.8)
Smoking; n (%)	5 (8.8)
Maternal disease•; n (%)	18 (31.6)
Abnormal umbilical artery pulsatility index; n (%)	8 (14.0)
Dichorionic; n (%)	2 (2.8)*
Monochorionic diamniotic; n (%)	6 (14.3)*
Gestational age at delivery; weeks, mean ± SD	36.0 ± 1.7
Dichorionic; weeks, mean ± SD	36.5 ± 1.7 **
Monochorionic diamniotic; week, mean ± SD	35.3 ± 1.6 **
Mode of delivery	
Cesarean section; n (%)	49 (86.0)
Vaginal delivery; n (%)	8 (14.0)
Birthweight; grams, mean ± SD	2288.6 ± 487.6
Dichorionic; grams, mean ± SD	2465.6 ± 424.0***
Monochorionic diamniotic; grams, mean ± SD	2103.1 ± 502.4***
Male newborn; n (%)	55 (48.2)
Placental weight; grams, mean ± SD	866.5 ± 242.3
Dichorionic; mean ± SD	916.2 ± 223.1†
Monochorionic diamniotic; mean ± SD	776.9 ± 255.1†

* $p = 0.05$; ** $p = 0.01$; *** $p < 0.001$; † $p=0.04^t$

• including hypertension, diabetes, thrombocytopenia, hypothyroidism, thromboembolic disease, asthma, cardiomyopathy and epilepsy.

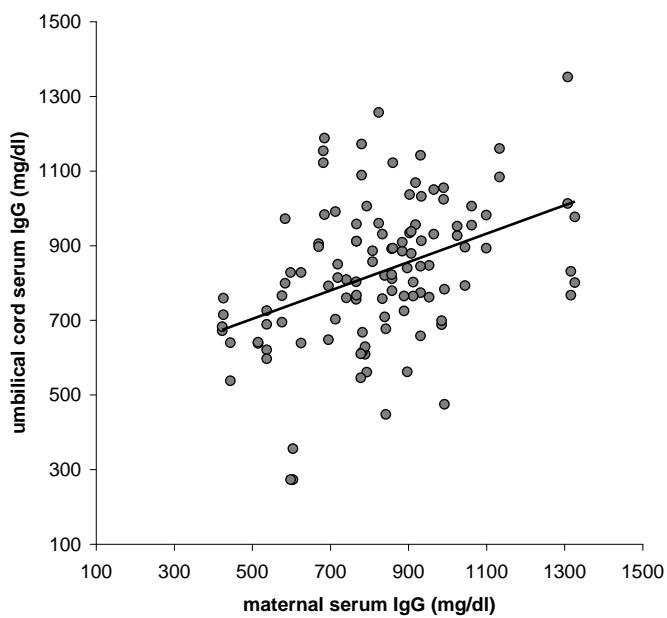
Table II. Stepwise regression analysis for the prediction of umbilical cord immunoglobulin G concentration and transfer ratio (umbilical cord/maternal serum * 100) in 57 twin pregnancies.

	coefficient	standard error	p*
Umbilical cord immunoglobulin G concentration			
Constant	-1268.51	300.39	< 0.001
pregnancy chorionicity	87.24	29.67	0.004
gestational age at delivery	49.50	8.51	< 0.001
maternal serum IgG concentration	0.31	0.07	< 0.001
Immunoglobulin G transfer ratio			
Constant	-108.21	39.49	0.007
gestational age at delivery	7.97	1.10	<0.001
maternal serum IgG concentration	-0.09	0.01	<0.001

* significance level set at 0.05

Fig 1. Correlation between umbilical cord IgG concentration (UC) and maternal serum IgG concentration (MS) and gestational age at delivery (GA) in 57 twin pregnancies. (a) UC = 513.2 + 0.38 * MS, r=0.40, p<0.001; (b) UC = -1423.7 + 62.5 * GA, r=0.55, p<0.001.

(a)



(b)

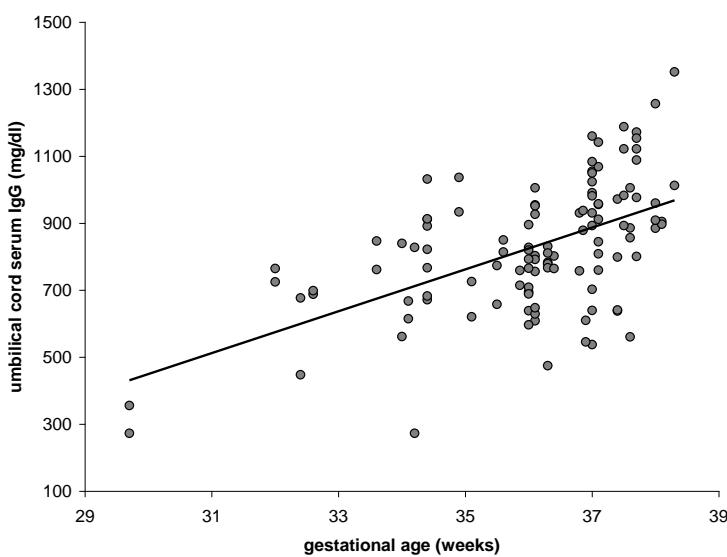


Fig 2. Total IgG cord concentration in monochorionic diamniotic (MCDA; n= 42) and dichorionic (DA; n= 72) twins. Monochorionic= 729.2 ± 148.8 mg/dl; Dichorionic= 884.4 ± 193.5 mg/dl; p<0.001.

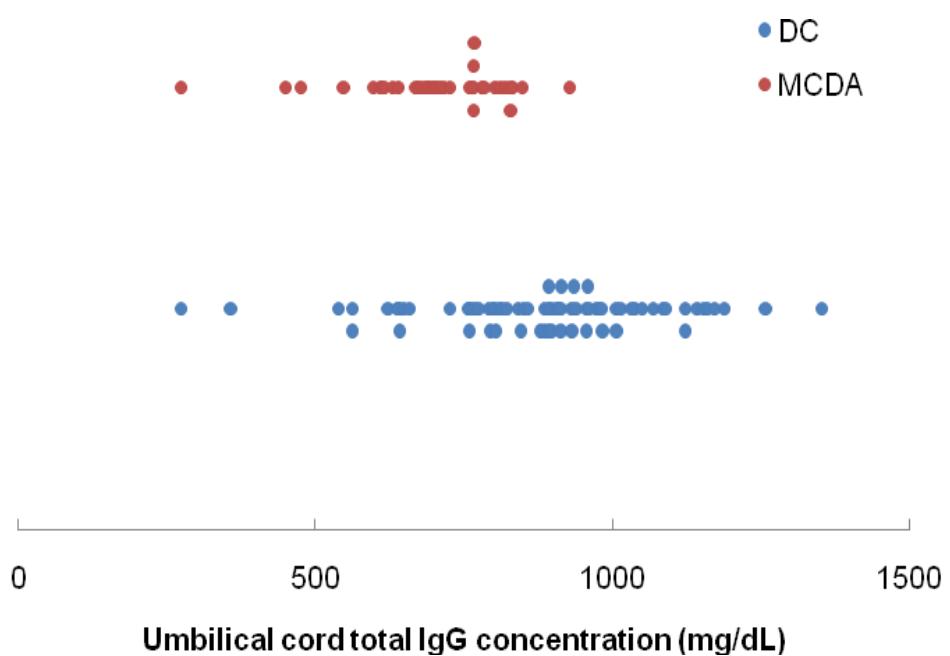
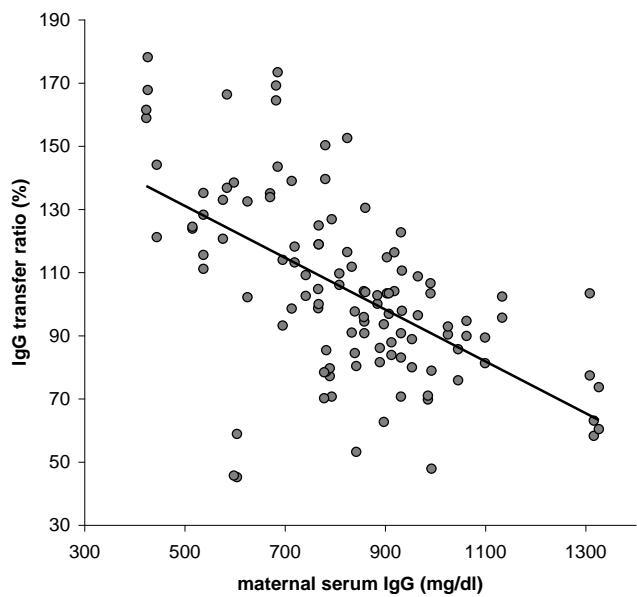
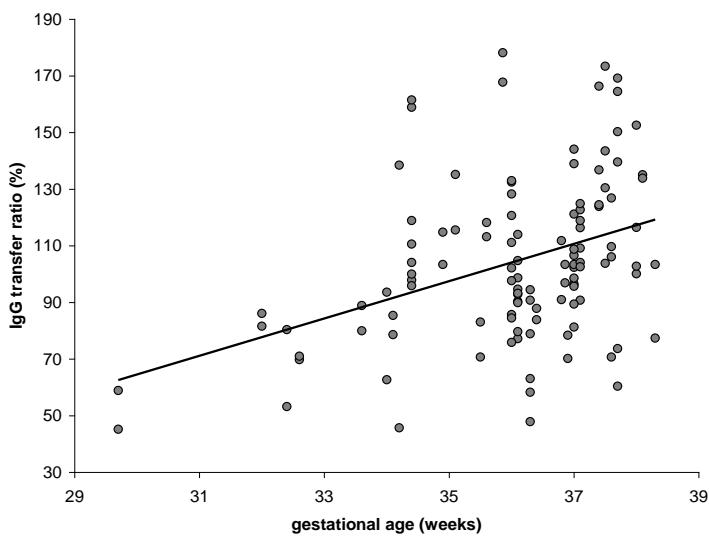


Fig 3. Correlation between IgG transfer ratio (TR) and maternal serum IgG concentration (MS) and gestational age at delivery (GA) in 57 twin pregnancies. (a) TR = 172.1 - 0.08 * MS, r=-0.58, p<0.001; (b) TR = -133.2 + 6.6 * GA, r=0.39, p<0.001.

(a)



(b)



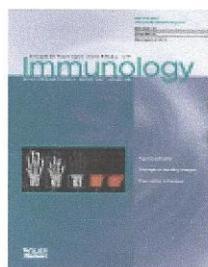
References

1. Alexander GR, Salihu HM: Perinatal outcomes of singleton and multiple births in the United States, 1995-1998. In *Multiple pregnancy: Epidemiology, Gestation & Perinatal outcome*, 2nd edn, I Blickstein, L Keith (eds). London, UK, Informa Healthcare, 2006, pp 3-10.
2. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa A L, Zago C A, Carneiro-Sampaio M: IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: Article ID 985646, 13.
3. Okoko JB, Wesumperuma HL, Hart CA: The influence of prematurity and low birthweight on transplacental antibody transfer in a rural West African population. *Trop Med Int Health* 2001; 6:529-534.
4. Brambell FWR: The passive immunity of the young mammal. *Biol Rev* 1958; 33:485-531.
5. Gonçalves G, Cutts FT, Hills M, Rebelo-Andrade H, Trigo FA, Barros H: Transplacental transfer of measles and total IgG. *Epidemiol Infect* 1999; 122:273-279.
6. Malek A, Sager R, Kuhn P, Nicolaides KH, Schneider H: Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1996; 36:248-255.
7. Malek A, Sager R, Schneider H: Maternal—Fetal Transport of Immunoglobulin G and Its Subclasses during the Third Trimester of Human Pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1994; 32:8-14.
8. Garty BZ, Ludomirsky A, Danon YL , Peter JB , Douglas SD: Placental Transfer of Immunoglobulin G Subclasses. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994; 1: 667-669.

9. Bryan E, Slavin B, Nicholson E: Serum immunoglobulins in multiple pregnancy. *Arch Dis Child* 1976; 51:354–359.
10. Hack KEA, Derkx JB, Elias SG, Franx A, Roos EJ, Voerman SK, Bode CL, Koopman-Esseboom C, Visser GHA: Increased perinatal mortality and morbidity in monochorionic versus dichorionic twin pregnancies: clinical implications of a large Dutch cohort study. *BJOG* 2008; 115:58-67.
11. Vergani P, Russo FM, Follesa I, Cozzolino S, Fedeli T, Ventura L, Ghidini A: Perinatal complications in twin pregnancies after 34 weeks: effects of gestational age at delivery and chorionicity. *Am J Perinatol* 2013; 30:545–550.
12. Vayssi  re C, Benoist G, Blondel B, Deruelle P, Favre R, Gallot D, Jabert P, Lemery D, Picone O, Pons JC, Puech F, Quarello E, Salomon L, Schmitz T, Senat MV, Sentilhes L, Simon A, Stirneman J, Venditti F, Winer N, Ville Y: Twin pregnancies: guidelines for clinical practice from the French College of Gynaecologists and Obstetricians (CNGOF). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 156:12-7.
13. Arduini D, Rizzo G: Normal values of Pulsatility Index from fetal vessels: a cross-sectional study on 1556 healthy fetuses. *J Perinat Med* 1990; 18:165-172.
14. Alexander GR, Kogan M, Martin J, Papiernik E: What are the fetal growth patterns of singletons, twins, and triplets in the United States? *Clin Obstet Gynecol* 1998; 41:114-125.
15. Gitlin D: Maternofetal immunoglobulin transfer mechanisms. In Immunology in Obstetrics and Gynecology, A Centaro, N Carretti (eds). Amsterdam, Excerpta Medica, 1982: pp 240-251.
16. Van den Berg JP, Westerbeek EA, Berbers GA, van Gageldonk PG, van der Klis FR, van Elburg RM. Transplacental transport of IgG antibodies specific for pertussis, diphtheria, tetanus, haemophilus influenzae type b, and Neisseria meningitidis serogroup C is lower in preterm compared with term infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2010; 29:801-805.

17. Malek A: Ex vivo human placenta models: transport of immunoglobulin G and its subclasses. *Vaccine* 2003; 21:3362-3364.
18. Saji F, koyama M, Matsuzaki N: Current topic: human placental Fc receptors. *Placenta* 1994; 15:453-466.
19. Okoko BJ, Wesuperuma LH, Ota MO, Banya WA, Pinder M, Gomez FS, Osinusi K, Hart AC: The influence of placental malaria infection and maternal hypergammaglobulinemia on transplacental transfer of antibodies and IgG subclasses in a rural West African population. *J Infect Dis* 2001; 184:627-632.
20. Vijayakanthi N, Bahl D, Kaur N, Maria A, Dubey NK: Frequency and characteristics of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms in neonates: A Prospective Cohort Study. *BioMed Res Int* 2013; 2013: Article ID 756209, 8.
21. Silveira Lessa AL, Krebs VL, Brasil TB, Pontes GN, Carneiro-Sampaio M, Palmeira P: Preterm and term neonates transplacentally acquire IgG antibodies specific to LPS from *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011; 62:236-243.
22. Pitcher-Wilmott RW, Hindocha P, Wood CB: The placental transfer of IgG subclasses in human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1980; 41:303–308.
23. Robertson EG, Neer KJ: Placental injection studies in twin gestation. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 147:170-174.
24. Kent EM, Breathnach FM, Gillan JE, McAuliffe FM, Geary MP, Daly S, Higgins JR, Hunter A, Morrison JJ, Burke G, Higgins S, Carroll S, Dicker P, Manning F, Tully E, Malone FD: Placental pathology, birthweight discordance, and growth restriction in twin pregnancy: results of the ESPRiT Study. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 207:220.e1-5.
25. Bryan E: IgG deficiency in association with placental oedema. *Early Hum Dev* 1977; 1:133-143.

26. Domingues AP, Gonçalves S, Vasco E, Fonseca E, Moura P: Chorionicity in twin pregnancies: impact upon perinatal results. *Acta Obstet Ginecol Port* 2007; 1:163-166.



Scand J Immunol. 2015 Feb;81(2):135-41. doi: 10.1111/sji.12258.

Placental transfer of IgG antibodies specific to Klebsiella and Pseudomonas LPS and to group B Streptococcus in twin pregnancies.

Stach SC, Brizot ML, Liao AW, Palmeira P, Francisco RP, Carneiro-Sampaio MM, Zugaib M.

Abstract

Group B Streptococcus (GBS), Klebsiella spp. and Pseudomonas spp. are important aetiological agents of neonatal infections in Brazil. There is a lack of data in the literature regarding the specific transport of immunoglobulin G (IgG) against these pathogens in multiple pregnancies. Maternal ($n = 55$) and umbilical cord ($n = 110$) blood samples were prospectively collected at birth from 55 twin pregnancies. The

factors associated with cord levels and transfer ratios of IgG against GBS, Klebsiella and Pseudomonas were examined. The IgG umbilical cord serum levels specific to GBS, Klebsiella LPS and Pseudomonas LPS were significantly associated with maternal-specific IgG concentrations and the presence of diabetes. The anti-Klebsiella IgG cord serum concentrations were also related to birthweight and the presence of hypertension. The transfer ratios against GBS and Pseudomonas LPS were associated with maternal-specific IgG concentrations. The transfer ratios for GBS and Pseudomonas LPS were associated with gestational age at delivery and the presence of diabetes, respectively. None of the examined parameters were related to Klebsiella LPS transfer ratios. We conclude that in twin pregnancies, specific maternal IgG serum concentrations and diabetes were the parameters associated with umbilical cord serum IgG concentrations reactive with the three pathogens investigated. All the other parameters investigated showed different associations with neonatal-specific IgG levels according to the antigen studied. There was no uniformity of the investigated parameters regarding association with placental IgG transfer ratios against the GBS, Pseudomonas LPS and Klebsiella LPS.

© 2014 John Wiley & Sons Ltd.

PAPER 2: Placental transfer of IgG antibodies specific to *Klebsiella* and *Pseudomonas* LPS and to group B *Streptococcus* in twin pregnancies.

Stach SCL, Brizot ML, Liao AW, Palmeira P, Francisco RPV, Carneiro-Sampaio MMS, Zugaib M. Scand J Immunol. 2015; 81 (2): 135-41. doi: 10.1111/sji.12258

Abstract

Group B *Streptococcus* (GBS), *Klebsiella* spp. and *Pseudomonas* spp. are important aetiological agents of neonatal infections in Brazil. There is a lack of data in the literature regarding the specific transport of immunoglobulin G (IgG) against these pathogens in multiple pregnancies. Maternal (n=55) and umbilical cord (n=110) blood samples were prospectively collected at birth from 55 twin pregnancies. The factors associated with cord levels and transfer ratios of IgG against GBS, *Klebsiella* and *Pseudomonas* were examined. The IgG umbilical cord serum levels specific to GBS, *Klebsiella* LPS and *Pseudomonas* LPS were significantly associated with maternal-specific IgG concentrations and the presence of diabetes. The anti-*Klebsiella* IgG cord serum concentrations were also related to birthweight and the presence of hypertension. The transfer ratios against GBS and *Pseudomonas* LPS were associated with maternal-specific IgG concentrations. The transfer ratios for GBS and *Pseudomonas* LPS were associated with gestational age at delivery and presence of diabetes, respectively. None of the examined parameters were related to *Klebsiella* LPS transfer ratios. We conclude that in twin pregnancies, specific maternal IgG serum concentrations and diabetes were the parameters associated with umbilical cord serum IgG concentrations reactive with the three pathogens investigated. All the other parameters investigated showed different associations with neonatal-specific IgG levels according to the antigen studied. There was no uniformity of the investigated parameters regarding association with placental IgG transfer ratios against the GBS, *Pseudomonas* LPS and *Klebsiella* LPS.

Introduction

The incidence of multiple pregnancies has increased worldwide. Compared with singleton pregnancies, twin pregnancies have a worse neonatal morbidity and higher mortality rate [1]. Therefore, twins have a higher incidence of admission to intensive care units (ICUs) [2]. Neonates in ICUs have a high risk of healthcare-associated infections, particularly premature infants and newborns with low birth weights [3,4]. In developed countries, the most common aetiological agents are Gram-positive cocci (coagulase-negative staphylococci, group B streptococci [GBS]), viruses and fungi, while in developing countries, the most common aetiological agents are Gram-negative enteric rods (*E. coli*, *Klebsiella* spp.), non-fermenters (*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp.) and fungi predominate [4]. In a recently published paper examining Brazilian paediatric patients, Gram-negative bacteria caused 49.9% of nosocomial infections, followed by Gram-positive bacteria in 42.6% and fungi in 8.4% of patients [5].

Neonatal immunity depends on the intrauterine acquisition of immunoglobulin G (IgG) through active transplacental transport mediated by FcRn receptor [6]. The levels of transport in singleton pregnancies depend on gestational age, maternal IgG levels and IgG subclass [7-9].

Neonates from multiple pregnancies have a higher risk of prematurity, ICU admissions and infection [1, 10]. There is a lack of data in the medical literature regarding the specific transport of immunoglobulins against *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp. and GBS in multiple pregnancies. Considering this lack, our objective is to investigate the factors associated with transplacental transfer of IgG against these agents and their concentrations in the umbilical cord serum in twin pregnancies.

Material and methods

Study population

A prospective study was conducted at Hospital das Clinicas, Sao Paulo University Medical School, Brazil, between May 2012 and November 2013. This study was approved by the University's institutional ethics committee (CAPPesq 0500/11), and informed consent was provided by all participants.

The inclusion criteria were women with twin pregnancies, negative maternal serologies for HIV, cytomegalovirus, hepatitis B and C, toxoplasmosis, rubella and no evidence of autoimmune disease, foetal malformations or genetic syndromes. The exclusion criteria were a post-natal diagnosis of positive results for the infectious diseases mentioned above or newborns with malformations or genetic syndromes.

Blood samples were collected from the mothers just before delivery and from the umbilical artery in each twin's umbilical cord soon after birth. The serum was separated, aliquoted and stored at – 80°C until used.

In all cases, chorionicity was determined using first-trimester ultrasound examination and/or placental pathology examination. Doppler examination of the umbilical artery was performed on a free loop of the umbilical cord near the abdominal wall insertion. Abnormal umbilical artery Doppler was defined as the presence of an increased pulsatility index (PI) or absent/reversed end diastolic flow [11]. The Doppler results from the last scan performed prior to delivery were considered during the analysis. Intrauterine growth restriction was defined as a birthweight below the 10th percentile, according to twin-specific charts [12].

The placental weight was obtained soon after birth. In dichorionic pregnancies, the placental weight was defined as the sum of both placentas; in monochorionic pregnancies, the weight of the single placenta was considered.

Immunoenzymatic assay

Commercial lipopolysaccharides (LPSs) from *K. pneumoniae* (strain 15380) from the American Type Culture Collection (ATCC) (Sigma, St. Louis, MO, USA) and from *P. aeruginosa* serotype 10, strain 27316 from the ATCC (Sigma) were used. The Department of Culture Collection at the Adolfo Lutz Institute (São Paulo, Brazil) kindly provided the group B *Streptococcus* strain that was used (type III, number H36C, batch 05/85, ref. ATCC 12403).

The levels of IgG antibody specific for *Klebsiella* and *Pseudomonas* LPS were determined using purified LPS (10 µg/ml) in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. The anti-GBS IgG levels were determined using a whole-cell assay, as previously described [13]. Briefly, an overnight culture of GBS grown in BHI (Brain heart Infusion, Difco) at 37°C was inactivated at 60°C for 1 h, centrifuged and resuspended in a carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.0) to an optical density (OD) of 0.8 at $\lambda=540$ nm. A 100-µl aliquot of the suspensions of the three antigens was added to each well to coat microtiter plates (Costar, Cambridge, MA, USA). The plates were incubated overnight at 4°C. After washing with PBS with 0.1% Tween-20 and blocking the plates with 1% skim milk, maternal and cord serum samples diluted in PBS-NaCl with 10% skim milk and 0.05% Tween-20 were incubated for 2 h in duplicate at 37°C. After washing, the plates were incubated with peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Sigma) for 2 h at 37°C. The reaction was developed with 0.4 mg/ml ortho-phenylenediamine (Sigma) for 30 min. A normal serum pool that was previously collected from healthy 18- to 40-year-old blood donors (both sexes) with negative conventional serologic test results was used as the control. The absorbances were measured at 492 nm (Multiskan, Labsystems). The anti-*Klebsiella* and *Pseudomonas* LPS and anti-GBS IgG concentrations were expressed as arbitrary units (AU/ml) and were obtained by comparing the OD values of the serum pool, which was defined as containing 1000 AU/ml.

The transfer ratio between the maternal and umbilical cord serum concentrations was calculated for each newborn by dividing the specific IgG

concentration in the neonate by the respective specific maternal IgG concentration and the result multiplied by 100.

The specific IgG concentrations and transfer ratios were analyzed according to the gestational age at delivery, placental chorionicity, birthweight, total placental weight, umbilical artery Doppler, maternal age, maternal-specific IgG antibody concentration, maternal color, maternal disease, history of smoking, hypertension during pregnancy, diabetes during pregnancy, intrauterine growth restriction, positive *Streptococcus B* cultures from vaginal or rectal swabs and type of delivery.

Statistical analysis

Student's t-test, Fisher's test or the non-parametric Mann-Whitney U-test was used to quantitatively compare the independent variables. Pearson's and Spearman's correlations were used to examine the associations between the continuous variables. Stepwise multivariate analysis was carried out on the variables that were significant at the $\leq 5\%$ level in the univariate model to investigate the significant factors associated with umbilical cord serum IgG concentration and transplacental transfer of anti-*Klebsiella* spp., anti-*Pseudomonas* spp. and anti-GBS IgG antibodies. We used the log of the umbilical cord serum IgG concentration and the transplacental transfer of anti-*Klebsiella* spp., anti-*Pseudomonas* spp. and anti-GBS IgG antibodies to perform the multivariate analysis because these variables were not normally distributed.

Results

Initially, 58 maternal and umbilical cord blood samples were collected during the study period. One twin pregnancy was excluded from the analysis due to a cardiac defect in one co-twin. Two pregnancies were excluded due to

insufficient amounts of blood collected from the umbilical cord at birth. Therefore, 55 maternal and 110 umbilical cord samples were analyzed. In one case, the placental weight was not measured, and the data from this case were not used in the placental weight analysis.

Maternal demographics, pregnancy and delivery information are presented in Table 1.

The maternal antibody concentrations, umbilical cord antibody concentrations and IgG transfer ratios are presented in Table 2

Univariate analysis

The maternal anti-GBS, anti-*Pseudomonas* spp. LPS and anti-*Klebsiella* spp. LPS IgG serum concentrations did not vary in any analyzed parameter.

Table 3 presents the univariate analysis of umbilical cord serum concentration and transfer ratio of IgG anti-GBS, anti-*Pseudomonas* spp. LPS and anti-*Klebsiella* spp. LPS in relation to all parameters studied.

Stepwise multivariate analysis

Multivariate analysis showed that the umbilical cord serum concentrations of anti-GBS, anti-*Klebsiella* spp. LPS and anti-*Pseudomonas* spp. LPS IgG antibodies were significantly associated with the specific maternal IgG concentrations and the presence of diabetes (Table 4; Figs 1-3). The anti-*Klebsiella* spp. LPS cord serum IgG concentration was also significantly associated with the birthweight and presence of hypertension (Table 4).

The IgG transfer ratios for the anti-GBS and anti-*Pseudomonas* spp. LPS were associated with the maternal specific IgG concentrations. The gestational age at delivery was associated with the anti-GBS IgG transfer ratio, while the presence of diabetes was associated with the anti-*Pseudomonas* spp. IgG transfer ratio (Table 5). None of the investigated parameters were associated with the anti-*Klebsiella* spp. IgG transfer ratio.

Discussion

This study is the first in the literature to investigate the factors associated with specific IgG antibody transfer in twin pregnancies. In the present study, the umbilical cord serum concentrations of IgG against GBS and *Pseudomonas* and *Klebsiella* LPS, as well as their transfer ratios, were associated with maternal-specific antibody concentrations, maternal disease, birthweight and gestational age. However, each antigen was related to different factors.

Maternal concentrations of specific antibodies against GBS, *Pseudomonas* spp. and *Klebsiella* spp. LPS was positively associated with the umbilical cord serum concentrations (Fig. 1) and negatively associated with the transfer ratio of the anti-GBS and anti-*Pseudomonas* antibodies (Fig. 2). It is well established that maternal immunoglobulins levels affect their placental transport [8,9,14,15]. In singleton pregnancies, Nagao *et al.* [12] and Palmeira *et al.* [17] studied the placental transfer of anti-*Escherichia coli* LPS IgG and observed a significant correlation between the maternal and cord serum levels. Lin *et al.* observed that increased levels of maternal antibodies decreased the probability of neonatal infection. The authors observed GBS transfer ratios that were similar to those in the present study [18,19]. Investigating the placental transfer of IgG against LPS from *Klebsiella* spp. and *Pseudomonas* spp., Silveira Lessa *et al.* [20] also demonstrated that the anti-LPS IgG levels in the cord serum correlated with the maternal concentrations.

We observed that the gestational age at delivery was associated only with the anti-GBS IgG transfer ratio. In a recent study in twin pregnancies, we observed that the total IgG cord concentration and transfer ratio were associated with gestational age [15]. In singleton pregnancies, Lin *et al.* [18,19] also found that the transfer ratio anti-GBS IgG increased with the gestational age. Silveira Lessa *et al.* [20] observed an association between the gestational

age and anti-LPS IgG levels against *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* LPS O111 but not against *Pseudomonas* spp. Van den Berg *et al.* [21] observed that polysaccharide specific antibodies had a lower transplacental transfer than protein specific antibodies. Therefore, these differences may explain the different transmission patterns for anti-GBS, anti-*Klebsiella* spp. LPS and anti-*Pseudomonas* spp. LPS IgG antibodies [7,16,20].

Our results also show that maternal diabetes had a positive correlation with the cord serum levels of all investigated antigens (Fig. 3), as well as the *Pseudomonas* transfer ratio. França *et al.* [22] investigated the transfer of immunoglobulins to neonates from mothers with diabetes in singleton pregnancies and found that the IgG levels in cord serum were higher in hyperglycemic mothers. Maternal hyperglycemia might facilitate the transport of IgG across the placenta. Hammes *et al.* and Kennedy *et al.* [23,24] have described higher levels of glycated IgG in the plasma of patients with diabetes. Glycation could interfere with the binding of IgG to FcRn and alter its transfer across the placenta.

Birthweight had a positive association with cord serum concentration of IgG against *Klebsiella* spp. Okoko *et al.* [25,26] demonstrated that low birthweight in singleton pregnancies impairs placental transfer of immunoglobulins, particularly IgG1 and IgG2. According to the authors, this result could help to explain the high susceptibility of these newborns to infections caused by polysaccharide-encapsulated organisms [25,26].

In the present study, hypertension was positively associated with the umbilical cord serum levels of IgG against *Klebsiella* spp. Chen *et al.* [27] found that placentas from hypertensive women showed evidence of immunopathological damage. IgG transfer depends on placental integrity, which is impaired in cases in which a placental injury exists, such as malaria [28]. Therefore, our results seem somewhat paradoxical and require further investigation.

Interestingly, chorionicity was not associated with umbilical cord serum concentrations or transfer ratios of IgGs against GBS or LPS from *Klebsiella*

spp. and *Pseudomonas* spp., despite our recent finding that chorionicity was significantly associated with the total cord serum IgG concentration [15].

Because multiple pregnancies have a high risk of prematurity [1] and premature neonates are at an increased risk of ICU admission and infection [2,3], it is important to understand how antibodies against the most prevalent agents of infections in this population are transported transplacentally, as well as the factors that affect their final concentrations in the umbilical cords of twins.

Our results show that only maternal-specific serum IgG concentrations and diabetes are associated with umbilical serum IgG concentrations reactive with GBS, *Pseudomonas* LPS and *Klebsiella* LPS. All other parameters investigated presented distinct relation to umbilical serum IgG concentrations according to each investigated antigen. None of the parameters investigated presented the same association with placental IgG transfer ratio against the GBS, *Pseudomonas* LPS and *Klebsiella* LPS.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (N. 2011/13587-4)

Table 1. Population Characteristics.

Characteristics	Results
White, n (%)	41 (74.6)
Parity, median (range)	1 (0 - 4)
Chorionicity	
Dichorionic, n (%)	35 (63.6)
Monochorionic diamniotic, n (%)	20 (36.4)
Maternal smoking history, n (%)	5 (9.1)
Pre-gestational maternal disease, n (%)	17 (30.9)
Hypertension during pregnancy, n (%)	11 (20)
Diabetes during pregnancy, n (%)	10 (18.2)
Abnormal umbilical artery pulsatility index, n (%)	7(6.3)
Gestational age of delivery, weeks, mean±standard deviation (SD)	36.1±1.7
Mode of delivery	
Cesarean section, n (%)	47 (85.5)
Vaginal delivery, n (%)	8 (14.6)
Birthweight, grams, mean±SD	2305.0±460.0
Male newborn, n (%)	51 (46.4)
Placental weight, grams, mean±SD	876.4±236.1
Streptococcus positive, n (%)	9 (17.3) *

* Data analyzed after removing 3 missing values

Table 2: Maternal serum concentration, umbilical cord serum concentration and transfer ratio of immunoglobulins against group B *Streptococcus*, *Pseudomonas* spp. LPS and *Klebsiella* spp. LPS.

	IgG anti- <i>Streptococcus</i> B	IgG anti- <i>Pseudomonas</i> LPS	IgG anti- <i>Klebsiella</i> LPS
Maternal serum concentration, mean±SD	438.4 ± 417.2	337.3 ± 694.5	715.5 ± 1213.0
Umbilical cord serum concentration, mean±SD	295.1 ± 250.7	280.1 ± 498.7	504.8 ± 933.9
Transfer ratio, mean±SD	75.1 ± 24.6	96.7 ± 32.1	84.4 ± 43.8

LPS, lipopolysaccharide; SD, Standard deviation

Table 3 Univariate analysis of variables analysed in relation to umbilical cord serum concentration and transfer ratio of IgG against group B *Streptococcus*, *Pseudomonas* spp, LPS and *Klebsiella* spp. LPS.

	Umbilical cord serum concentration		Transfer ratio			
	IgG anti-B <i>Streptococcus</i> spp.	IgG anti- <i>Pseudomonas</i> spp. LPS	IgG anti- <i>Klebsiella</i> spp. LPS	IgG anti-B <i>Streptococcus</i> spp.	IgG anti- <i>Pseudomonas</i> spp. LPS	IgG anti- <i>Klebsiella</i> spp. LPS
Placental weight, <i>r</i> (<i>P</i>)	0.23 (0.02)	0.16 (0.08)	0.09 (0.31)	0.14 (0.13)	0.23 (0.02)	0.07 (0.47)
Maternal serum concentration, <i>r</i> (<i>P</i>)	0.81 (<0.0001)	0.71 (0.0001)	0.76 (0.0001)	-0.35 (0.0002)	-0.24 (0.01)	-0.16 (0.08)
Chorionicity, <i>r</i> (<i>P</i>)	DC = 341.0 ± 277.6, MC = 214.8 ± 169.9, (0.002)	DC = 245.9 ± 290.6 MC = 339.8 ± 734.7, (0.47)	DC = 655.4 ± 1128.0, MC = 241.1 ± 270.1, (0.01)	DC = 77.6 ± 23.0 MC = 70.7 ± 26.9 (0.10)	DC = 100.0 ± 33.7 MC = 90.9 ± 28.7 (0.15)	DC = 88.2 ± 41.5 MC = 77.3 ± 47.4 (0.07)
D; mean ± SD, (<i>P</i>)	D = 491.9 ± 394.6, ND = 251.4 ± 181.8, (0.0005)	D = 342.2 ± 344.3, ND = 266.2 ± 527.4, (0.04)	D = 673.9 ± 627.3, ND = 467.2 ± 988.1, (0.005).	D = 82.3 ± 22.3 ND = 73.4 ± 24.9 (0.10)	D = 115.5 ± 25.4, ND = 92.6 ± 32.1, (0.0001)	D = 89.2 ± 39.6 ND = 83.3 ± 44.8 (0.34)
Mode of delivery; mean ± SD, (<i>P</i>)	C = 314.2 ± 259.2, V = 183.1 ± 155.6, (0.007)	C = 293.8 ± 535.1 V = 199.3 ± 152.6 (0.73)	C = 511.6 ± 943.2 V = 464.7 ± 905.8 (0.46)	C = 75.0 ± 25.0 V = 75.0 ± 23.0 (0.91)	C = 98.1 ± 32.1 V = 88.8 ± 32.1 (0.22)	C = 84.5 ± 40.8 V = 83.7 ± 60.3 (0.50)
Gestational age at delivery, <i>r</i> (<i>P</i>)	0.02 (0.85)	0.23 (0.02)	0.25 (0.008)	0.31 (0.009)	0.15 (0.10)	0.04 (0.66)
Birthweight, <i>r</i> (<i>P</i>)	0.04 (0.65)	0.22 (0.02)	0.23 (0.01)	0.18 (0.05)	0.10 (0.27)	0.05 (0.60)
Maternal age, <i>r</i> (<i>P</i>)	0.15 (0.12)	0.21 (0.03)	0.16 (0.07)	0.04 (0.65)	-0.05 (0.61)	-0.07 (0.44)
Pregestational MD; mean ± SD, (<i>P</i>)	MD = 312.9 ± 278.8 NMD = 287.1 ± 238.5 (0.34)	MD = 298.9 ± 472.2 NMD = 271.6 ± 512.8 (0.71)	MD = 593.3 ± 753.1, NMD = 465.1 ± 1006 (0.05)	MD = 77.4 ± 27.2 NMD = 74.0 ± 23.5 (0.65)	MD = 99.1 ± 30.6 NMD = 95.7 ± 32.9 (0.50)	MD = 87.8 ± 46.4 NMD = 82.9 ± 42.8 (0.53)
Hyp; mean ± SD, (<i>P</i>)	Hyp = 290.1 ± 130.4 NHyp = 296.3 ± 273.14 (0.14)	Hyp = 284.8 ± 531.9 NHyp = 278.8 ± 493.2 (0.87)	Hyp = 566.4 ± 722.9, NHyp = 489.3 ± 982.6 (0.05)	Hyp = 85.1 ± 32.3 NHyp = 72.6 ± 21.8 (0.21)	Hyp = 91.9 ± 22.9 NHyp = 97.9 ± 34.0 (0.68)	Hyp = 93.0 ± 51.8 NHyp = 82.2 ± 41.6 (0.34)

DC, dichorionic; MC, monochorionic D, diabetes; ND, no diabetes; Hyp, hypertension; NHyp, no hypertension; C, Caesarean section; V, vaginal delivery; MD, maternal delivery; NMD, no maternal disease; LPS, lipopolysaccharide. Bold values, *P* < 0.05.

Table 4: Stepwise multivariate analysis of variables associated with umbilical cord serum concentrations of IgG against group B *Streptococcus*, *Pseudomonas* spp. and *Klebsiella* spp. in twin pregnancies

	Coefficient	Standard error	P
Log (IgG anti-group B <i>Streptococcus</i>)			
Constant	4.74	0.06	< 0.001
Maternal serum concentration	0.001	0.0001	< 0.001
Diabetes	0.30	0.11	0.006
Log (IgG anti-<i>Pseudomonas</i> spp. LPS)			
Constant	4.34	0.09	< 0.001
Maternal serum concentration	0.001	0.0001	< 0.001
Diabetes	0.64	0.19	0.001
Log (IgG anti-<i>Klebsiella</i> spp. LPS)			
Constant	3.74	0.38	< 0.001
Maternal serum concentration	0.0007	0.00006	< 0.001
Diabetes	0.51	0.18	0.006
Birth weight	0.004	0.0001	0.015
Hypertension	0.61	0.18	0.001

Table 5: Stepwise multivariate analysis of variables associated with IgG transfer ratio of IgG against group B *Streptococcus* and *Pseudomonas* spp. in twin pregnancies.

	Coefficient	Standard error	P
Log (IgG anti-group B <i>Streptococcus</i>)			
Constant	2.26	0.65	< 0.001
Maternal serum concentration	- 0.0003	0.00007	< 0.001
Gestational age	0.06	0.02	0.001
Log (IgG anti-<i>Pseudomonas</i> spp. LPS)			
Constant	4.51	0.04	< 0.001
Maternal serum concentration	- 0.0001	0.00004	0.009
Diabetes	0.26	0.08	0.002

Figure 1: Umbilical cord serum concentration (n=110) of anti-group B *Streptococcus* (Strepto), anti-*Pseudomonas* spp. LPS (Pseudo) and anti-*Klebsiella* spp. LPS (Kleb) IgG in relation to maternal IgG serum concentrations in twin pregnancies. LPS= lipopolysaccharide

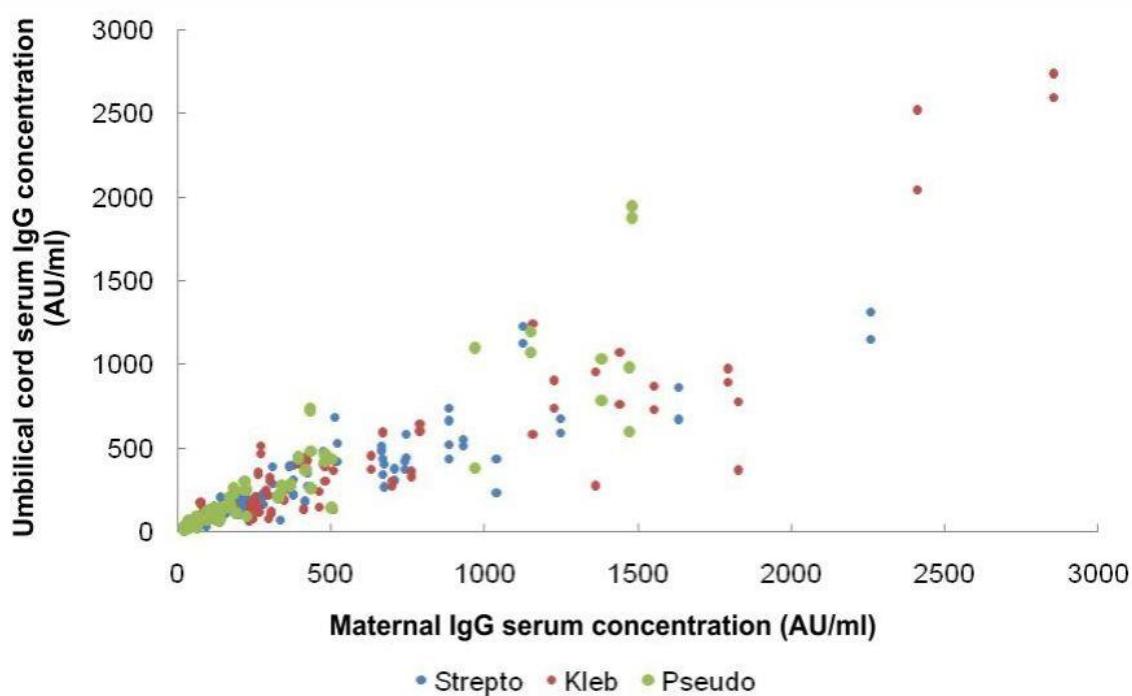


Figure 2: Transfer ratio (n=110) of anti-group B *Streptococcus* (Strepto), anti-*Pseudomonas* spp. LPS (Pseudo) and anti-*Klebsiella* spp. LPS (Kleb) IgG in relation to maternal IgG serum concentration in twin pregnancies (n=55). LPS= lipopolysaccharide

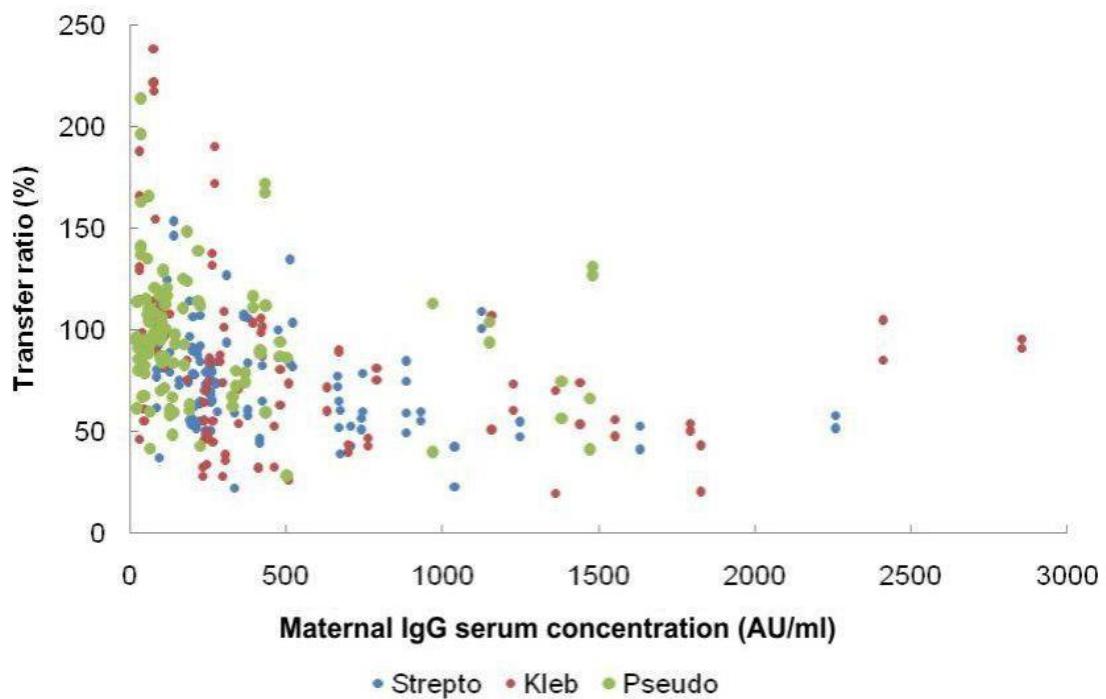
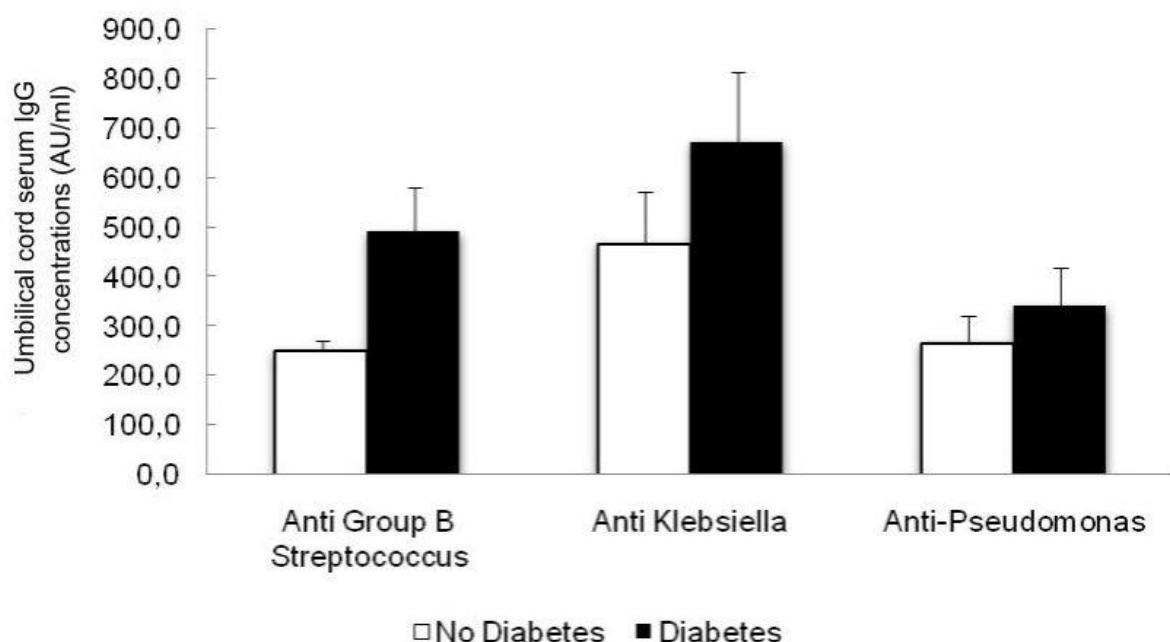


Figure 3: Mean and standard error of umbilical cord serum concentration of IgG (n= 110) against group B *Streptococcus*, *Klebsiella* spp. LPS and *Pseudomonas* spp. LPS in twin pregnancies (n= 55) with diabetes and no diabetes. LPS= lipopolysaccharide



References

1. Alexander GR, Salihu HM. Perinatal outcomes of singleton and multiple births in the United States, 1995-98. In: Blickstein I, Keith L., eds. *Multiple pregnancy: Epidemiology, Gestation & Perinatal Outcome*, 2 nd edn. UK: Informa Healthcare, 2006: 3-10.
2. Lemos EV, Zhang D, Van Voorhis BJ, Hu XH. Healthcare expenses associated with multiple vs singleton pregnancies in the United States. *Am J Obstet Gynecol* 2013;209:586.e1-11.
3. Couto RC, Carvalho EA, Pedrosa TM, Pedroso ER, Neto MC, Biscione FM. A 10-year prospective surveillance of nosocomial infections in neonatal intensive care units. *Am J Infect Control* 2007;35:183-9.
4. Srivastava S, Shetty N. Healthcare-associated infections in neonatal units: lessons from contrasting worlds. *J Hosp Infect* 2007;65:292-306.
5. Pereira CAP, Marra AR, Camargo LFA, et al. Nosocomial bloodstream infections in brazilian pediatric patients: microbiology, epidemiology, and clinical features. *Plos one* 2013;8:e68144. doi: 10.1371/journal.pone.0068144.
6. Simister NE, Story CM, Chen H, Hunt JS. An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta. *Eur J Immunol* 1996;26:1527-1531.
7. Malek A, Sager R, Kuhn P, Nicolaides KH, Schneider H. Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1996;36:248-55.

8. Hartter HK, Oyedele OI, Dietz K, Kreis S, Hoffman JP, Muller CP. Placental transfer and decay of maternally acquired antimeasles antibodies in Nigerian children. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:635-41.
9. Van der Zwet WC, Van den broucke-Grauls CM, van Elburg RM, Cranendonk A, Zaaijer HL. Neonatal antibody titers against varicella-zoster virus in relation to gestational age, birth weight, and maternal titer. *Pediatrics* 2002;109:79-85.
10. Hack KEA, Derkx JB, Elias SG *et al.* Increased perinatal mortality and morbidity in monochorionic versus dichorionic twin pregnancies: clinical implications of a large Dutch cohort study. *BJOG* 2008;115:58-67.
11. Arduini D, Rizzo G. Normal values of Pulsatility Index from fetal vessels: a cross-sectional study on 1556 healthy fetuses. *J Perinat Med* 1990;18:165-72.
12. Alexander GR, Kogan M; Martin J, Papiernik E. What are the fetal growth patterns of singletons, twins, and triplets in the United States? *Clin Obstet Gynecol* 1998;41:114-25.
13. Quinello C, Quintilio W, Carneiro-Sampaio M, Palmeira P. Passive acquisition of protective antibodies reactive with *Bordetella pertussis* in newborns via placental transfer and breast-feeding. *Scand J Immunol* 2010;72:66-73
14. Bryan E, Slavin B, Nicholson E. Serum immunoglobulins in multiple pregnancy. *Arch Dis Child* 1976;51:354–359.
15. Stach S, Brizot ML, Liao AW *et al.* Transplacental total IgG transfer in twin pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 2014;72:555-60.
16. Nagao AT, Martinez CC, Vieira VS, Takano OA, Costa-Carvalho BT, Carneiro-Sampaio MM. Placental transfer of IgG and IgG subclass antibodies anti-purified *Escherichia coli* LPS O16, O6 and O111. *Scand J Immunol* 1998;47:609-14.

17. Palmeira P, Yu Ito L, Arslanian C, Carneiro-Sampaio MM. Passive immunity acquisition of maternal anti-enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 IgG antibodies by the newborn. *Eur J Pediatr* 2007;166:413-9.
18. Lin FY, Weisman LE, Azimi PH, et al. Level of maternal IgG anti-group B streptococcus type III antibody correlated with protection of neonates against early-onset disease caused by this pathogen. *J Infect Dis* 2004;190(5):928-34.
19. Lin FY, Philips JB 3rd, Azimi PH, Weisman LE, et al. Level of maternal antibody required to protect neonates against early-onset disease caused by group B Streptococcus type Ia: a multicenter, seroepidemiology study. *J Infect Dis* 2001;184:1022-8.
20. Silveira Lessa AL, Krebs VL, Brasil TB, Pontes GN, Carneiro-Sampaio M, Palmeira P. Preterm and term neonates transplacentally acquire IgG antibodies specific to LPS from *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011;62:236-43.
21. Van den Berg JP, Westerbeek EA, Berbers GA, van Gageldonk PG, van der Klis FR, van Elburg RM. Transplacental Transport of IgG antibodies specific for Pertussis, Diphtheria, Tetanus, *Haemophilus influenzae* Type b, and *Neisseria meningitidis* Serogroup C is lower in preterm compared with term infants. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:801-5.
22. França EL, Calderon IMP, Vieira EL, Morceli G, Honorio-frança AC. Transfer of maternal immunity to newborns of diabetic mothers. *Clin Develop Immunol* 2012;2012, Article ID 928187: 7 pages. doi:10.1155/2012/928187.
23. Hammes HP, Kiefel V , Laube H , Federlin K. Impaired agglutination of IgM resulting from non enzymatic glycation in diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1990;9:37-42.

24. Kennedy DM, Skillen AW, Self CH. Glycation of monoclonal antibodies impairs their ability to bind antigen. *Clin Exp Immunol* 1994;98:245-251.
25. Okoko BJ, Wesumperuma HL, Fern J, Yamuah LK, Hart CA. The transplacental transfer of IgG subclasses: influence of prematurity and low birthweight in the Gambian population. *Ann Trop Paediatr* 2002;22:325-32.
26. Okoko BJ, Wesumperuma LH, Hart AC. Materno-foetal transfer of *H.influenzae* and pneumococcal antibodies is influenced by prematurity and low birth weight: implications for conjugate vaccine trials. *Vaccine* 2001;20:647-50.
27. Chen H, Xu J, Lu Q, Ma T. Immunohistochemical analysis of globulin and complements in blood vessels of placental villi during pregnancy induced hypertension. *J Tongji Med Univ* 1996;16:253-256.
28. Okoko BJ, Wesuperuma LH, Ota MO *et al*. The influence of placental malaria infection and maternal hypergammaglobulinemia on transplacental transfer of antibodies and IgG subclasses in a rural West African population. *J Infect Dis* 2001;184:627-32.

5-Discussão

We have published 2 articles regarding the placental transfer of immunoglobulins in twin pregnancies. The first article focused on the transfer of total IgG, and the second article focused on the transfer of IgGs specific to *Klebsiella* spp. LPS, *Pseudomonas* spp. LPS, and Group B *Streptococcus* (GBS).

5.1. First article

In the first article, stepwise multivariate analysis was used to demonstrate that the concentration of total IgG in cord serum was positively correlated both with the concentration of total IgG in maternal serum and with gestational age at delivery (GAD). Dichorionic twins had a higher concentration of total IgG in cord serum than monochorionic twins. The total IgG transfer ratio was found to have a negative correlation with the concentration of total IgG in maternal serum and was positively correlated with GAD.

It is well established in the literature that the concentration of total IgG in cord serum has a positive correlation with the concentration of total IgG in maternal serum⁽¹⁶⁾. Van den Berg *et al.* and Van der Zwet *et al.* conclude that the concentration of IgG in maternal serum is the primary determinant of cord serum concentrations of IgG against varicella-zoster virus, pertussis, diphtheria, tetanus, *Haemophilus influenzae* type B and *Neisseria meningitidis* serogroup C^(27,46). In a prospective study of 50 twin pregnancies, Bryan and colleagues also

find a positive correlation between the concentration of total IgG in maternal serum and the concentration of total IgG in cord serum⁽⁴⁰⁾.

However, a negative correlation between the concentration of total IgG in maternal serum and the total IgG transfer ratio has also been observed. This phenomenon has been described in several studies^(16,28,29) and is explained by placental receptor saturation, which limits IgG transfer across the placenta.

There is also significant evidence in the literature that the concentration of total IgG in cord serum correlates positively with GAD⁽¹⁶⁾. Malek and colleagues demonstrate a continuous rise in umbilical cord serum concentrations of IgG in second and third trimester of pregnancy, which explains that the majority of immunoglobulins are transferred to the fetus during the last month of pregnancy⁽¹⁸⁾. Several studies report that cord levels of immunoglobulins against several antigens are lower in preterm versus term neonates^(24,25,46,47). The placental transfer of total IgG is also found to have a positive correlation with GAD. This phenomenon can be explained by the placental changes that occur during pregnancy. FcRn exist in syncytiotrophoblast. At early gestacional ages, syncytiotrophoblast covers a continuous cytotrophoblast layer. As gestation advances, the cytotrophoblast layer becomes progressively discontinuous, which enables easier transfer of immunoglobulins from maternal blood into fetal circulation⁽²²⁾. The fact that this transfer is influenced by GAD is important to explain the high susceptibility of preterm neonates to infection⁽²⁴⁾. Twin pregnancies have a higher incidence of prematurity compared to single pregnancies. Therefore, twins have a greater incidence of mortality related to infectious disease⁽⁵⁾.

In this paper, we demonstrated that the concentration of total IgG in cord serum was correlated with chorionicity. This is the first published study that has addressed this subject. Monochorionic twins had lower concentrations of total IgG in cord sera compared to dichorionic twins. Considering that chorionicity was not found to correlate with placental transfer of total IgG, this result is most likely explained by the distribution of immunoglobulins between the two fetal circulations, as monochorionic placentas are known to present vascular anastomosis⁽⁴⁸⁾. Monochorionic placentas may also present a higher incidence

of pathological lesions, such as hematomas, infarction and subchorial fibrin deposits, which may also impair the transport of immunoglobulins⁽⁴⁹⁾.

We also observed a positive correlation in total cord concentrations in intrapair twins. Bryan also noted a positive correlation between the concentrations of total IgG in umbilical cord of twins⁽⁴⁰⁾.

There is a paucity of data in the medical literature concerning the influence of chorionicity on neonatal infection. In a large Dutch cohort study of 1305 twin pregnancies, a higher incidence of necrotizing enterocolitis is observed in monochorionic versus dichorionic neonates; however, no difference is noted with respect to the incidence of sepsis⁽⁴⁵⁾. Domingues *et al* in a study with 323 twins, observe a higher incidence of infections (sepsis and necrotizing enterocolitis) in monochorionic neonates⁽⁵⁰⁾.

The results of this publication have shown that not only GAD and the concentration of total IgG in maternal serum, but also chorionicity influenced the concentrations of total IgG in cord sera in twin pregnancies. Twin pregnancies present a higher incidence of prematurity compared to single pregnancies. The prevention of spontaneous preterm delivery is difficult, and strategies such as the use of progesterone and cerclage have not yet been proven to be beneficial^(51,52). Moreover, the incidence of iatrogenic preterm births has increased^(53,54), which appears to be a consequence of increasing rates of obstetric intervention and advancements in neonatal care leading to a decline in fetal and infant mortality among twins. Changes to the limit of fetal viability is also important and has been influenced by the use of antenatal glucocorticoid therapy, surfactants and assisted ventilation⁽⁵⁴⁾. Here, at the Obstetric Clinic of the Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), we follow a policy of delivering monochorionic monoamniotic twins at 34 weeks, monochorionic diamniotic twins at 36 weeks and dichorionic twins at 38 weeks of pregnancy. Therefore, it is critical to address the risk of infection in these high-risk pregnancies to better manage and reduce the morbidity of the associated newborns, who have a high chance of being born with immature immune system. Monochorionic twins require special attention because chorionicity and GAD can both lead to a greater risk of infection.

5.2 Second article

In our second article, which focused on the placental transport of IgG against *Klebsiella* spp. LPS, *Pseudomonas* spp. LPS and GBS, the stepwise multivariate analysis demonstrated that umbilical cord concentration against all 3 antigens were positively related to specific maternal IgG concentration and the presence of diabetes. The concentration of IgG against *Klebsiella* LPS in the umbilical cord was also associated with birth weight and maternal hypertension. The IgG transfer ratio for IgG against GBS and *Pseudomonas* spp. LPS correlated to specific maternal IgG concentrations. Furthermore GAD was associated with anti-GBS transfer ratio and maternal diabetes was related to anti-*Pseudomonas* spp. LPS transfer ratio.

Several publications in the medical literature confirm that the concentration of IgG in cord serum is strongly correlated with maternal levels of IgG, as discussed above. Furthermore, several studies also observe that IgG cord serum concentration against LPS antigens have a robust relation to IgG maternal serum concentration against specific LPS antigens^(36,55,56,57). The association between cord serum concentration of anti-GBS and IgG maternal serum concentration against GBS has also been observed by Suara *et al.*⁽⁵⁸⁾. A study by Lin *et al.* investigated the maternal levels of antibodies against GBS groups 1A and 3 that would protect neonates against early-onset disease caused by these pathogens. The authors observe that increasing maternal levels against these agents decline the probability of neonatal related disease^(38,39). Similar values as our transfer ratio of anti-GBS were found by Lin *et al.* and Suara *et al.*^(38,39,58).

It is interesting to note that we were unable to observe an influence of GAD on cord serum concentration against *Klebsiella* spp. LPS, *Pseudomonas* spp. LPS and GBS. In our first publication, we were able to detect an

association between GAD and the concentration of total IgG in cord serum; however, other studies that have been published on the transplacental transfer of LPS antibodies also didn't observe this association. Nagao *et al.* note mean cord serum concentrations of IgG against *Escherichia coli* LPS O111 of 2.4 mg/l in term neonates and 1.5 mg/l in preterm neonates, although no significant differences were found between these values ($p=0.06$)⁽⁵⁶⁾. Lessa *et al.*, in a study of placental transfer of IgG against LPS of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, observe that maternal concentrations of IgG is the only determining factor that affects the cord concentrations of the homologous anti-LPS IgG species, according to univariate analysis⁽³⁶⁾. The authors additionally note no significant difference in the concentrations of anti-*Klebsiella* IgG in the cord sera of preterm versus term neonates. They observe lower cord serum concentrations of IgG against *Pseudomonas* LPS in nenoates born at 33-37 weeks of gestation when compared to those born at term. However, the cord levels concentrations of IgG against *Pseudomonas* LPS were statistically similar in term and preterm born < 33 gestational weeks.

In our study, we observed that the transfer ratio of IgG against GBS was related to GAD. This is in accordance with a previous study by Lin, in which it was observed that transplacental transfer of immunoglobulins against GBS type 3 is related to GAD. The authors observe that in neonates born at <34 gestational weeks, cord serum levels were only 56% of maternal level; however, in neonates born at ≥ 34 gestational weeks, the transfer ratio was 76% of maternal levels⁽³⁹⁾.

Notably, IgG1 is the most prevalent IgG subclass in human sera and is also the type of IgG most frequently transferred across the placenta^(17,18,19,59). Therefore, we can assume that the most prevalent subclass of total IgG is IgG1. Conversely, immune responses against GBS are primarily exerted through IgG2, whereas exposure to LPS bacteria primarily stimulates the production of IgG1 and IgG2^(16,17,20,21). IgG2 crosses the placenta less efficiently than other IgG classes, reflecting its low affinity for FcRn^(17,18,19). Malek *et al.* observe that concentrations of all of the subclasses of IgG increase over the course of a

pregnancy, although IgG2 has the lowest increase compared with other subclasses^(18,23). Van den Berg *et al.* notice that LPS immunoglobulins have a lower rate of placental transfer than proteins-specific antibodies⁽⁴⁶⁾. They also observe that the placental transfer of antibodies specific to polysaccharide-based vaccines is less influenced by gestational age of delivery than is the transfer of antibodies specific to protein-based vaccines⁽⁴⁶⁾. These differences could potentially explain the varying influence of GAD on total IgG concentrations and on the concentrations of IgGs against *Klebsiella* spp. LPS, *Pseudomonas* spp. LPS and GBS.

In our study, we did not find any association between maternal GBS colonization status and IgG cord serum concentration against GBS. Suara also reached the same conclusion in a Gambian study⁽⁵⁸⁾.

Our results have also demonstrated that the presence of diabetes was positively associated with cord serum concentrations of IgG against GBS, *Pseudomonas* spp and *Klebsiella* spp and also with *Pseudomonas* transfer ratio. To the best of our knowledge, the association between diabetes and the concentration of immunoglobulins in cord serum has only been previously observed by França *et al.*⁽⁶⁰⁾. In this study, the transfer of maternal immunity to neonates of diabetic mothers was examined. The results indicated that levels of IgG in maternal serum are lower in hyperglycemic mothers. It was further observed that the concentration of IgG in the cord sera of neonates born to diabetic mothers is higher than in the cord sera of neonates born to normoglycemic mothers. Nevertheless, in our study, the presence of diabetes was not associated with total IgG concentration in either maternal serum or cord serum. In our study, there was only a subset of 10 mothers with diabetes in a population of 55 women (18,1%), whereas in the França study there were 20 diabetic women in a study of 40 patients (50%). Some authors have described an increased level of glycated IgG in diabetic patients^(61,62). The glycation of a protein occurs through a spontaneous reaction in which reducing sugars become bound to the protein⁽⁶¹⁾. Kennedy *et al.* hypothesized that glycation may involve both the Fab as the Fc portion of the antibody⁽⁶¹⁾. Because no impact was noted by the presence of diabetes in the concentration of total IgG

in cord serum, but impact was noted in cord serum concentrations of IgG antibodies against GBS, *Pseudomonas* spp. LPS and *Klebsiella* spp. LPS, we hypothesize that diabetes induces a preferential shift toward favoring IgG2, which interferes with its ability to bind to Fc Receptor and leads to enhanced placental transfer.

A notable example of an immunoglobulin modification that enhanced placental transfer was published by Einarsdottir *et al.* The four subclasses of IgG are named based on their decreasing abundance in adult serum. The primary reason for low serum concentrations of Ig3 in adults is due its short half-life of 7 days, compared to 21 days for other subclasses. Einarsdottir *et al.* demonstrate that the shorter half life of IgG3 is related to its decreased pH dependent-binding of FcRn, which is caused by a changing of a histidine into an arginine at position 435 in the IgG- Fc tail of IgG3. IgG3 allotypes that express a histidine at this position have a half-life equal to that of IgG1^(63,64). This allotype is also transported across the placenta as efficiently as IgG1. Therefore, we hypothesize that IgG2 undergoes some type of molecular transformation that is associated with maternal diabetes, which causes it to be preferentially transported across the placenta.

We observed that birthweight had a positive influence on the cord serum concentration of IgG anti-*Klebsiella* spp. LPS. This is in agreement with Okoko *et al.*, that observe that low birth weight decreases the placental transfer of IgG against *Haemophilus influenzae* and *Pneumococcus pneumoniae* in a Gambian population⁽²⁶⁾. They also observe that the placental transfer of IgG1 and IgG2 are impaired in neonates with low birth weight⁽⁴⁷⁾, which could explain their susceptibility to polysaccharide- encapsulated organisms⁽⁴⁷⁾.

Our results also showed that hypertension was positively associated with IgG cord serum concentrations againts *Klebsiella* spp. LPS. This finding seems paradoxical, as placental transfer of immunoglobulins depends on placental integrity. Reduced placental transfer has been described in situations when placental abnormalities exists, for reasons such as malaria infection, fetofetal transfusion syndrome, hydrops fetalis and congenital hepatic disease^(30,31,65,66). Chen *et al.* observe an immunopathological damage in placental villi

blood vessels of hypertensive women⁽⁶⁷⁾. Therefore, this subject demands further investigation.

It is important to study the transfer of immunoglobulins that are against the most prevalent pathogens that causes neonatal infections in twin pregnancies. In comparison to total IgG, we observed that different factors affected the cord serum concentrations and transfer ratios of immunoglobulins against *Klebsiella* spp. LPS, *Pseudomonas* spp. LPS and GBS. This most likely reflects the most common IgG subclass implied in the immune response against these antigens and the varying affinities that these immunoglobulins possess for FcRn. Maternal serum concentration of immunoglobulins against these specific antigens and the presence of maternal diabetes were the two most common factors associated with active placental transport of immunoglobulins against the above-listed antigens, as they were associated with the cord serum concentrations against all of the above listed pathogens. The concentration of IgG in maternal serum was found to be correlated with the placental transfer of antibodies against GBS and *Pseudomonas* spp. LPS, whereas the presence of diabetes was only correlated with the placental transfer of *Pseudomonas* spp. LPS. Gestational age was exclusively correlated with the placental transfer of IgG against GBS. The cord serum concentration of IgG against *Klebsiella* spp. LPS was also positively influenced by birth weight and maternal hypertension. None of the parameters investigated correlated with the placental transfer of immunoglobulins against *Klebsiella* spp. LPS.

5.3 Practical contribution of studies on placental transport of immunoglobulins and future directions

5.3.1 Maternal vaccination

A thorough understanding of IgG placental transport is important for the development of vaccines that can be used in pregnant women to protect

newborns. The rationale behind maternal immunization is based on the potential benefit that the acquisition of maternal antibodies may offer a neonate in terms of modifying the severity of neonatal disease⁽⁶⁸⁾. The agents that can cause infections during the first days of life before active immunity can be induced are excellent candidates for the strategy of maternal immunization⁽⁶⁹⁾. Maternal immunization can protect both the mother and the neonate against infection⁽⁶⁸⁾. The efficacy of a vaccine depends on several factors, such as the concentrations of specific IgGs in maternal serum, the concentration of total IgG in serum, the type of vaccine, the timing of vaccine administration during pregnancy, the gestational age of the neonate at birth, the IgG subclasses that are involved in the maternal immune response, and placental integrity^(16, 68).

As expected, there is a correlation between the IgG concentrations of maternal and cord sera. However, mothers who have high concentrations of total IgG in their serum may have an impairment of IgG placental transfer due to saturation of FcRn⁽⁶⁸⁾.

Vaccines that induce high IgG concentrations, especially of IgG1, lead to better placental transfer of immunoglobulins, as IgG1 is more efficiently transferred through the placenta than IgG2⁽⁶⁸⁾. Vaccines composed of protein antigens, such as tetanus toxoid, predominantly induce IgG1 and IgG3 immune responses and are therefore better transferred than vaccines against polysaccharide antigens, which primarily elicit an IgG2 response⁽⁷⁰⁾. Therefore, vaccines that contain capsular polysaccharides conjugated to protein carriers have been developed and have been shown to evoke a more robust IgG1 response⁽⁶⁹⁾. For example, *Haemophilus influenzae* type B (Hib) polysaccharide conjugate vaccines have a good placental transport and maternal antibodies circulate in neonatal serum for a duration of at least 2 months⁽¹⁶⁾. Conjugated vaccines for type 3 capsular polysaccharide GBS with tetanus toxoid are also efficiently transported across the placenta⁽¹⁶⁾.

The timing of vaccine administration is also important. Placental transfer of IgG is greater in the third trimester of pregnancy. The highest levels of transfer are achieved when mothers are vaccinated at least 4 weeks before delivery⁽⁶⁸⁾. IgG cord levels against Hib are lower in neonates born to mothers

who were immunized prior to pregnancy versus mothers who were immunized during their third trimester. Premature neonates receive lower levels of maternal immunoglobulins⁽⁶⁸⁾.

Placental integrity influences the transport of immunoglobulins. HIV and malaria have both been associated with an impairment of the placental transport of IgG against tetanus, *Haemophilus influenzae* B and measles⁽⁶⁸⁾.

One concern regarding maternal immunization is related to the potential suppression of neonate immunological responses due to the presence of maternal immunoglobulins. This phenomenon was described in some studies concerning measles, tetanus and whole cell pertussis⁽¹⁶⁾. However, data conflict regarding this subject, and the effect of maternal antibodies on infant immune response appears to depend on the type, dose and schedule of a given vaccine⁽⁷⁰⁾. A collection of studies found that vaccinating a mother with the Hib conjugate vaccine or the diphtheria, tetanus and acellular pertussis vaccine (DTaP) did not affect the immune response of the infant at 1 year^(68,69). High concentrations of maternal antibodies at birth modestly and transiently impaired infant response to active immunization against Hib at 2 months, but not at 6 months⁽⁶⁸⁾. Although the persistence of maternal immunoglobulins may prejudice the infant immune response, the effect seems to be temporary, and the administration of repeated doses of a vaccine is usually sufficient to overcome this issue⁽¹⁶⁾. Therefore, a reduced response to immunization may be acceptable in exchange for reducing morbidity during the first months of life⁽⁷⁰⁾.

The administration of vaccines that are used worldwide, such as those against tetanus toxoid and trivalent inactivated influenza virus, is a routine aspect of prenatal care. Others, such as pneumococcal polysaccharide vaccine, meningococcal polysaccharide vaccine and hepatitis A and B vaccines, are recommended only in special circumstances^(16,68). Several studies have demonstrated higher cord sera concentrations of immunoglobulins in neonates of mothers who were immunized against influenza and DTaP compared to unvaccinated mothers⁽¹⁶⁾. The monovalent H1N1 vaccine that was administered in 2009 has reduced the cases of influenza in both mothers and

infants⁽⁷⁰⁾. The safety of maternal vaccination has been demonstrated with respect to numerous vaccines, such as DTaP and influenza⁽⁷⁰⁾.

Several new vaccines against GBS, respiratory syncytial virus and cytomegalovirus are being developed⁽⁷⁰⁾.

GBS is an important cause of neonatal infections across the globe. Currently, the prevention of early onset GBS infection is based on the administration of intra-partum prophylactic antibiotics. However, this strategy has no impact on late onset disease and can increase the risk of maternal anaphylaxis and the development of antibiotic resistance⁽⁷⁰⁾. A vaccine against GBS could prevent these problems, and a phase 2 study on a GBS vaccine has already been completed⁽⁷¹⁾.

I believe that neonatal infection prevention via maternal vaccination should be highly considered for women who are pregnant with twins. Multiple pregnancies have a high incidence of prematurity and therefore present high rates of infection and high degrees of morbidity and mortality. Indeed, prematurity affects several organ systems, including the respiratory, gastrointestinal, immunological, auditory, ophthalmic and central nervous systems. Several strategies have been used to improve the survival of and decrease the morbidity in premature neonates, such as the administration of antepartum corticosteroids, mechanical ventilation, the use of surfactants and antibiotics, blood cell transfusion, and admission to neonatal intensive care units. The most important actions that are performed by obstetricians in preventing prematurity are delaying delivery (via the suppression of contractions) for long enough to permit the use of antenatal steroids and transferring mothers to tertiary hospitals as required. Our results have shown that monochorionic twins are under special risk because their concentrations of total IgG in cord sera are lower than in dichorionic twins. Therefore, maternal immunization against pathogens that can cause early onset infectious diseases should be recommended early on in the third trimester of pregnancy.

5.3.2 Immunoglobulin use in mothers with primary immunodeficiency

Women with primary humoral deficiency diseases depend on the administration of exogenous immunoglobulins to prevent recurrent infections. As placental transfer of IgG is dependent on maternal serum levels of IgG, the neonates of these mothers are at a high risk of infection. Palmeira *et al.* investigating the administration of intravenous IgG to mothers with Common Variable Immunodeficiency (CVID) find that exogenous immunoglobulins have a similar pattern of placental transfer as endogenous antibodies. They note higher concentrations of total IgG in cord sera of term neonates than in maternal sera. They also note preferential placental transfer of IgG1, IgG3 and IgG4 to IgG2. Likewise, a preferential transfer of anti-protein IgG is observed relative to anti-polysaccharide IgG^(16,20). Therefore, the administration of immunoglobulins to mothers with primary humoral deficiencies can protect both women and their neonates and should therefore be highly recommended.

5.3.3 Mothers with autoimmune diseases

Auto-immune diseases are prevalent in 5-8% of the population⁽¹⁵⁾. IgG autoantibodies that can potentially cause damage to tissues and organs can also be transferred across the placenta. This phenomenon has been observed in mothers with Systemic Lupus Erythematosus (SLE), pemphigus, myasthenia gravis, epidermolysis bullosa, antiphospholipid syndrome and autoimmune thrombocytopenia^(15,16). In SLE, the Ro/SSA and LA/SSB autoantibodies can be transferred across the placenta and cause Neonatal Lupus Erythematosus. In these neonates, congenital heart blockages, skin injuries, hepatobiliary diseases and hematologic abnormalities can all be present. With the exception of cardiac blockage, the remaining symptoms typically disappear following the removal of maternal autoantibodies from neonatal circulation^(15,16). A promising

therapeutic strategy for the treatment of IgG mediated autoimmune diseases is the inhibition of FcRn using high doses of innocuous immunoglobulins, which would decrease the placental transfer of antibodies through the saturation of the receptor and also cause an increase in IgG degradation^(15,16). Indeed, using a mouse model of pemphigoid, Li *et al.* successfully demonstrated that administration of high doses of immunoglobulins resulted in a dilution of pathogenic antibodies and prevented disease⁽⁷²⁾. However, this approach may also decrease the maternal transfer of protective immunoglobulins. Therefore, more specific therapies are under investigation, such as the development of therapeutic antibodies⁽⁷³⁾.

5.3.4 Placental transfer of therapeutic immunoglobulins

Therapeutic immunoglobulins are nondestructive immunoglobulins that should be able to block antigen binding while retaining the ability to bind FcRn⁽⁷³⁾. Therefore, in order to control fetal disease caused by pathogenic maternal IgG, the administration to the mother of this nondestructive IgG that retains the ability to cross the placenta and shares the specificity of the pathogenic antibody is a good strategy. In this respect, Mathiesen *et al.* have developed an immunoglobulin without effector functions that was demonstrated to have a placental transport rate similar to IgG1⁽⁷³⁾. Similar therapeutic immunoglobulins could be used to treat a wide range of diseases, such as hemolytic disease of the fetus and newborn, which is caused by maternal anti-D antibodies. The current treatment for this disease involves intrauterine transfusion of compatible donor blood into the umbilical cord vein. Intravenous administration of the above described novel therapeutic immunoglobulin to the mother would be a safer approach and could potentially be used to treat the rare cases of hemolysis that occur at very early gestational ages when intrauterine transfusion is not possible due to the tiny dimensions of fetal veins⁽⁷³⁾. Furthermore, specific therapeutic molecules designed only for the fetus could be transferred to the fetus via FcRn, such as drugs that are linked to the IgG-Fc domain⁽¹⁵⁾.

5.3.5 Future contributions of our study

I believe that the most important conclusions of our study are the observation that chorionicity was associated with the concentration of total IgG in cord serum and that, in twin pregnancies, a positive correlation existed between maternal diabetes and the cord serum concentrations of antibodies against GBS, *Pseudomonas* spp. LPS and *Klebsiella* spp. LPS.

Our study was the first to address the association between chorionicity and the concentration of total IgG in cord serum. Monochorionic twins had lower concentrations of total IgG in cord sera than dichorionic twins. This could be a disadvantage, as it might increase the risk of infection. Furthermore, monochorionic twins are born prematurely and GAD is another factor that correlates with total IgG cord serum concentration. Therefore, special attention and additional surveillance for infection are required for these neonates. Maternal vaccination may represent an effective strategy for protecting these neonates against early infections. Although the highest placental transfer of IgG occurs during the last month of pregnancy, the higher maternal concentrations of IgG that are induced by maternal immunization could help to increase their concentration of total IgG in cord serum at birth.

In our study, we observed a positive correlation between maternal diabetes and cord serum concentrations of IgGs against GBS, *Pseudomonas* spp. LPS and *Klebsiella* spp. LPS. To the best of our knowledge, ours is the second study to investigate the association between maternal diabetes and the concentration of IgG in cord serum. França *et al.* observed that hyperglycemia, which was present in 50% of their study population, positively influenced the concentration of total IgG in cord serum. Similar findings were not observed in our study population. However, we did find a positive association between maternal diabetes, which was present in 18% of our study population, and cord serum concentrations of IgGs against GBS, *Pseudomonas* spp. LPS and *Klebsiella* spp. LPS. Therefore, I believe that diabetes can induce preferential transfer of IgG2 across the placenta. Among the subclasses of IgG, IgG2 has

the lowest rate of placental transport. This is a subject that deserves further study, as understanding the details behind these observations could help elucidate the mechanism behind the inefficient transfer of IgG2. Such knowledge could be used by the pharmaceutical industry to develop new innovations, such as the development of better vaccines against LPS antigens or the engineering of immunoglobulins with prolonged half-lives that could increase humoral immunity.

6-CONCLUSÕES

- O valor médio de IgG total em gestações gemelares foi de $827,5 \pm 193,0$ mg/dL.
- A concentração de IgG total em cordão umbilical em gestações gemelares apresentou correlação positiva com a concentração total de IgG no sangue materno e com a idade gestacional do parto.
- A concentração de IgG total em cordão umbilical de gestações gemelares foi significativamente menor em gestações monocoriônicas quando comparadas às dicoriônicas.
- A taxa média de transferência de IgG total em gestações gemelares foi de $104,4 \pm 29,0$ %. Essa taxa apresentou uma correlação positiva apenas com a idade gestacional de nascimento, e uma correlação negativa apenas com os níveis maternos séricos de IgG total.
- As concentrações médias de IgG contra o *Streptococcus* do grupo B e as LPS de *Klebsiella* spp. e de *Pseudomonas* spp. em cordão umbilical de gestações gemelares foram de $295,1 \pm 250,7$, $504,8 \pm 933,9$ e $280,1 \pm 498,7$ UA/ml respectivamente.
- As concentrações de IgG contra o *Streptococcus* do grupo B e as LPS de *Klebsiella* spp. e de *Pseudomonas* spp. em cordão umbilical de gestações gemelares apresentaram uma correlação positiva com os níveis de anticorpos maternos séricos específicos para cada antígeno e com a presença de diabetes materno.

- A concentração de IgG contra a LPS de *Klebsiella* spp. também apresentou associação positiva com o peso de nascimento e a hipertensão materna.

- O status da colonização materna por *Streptococcus* B não se correlacionou com as concentrações de IgG contra o *Streptococcus* do grupo B e as LPS de *Klebsiella* spp. e de *Pseudomonas* spp..

- As taxas médias de transferência de IgG contra o *Streptococcus* do grupo B e as LPS de *Klebsiella* spp. e de *Pseudomonpas* spp. foram de $75,1 \pm 24,6$, $84,4 \pm 43,8$ e $96,7 \pm 32,1$ % respectivamente. As taxas de transferência de IgG contra o *Streptococcus* do grupo B e a LPS de *Pseudomonas* spp. foram influenciadas pela concentração materna específica de cada antígeno. As taxas de transferência de IgG contra o *Streptococcus* do grupo B e a LPS de *Pseudomonas* spp. foram também influenciadas pela idade gestacional de nascimento e pela presença de diabetes respectivamente.

7-Anexos

Anexo A



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0500/11

Título: TRANSFERÊNCIA DE ANTICORPOS EM GESTAÇÕES MÚLTIPLAS

Pesquisador Responsável: Adolfo Wenjaw Liao

Pesquisador Executante: Sonia Christina Leme Stach

Co-autores: Vera Lúcia Jornada Krebs, Werther Brunow de Carvalho, Ana Lúcia Silveira Lessa-Marques, Simone Corrêa da Silva, Patricia Palmeira, Profa. Magda Carneiro-Sampaio, Maria de Lourdes Brizot, Marcelo Zugaib

Finalidade Acadêmica: Não envolve obtenção de título acadêmico

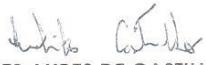
Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 28/09/2011 o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) a elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 28 de Setembro de 2011


PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
 Coordenador
 Comissão de Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo B



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0500/11

Título: TRANSFERÊNCIA DE ANTICORPOS EM GESTAÇÕES MÚLTIPLAS

Pesquisador Responsável: Adolfo Wenjaw Liao

Pesquisador Executante: Sônia Christina Leme Stach

Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÉNCIA** na sessão datada de 19/06/2013, o(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

- Carta datada de 14/03/2013 - Relatório parcial e Inclusão da Profa. Dra. Rossana Pulcineli Vieira Francisco e Dra. Renata de Araújo Monteiro Yoshida
- Carta datada de 06/06/2013 - Subprojeto que será tese de mestrado da Dra. Renata de Araújo Monteiro Yoshida com o título "Evolução neonatal e perfil dos anticorpos anti-Streptococcus B, anti-LPS de Klebsiella e Pseudomonas e IgA em gêmeos", tendo como orientadora a Profa. Dra. Vera Lúcia Jornada Krebs - Subprojeto que será tese de doutorado da Dra. Sônia Christina Leme Stach com o título "Transferência Transplacentária de anticorpos em gestações gemelares", tendo como orientadora a Profa. Dra. Maria de Lourdes Brizot

CAPPesq, 25 de Junho de 2013

alfredomansur

PROF. DR. ALFREDO JOSÉ MANSUR
Vice Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo C



Hospital das Clínicas da FMUSP
 Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Ao

Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU** na sessão datada de 19.06.13 a execução do subprojeto intitulado: "**Transferência Transplacentária de anticorpos em gestações gemelares**", que será tese de Doutorado da aluna **Sônia Christina Leme Stach**, tendo como orientadora **Profa. Dra. Maria de Lourdes Brizot**.

O referido projeto faz parte do **Protocolo de Pesquisa nº 0500/11**, intitulado "**Transferência de anticorpos em gestações múltiplas**", tem como Pesquisador Responsável: **Dr. Adolfo Wenjaw Liao**

CAPPesq, 25 de Junho de 2013.

PROF. DR. ALFREDO JOSÉ MANSUR
 Vice Coordenador
 Comissão de Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo D

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

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .MF

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

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: MF

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

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: TRANSFERÊNCIA MATERNA DE ANTICORPOS EM RECÉM NASCIDOS DE GESTAÇÕES MÚLTIPLAS

PESQUISADOR : Dr Adolfo Wenjaw Liao

CARGO/FUNÇÃO: médico-docente INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 84.880

UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da FMUSP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 (dois) anos

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

A senhora está sendo convidada para participar da pesquisa “TRANSFERÊNCIA MATERNA DE ANTICORPOS EM RECÉM NASCIDOS DE GESTAÇÕES MÚLTIPLAS”. O objetivo deste estudo é estudar a transferência de anticorpos entre as mães e as crianças em gestações gemelares.

As gestações gemelares são consideradas de alto risco por apresentarem uma maior chance de complicações tanto para a mãe como para os bebês. Dentre essas complicações há o risco de parto prematuro , o que aumenta as chances de infecções nos recém-nascidos.

Anticorpos são proteínas produzidas pelo nosso sistema de defesa que nos protegem contra as infecções. Estudos realizados com mulheres que apresentavam uma gestação com um único bebê mostraram que as mães que apresentavam altas taxas de anticorpos contra bactérias normalmente causadoras de infecções nos bebês, tiveram os seus bebês protegidos contra estas infecções. Não existem estudos sobre este assunto com gestações gemelares. Assim, o objetivo desta pesquisa é analisar como os anticorpos maternos passam para os bebês em gestações gemelares e o quanto isto os ajudaria a se protegerem contra infecções.

Para isto, nas pacientes que aceitarem participar deste projeto será coletado uma amostra de sangue em veia periférica quando elas internarem no centro obstétrico do Hospital das Clínicas para realização do parto. Aproveitaremos a mesma punção que seria realizada para infundir fluidos no seu organismo, durante a anestesia, portanto não será necessária punção adicional para a coleta do sangue.

Após o nascimento dos seus filhos será também coletado uma amostra de sangue de cada um dos cordões umbilicais e também serão retiradas amostras das placenta para serem analisadas. Uma amostra de colostro (o

leite) também será coletado no berçário nas primeiras 72 horas após o parto por ordenha manual. Nestas diferentes amostras serão então determinadas a quantidade de anticorpos existentes.

Você não terá nenhum benefício direto na participação no estudo. Entretanto, os conhecimentos obtidos podem vir a ser úteis futuramente na prevenção e tratamento de infecções em bebês gemelares.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dr Adolfo Liao que pode ser encontrado na Clínica Obstétrica, 10º andar, Instituto Central, Hospital das Clínicas - Av Dr Enéas de Carvalho Aguiar 255, de 2ª a 6ª feira, das 08 às 12horas; telefone: 11 3069 6209.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Assim você concordará em ceder uma amostra de seu sangue, uma amostra do sangue dos cordões de seus bebês, amostras de placenta e de colostro para serem usadas nesta pesquisa e você também autorizará a guarda deste material para estudos futuros relacionados.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Todas as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo " TRANSFERÊNCIA MATERNA DE ANTICORPOS EM RECÉM-NASCIDOS DE GESTAÇÕES MÚLTIPLAS".

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordei voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

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

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Anexo E

Projeto: Transferência transplacentária de Anticorpos em Recém-Nascidos de Gestações Multiplas

Instrumento de Coleta de Dados

Data e Hora do processamento da placenta: _____

Nome: _____

Idade _____ SILOG: _____ RG-HC: _____

Cor: Branca () Parda () Negra () Amarela ()

____ Gesta ____ Para ____ Aborto

Doenças/Antecedentes: _____

Dados da Gestação

DUM: _____ 1º USG: DATA: _____ IG: _____

IG definitiva: DUM () / 1º USG ()

Corionicidade: _____

Medicamentos durante a gestação: _____

Fumo não () sim () _____

Álcool não () sim () _____

Drogas ilícitas não () sim () _____

Hipertensão durante a gestação: não () sim () _____

Rastreamento de diabetes: não () sim () _____

Uso de corticóide antes do parto:
aplicadas: _____ não () sim () datas

Usou sulfato de magnésio: não () sim () _____

RCIU 1 _____ RCIU 2 _____

RPMO não () sim () data/hora _____

Uso de antibiótico para RPMO:não () sim () _____

Outras intercorrências obstétricas: _____

Internação hospitalar durante a gestação: _____

Sorologias negativas para HIV, CMV, Hepatite, RSS, Toxo, Rubeola e Herpes:não () sim ()

Colonização strepto B: Negativa () Positiva () não pesquisada ()

Dados do Parto

Data: _____ Hora: _____ Idade gestacional: _____

Preparo de colo: não () sim () _____

Entrou em trabalho de parto: não () sim ()

Recebeu oxigênio complementar durante o parto: não () sim ()

Anestesia: raqui () peridural () duplo bloqueio () geral ()

Tipo de parto realizado: vaginal () cesárea () combinado ()

Uso de antibiótico durante o parto:não () sim () _____

Dados Neonatais

Peso RN1: _____ Peso RN2: _____

Sexo 1 _____ Sexo 2 _____

Apgar 1 _____ Apgar 2 _____

pH1 _____ pH2 _____

Reanimação 1 _____ Reanimação 2 _____

Peso da placenta: única _____ placentas 1/2: _____ / _____

Data da alta 1 _____ Data da alta 2 _____

Alta vivo 1: Sim () Não () Alta vivo 2: Sim () Não ()

Infecção RN1 _____

Infecção RN 2 _____

Dianosticos do berçario 1

Diagnósticos do berçario 2

Resultados de exames

Confirmação da corionicidade pela histologia: não () sim ()

Exames maternos

IgG Total: _____

IgG anti streptococcus B: _____

IgG anti klebsiella: _____

IgG anti pseudomonas: _____

IgG Total sangue de cordão 1: _____ cordão 2: _____

IgG anti streptococcus B RN1: _____ RN2: _____

IgG anti klebsiella RN1: _____ RN2: _____

IgG anti pseudomonas RN1: _____ RN2: _____

Concentração FcRn interface materno-placentária: _____

Exames do colostro

Concentração IGA total: _____

Concentração IGA anti streptococcus: _____

Concentração IGA anti klebsiella: _____

Concentração IGA anti pseudomonas: _____

Anexo F**Permissão de uso da figura 1**

Our authors have produced a large number of scholarly papers and we would like to enable our website visitors to link and share that material. It's free for everyone, everywhere in the world, as long as it is referenced and backlinked.

Permissão de uso de figuras 2 e 3

SPRINGER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Apr 06, 2015

This is a License Agreement between sonia stach ("You") and Springer ("Springer") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number 3603370185934

License date Apr 06, 2015

Licensed content Springer
Publisher

Licensed content Wiener Medizinische Wochenschrift
publication

Licensed content HFcRn-mediated transplacental immunoglobulin G transport:
title Protection of and threat to the human fetus and newborn

Licensed content Isabella Ellinger
author

Licensed content Jan 1, 2012
date

Volume number 162

Issue number 9

Type of Use Thesis/Dissertation

Portion Figures

Author of this No
Springer article

Order reference None
number

Original figure figure A, figure D
numbers

Title of your thesis / Transferência transplacentária de anticorpos
dissertation em gestações múltiplas

Expected Aug 2015
completion date

Estimated 100
size(pages)

Total 0.00 USD

Terms and Conditions

Introduction

The publisher for this copyrighted material is Springer Science + Business Media. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Limited License

With reference to your request to reprint in your thesis material on which Springer Science and Business Media control the copyright, permission is granted, free of charge, for the use indicated in your enquiry.

Licenses are for one-time use only with a maximum distribution equal to the number that you identified in the licensing process.

This License includes use in an electronic form, provided its password protected or on the university's intranet or repository, including UMI (according to the definition at the Sherpa website: <http://www.sherpa.ac.uk/romeo/>). For any other electronic use, please contact Springer at (permissions.dordrecht@springer.com or permissions.heidelberg@springer.com).

The material can only be used for the purpose of defending your thesis limited to university-use only. If the thesis is going to be published, permission needs to be re-obtained (selecting "book/textbook" as the type of use).

Although Springer holds copyright to the material and is entitled to negotiate on rights, this license is only valid, subject to a courtesy information to the author (address is given with the article/chapter) and provided it concerns original material which does not carry references to other sources (if material in question appears with credit to another source, authorization from that source is required

as well).

Permission free of charge on this occasion does not prejudice any rights we might have to charge for reproduction of our copyrighted material in the future.

Altering/Modifying Material: Not Permitted

You may not alter or modify the material in any manner. Abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of the author(s) and/or Springer Science + Business Media. (Please contact Springer at permissions.dordrecht@springer.com or permissions.heidelberg@springer.com)

Reservation of Rights

Springer Science + Business Media reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

Copyright Notice:Disclaimer

You must include the following copyright and permission notice in connection with any reproduction of the licensed material: "Springer and the original publisher /journal title, volume, year of publication, page, chapter/article title, name(s) of author(s), figure number(s), original copyright notice) is given to the publication in which the material was originally published, by adding; with kind permission from Springer Science and Business Media"

Warranties: None

Example 1: Springer Science + Business Media makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

Example 2: Springer Science + Business Media makes no representations or warranties with respect to the licensed material and adopts on its own behalf the limitations and disclaimers established by CCC on its behalf in its Billing and

Payment terms and conditions for this licensing transaction.

Indemnity

You hereby indemnify and agree to hold harmless Springer Science + Business Media and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

No Transfer of License

This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without Springer Science + Business Media's written permission.

No Amendment Except in Writing

This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of Springer Science + Business Media, by CCC on Springer Science + Business Media's behalf).

Objection to Contrary Terms

Springer Science + Business Media hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and Springer Science + Business Media (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

Jurisdiction

All disputes that may arise in connection with this present License, or the breach thereof, shall be settled exclusively by arbitration, to be held in The Netherlands, in accordance with Dutch law, and to be conducted under the Rules of the

'Netherlands Arbitrage Instituut' (Netherlands Institute of Arbitration). OR:

All disputes that may arise in connection with this present License, or the breach thereof, shall be settled exclusively by arbitration, to be held in the Federal Republic of Germany, in accordance with German law.

Other terms and conditions:

v1.3

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.

Permissão de uso da figura 4

Copyright © 2012 Patricia Palmeira *et al.* This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

7-Referência bibliográfica

1. Martin JA, Hamilton BE, Osterman MJK. Three Decades of Twin Births in the United States, 1980–2009. NCHS data brief, no 80. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. 2012. Disponível em <http://www.cdc.gov/nchs/data/databriefs/db80.htm>
2. Ministério da Saúde. Sistema de informações de Nascidos Vivos (SINASC). Atualização ano 2011. Brasília 2011. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>
3. Bortolus R, Parazzini F, Chatenoud L, Benzi G, Bianchi MM, Marini A. The epidemiology of multiple births. *Hum Reprod Update*. 1999; 5 (2): 179-87.
4. Martin JA, Park MM. Trends in Twin and Triplet Births: 1980–97, *Natl Vital Stat Rep*. 1999; 47 (24): 1-16.
5. Alexander GR, Salihu HM. Perinatal outcomes of singleton and multiple births in the United States, 1995-98. In: Blickstein I and Keith L. *Multiple Pregnancy: Epidemiology, gestation & Perinatal outcome*, United Kingdom: Informa Healthcare, editor; 2006, Second edition p 3-10.
6. Lemos EV, Zhang D, Van Voorhis BJ, Hu XH. Healthcare expenses associated with multiple vs singleton pregnancies in the United States. *Am J Obstet Gynecol*. 2013; 209 (6): 586.e1-586.e11.
7. Lawn JE, Cousens S, Zupan J; Lancet Neonatal Survival Steering Team. 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet*. 2005; 365 (9462): 891-900.

8. Srivastava S, Shetty N. Healthcare-associated infections in neonatal units: lessons from contrasting worlds. *J Hosp Infect.* 2007 ; 65 (4): 292-306.
9. Ehrlich P. Ueber Immunität durch Vererbung und Säugung. *Zeitschr Hyg Infekt Krankh.* 1892; 12 (1): 183-203.
10. Brambell FW, Lond CBE. The transmission of passive immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. *The Lancet.* 1966; 288 (7473): 1087-93.
11. Fonseca ESVB, Cabar FR, Nomura RMY. Placenta e sistema amniótico. In Zugaib M. *Obstetricia.* São Paulo: Manole; 2008: 75-92.
12. Simister NE, Story CM, Chen HL, Hunt JS. An IgG transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta. *Eur J Immunol.* 1996; 26 (7): 1527-31.
13. Leach JL, Sedmak DD, Osborne JM, Rahill B, Lairmore MD, Anderson CL. Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport. *J Immunol.* 1996; 157 (8): 3317-22.
14. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.* 5th edition. New York: Garland Science; 2001. The structure of a typical antibody molecule. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27144/>
15. Ellinger I, Fuchs R. hFcRn-mediated transplacental immunoglobulin G transport: Protection of and threat to the human fetus and newborn. *Wien Med Wochenschr.* 2012; 162 (9-10): 207-13.
16. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG Placental Transfer in Healthy and Pathological Pregnancies. *Clin Develop Immunol.* 2012; 2012: Article ID 985646, 13 pages.
17. Garty BZ, Ludomirsky A, Danon YL, Peter JB, Douglas SD. Placental transfer of immunoglobulin G subclasses. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1994; 1 (6): 667-9.

18. Malek A, Sager R, Kuhn P, Nicolaides KH, Schneider H. Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 1996; 36 (5): 248-55.
19. Malek A. Ex vivo human placenta models: transport of immunoglobulin G and its subclasses. *Vaccine.* 2003; 21 (24): 3362-4.
20. Palmeira P, Costa-Carvalho BT, Arslanian C, Pontes GN, Nagao AT, Carneiro-Sampaio MM. Transfer of antibodies across the placenta and in breast milk from mothers on intravenous immunoglobulin. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009; 20 (6): 528-35.
21. Pitcher-Wilmott RW, Hindocha P, Wood CB. The placental transfer of IgG subclasses in human pregnancy. *Clin Exp Immunol.* 1980; 41 (2): 303-8.
22. Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine.* 2003; 21 (24): 3365-9.
23. Malek A, Sager R, Schneider H. Maternal Fetal transport of Immunoglobulin G and its subclasses during the third trimester of human pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 1994; 32 (1): 8-14.
24. Van den Berg JP, Westerbeek EA, van der Klis FR, Berbers GA, van Elburg RM. Transplacental transport of IgG antibodies to preterm infants: a review of the literature. *Early Hum Dev.* 2011; 87 (2): 67-72.
25. Okoko JB, Wesumperuma HL, Hart CA. The influence of prematurity and low birthweight on transplacental antibody transfer in a rural West African population. *Trop Med Int Health.* 2001; 6 (7): 529-34.
26. Okoko JB, Wesumperuma HL, Hart CA. Materno-foetal transfer of *H. influenzae* and pneumococcal antibodies is influenced by prematurity and low birth weight: implications for conjugate vaccine trials. *Vaccine.* 2001; 20 (5-6): 647-50.
27. Van Der Zwet WC, Van den broucke-Grauls CM, van Elburg RM, Cranendonk A, Zaaijer HL. Neonatal antibody titers against varicella-zoster

virus in relation to gestational age, birth weight, and maternal titer. *Pediatrics*. 2002; 109 (1): 79-85.

28. Mäntyjärvi R, Hirvonen T, Toivanen P. Maternal antibodies in human neonatal sera. *Immunology*. 1970; 18 (3): 449-51.

29. Hartter HK, Oyedele OI, Dietz K, Kreis S, Hoffman JP, Muller CP. Placental transfer and decay of maternally acquired antimeasles antibodies in Nigerian children. *Pediatr Infect Dis J*. 2000; 19 (7): 635-41.

30. Okoko BJ, Wesumperuma LH, Ota MO, Pinder M, Banya W, Gomez SF, McAdam KP, Hart AC. The influence of placental malaria infection and maternal hypergammaglobulinemia on transplacental transfer of antibodies and IgG subclasses in a rural West African population. *J Infect Dis*. 2001; 184 (5): 627-632.

31. Moro L, Bardají A, Nhampossa T, Mandomando I, Serra-Casas E, Sigaúque B, Cisteró P, Chauhan VS, Chitnis CE, Ordi J, Dobaño C, Alonso PL, Menéndez C, Mayor A. Malaria and HIV infection in mozambican pregnant women are associated with reduced transfer of antimalarial antibodies to their newborns. *J Infect Dis*. 2015; 211 (6): 1004-14.

32. de Moraes-Pinto MI, Almeida AC, Kenj G, Filgueiras TE, Tobias W, Santos AM, Carneiro-Sampaio MM, Farhat CK, Milligan PJ, Joonson PM, Hart CA. Placental transfer and maternally acquired neonatal IgG immunity in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis*. 1996; 173 (5): 1077-84.

33. Björkqvist M, Jurstrand M, Bodin L, Fredlund H, Schollin J. Defective neutrophil oxidative burst in preterm newborns on exposure to coagulase-negative staphylococci. *Pediatr Res*. 2004; 55 (6): 966-71.

34. Zaidi AK, Huskins WC, Thaver D, Bhutta ZA, Abbas Z, Goldmann DA. Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. *Lancet*. 2005; 365 (9465): 1175-88.

35. Couto RC, Carvalho EA, Pedrosa TM, Pedroso ER, Neto MC, Biscione FM. A 10-year prospective surveillance of nosocomial infections in neonatal intensive care units. *Am J Infect Control*. 2007; 35 (3): 183-9.

36. Silveira Lessa AL, Krebs VL, Brasil TB, Pontes GN, Carneiro-Sampaio M, Palmeira P. Preterm and term neonates transplacentally acquire IgG antibodies specific to LPS from Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011; 62 (2): 236-43.
37. Stoll BJ, Hansen NI, Sánchez PJ, Faix RG, Poindexter BB, Van Meurs KP, Bizzarro MJ, Goldberg RN, Frantz ID 3rd, Hale EC, Shankaran S, Kennedy K, Carlo WA, Watterberg KL, Bell EF, Walsh MC, Schibler K, Laptook AR, Shane AL, Schrag SJ, Das A, Higgins RD. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and E. coli disease continues. *Pediatrics.* 2011; 127 (5): 817-26.
38. Lin FY, Philips JB 3rd, Azimi PH, Weisman LE, Clark P, Rhoads GG, Regan J, Concepcion NF, Frasch CE, Troendle J, Brenner RA, Gray BM, Bhushan R, Fitzgerald G, Moyer P, Clemens JD. Level of maternal antibody required to protect neonates against early-onset disease caused by group B Streptococcus type Ia: a multicenter, seroepidemiology study. *J Infect Dis.* 2001; 184 (8): 1022-8.
39. Lin FY, Weisman LE, Azimi PH, Philips JB 3rd, Clark P, Regan J, Rhoads GG, Frasch CE, Gray BM, Troendle J, Brenner RA, Moyer P, Clemens JD. Level of maternal IgG anti-group B streptococcus type III antibody correlated with protection of neonates against early-onset disease caused by this pathogen. *J Infect Dis.* 2004; 190 (5): 928-34.
40. Bryan EM, Slavin B, Nicholson E. Serum immunoglobulins in multiple pregnancy. *Arch Dis Child.* 1976; 51 (5): 354-9.
41. Carroll SG, Tyfield L, Reeve L, Porter H, Soothill P, Kyle PM. Is zygosity or chorionicity the main determinant of fetal outcome in twin pregnancies? *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 193 (3 pt1): 757-61.
42. Gezer A, Rashidova M, Güralp O, Ocer F. Perinatal mortality and morbidity in twin pregnancies: the relation between chorionicity and gestational age at birth. *Arch Gynecol Obstet.* 2012; 285 (2): 353-60.

43. Bittar RE, Pereira PP, Liao AW. Gestação múltipla. In: Zugaib M. Obstetrícia. São Paulo: Manole; 2008: 679-98.
44. Leduc L, Takser L, Rinfret D. Persistence of adverse obstetric and neonatal outcomes in monochorionic twins after exclusion of disorders unique to monochorionic placentation. *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 193: 1670- 5.
45. Hack KE, Derkx JB, Elias SG, Franx A, Roos EJ, Voerman SK, Bode CL, Koopman-Esseboom C, Visser GH. Increased perinatal mortality and morbidity in monochorionic versus dichorionic twin pregnancies: clinical implications of a large Dutch cohort study. *BJOG*. 2008; 115 (1): 58-67.
46. Van den Berg JP, Westerbeek EA, Berbers GA, van Gageldonk PG, van der Klis FR, van Elburg RM. Transplacental transport of IgG antibodies specific for pertussis, diphtheria, tetanus, haemophilus influenzae type b, and Neisseria meningitidis serogroup C is lower in preterm compared with term infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2010; 29 (9): 801-5
47. Okoko BJ, Wesumperuma HL, Fern J, Yamuah LK, Hart CA. The transplacental transfer of IgG subclasses: influence of prematurity and low birthweight in the Gambian population. *Ann Trop Paediatr*. 2002; 22 (4): 325-32.
48. Robertson EG, Neer KJ. Placental injection studies in twin gestation. *Am J Obstet Gynecol*. 1983; 147 (2): 170-4.
49. Kent EM, Breathnach FM, Gillan JE, McAuliffe FM, Geary MP, Daly S, Higgins JR, Hunter A, Morrison JJ, Burke G, Higgins S, Carroll S, Dicker P, Maning F, Tully E, Malone F. Placental pathology, birthweight discordance, and growth restriction in twin pregnancy: results of the ESPRiT Study. *Am J Obstet Gynecol*, 2012; 207: 220.e1-5.
50. Domingues AP, Gonçalves S, Vasco E, Fonseca E, Moura P. Chorionicity in twin pregnancies: impact upon perinatal results. *Acta Obstet Ginecol Port*. 2007; 1 (4): 163-6.
51. Norman JE, Mackenzie F, Owen P, Mactier H, Hanretty K, Cooper S, Calder S, Mires G, Danielian P, Sturgiss S, MacLennan G, Tydeman G, Thornton S, Martin B, Thornton JG, Neilson JP, Norrie J. Progesterone for the

prevention of preterm birth in twin pregnancy (STOPPIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled study and meta-analysis. *The Lancet.* 2009; 373 (9680): 2034 – 40.

52. Rafael TJ, Berghella V, Alfirevic Z. Cervical stitch (cerclage) for preventing preterm birth in multiple pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014; 9: Art. No.: CD009166.

53. Papiernik E. Preventing preterm birth in twins and triplets. In: Blickstein I and Keith L. *Multiple Pregnancy: Epidemiology, gestation & Perinatal outcome*, United Kingdom: Informa Healthcare, editor; 2006, Second edition p 631-9.

54. Ananth CV, Joseph KS. Impact of obstetric intervention on trends in perinatal mortality. In: Blickstein I and Keith L. *Multiple Pregnancy: Epidemiology, gestation & Perinatal outcome*, United Kingdom: Informa Healthcare, editor; 2006, Second edition p 651- 9.

55. Palmeira P, Yu Ito L, Arslanian C, Carneiro-Sampaio MM. Passive immunity acquisition of maternal anti-enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) O157:H7 IgG antibodies by the newborn. *Eur J Pediatr.* 2007; 166 (5): 413-9.

56. Nagao, A. T., Friedlander-Del Nero, D., Arslanian, C. and Carneiro-Sampaio, M. M. S. Elevated Levels and Different Repertoire Profile of Colostral Anti-LPS Antibodies May Have a Significant Role in Compensating Newborn Immunity. *Scand J Immunol.* 2001; 53: 602–9.

57. Nagao AT, Martinez CC, Vieira VS, Takano OA, Costa-Carvalho BT, Carneiro-Sampaio MM. Placental transfer of IgG and IgG subclass antibodies anti-purified Escherichia coli LPS O16, O6 and O111. *Scand J Immunol.* 1998; 47 (6): 609-14.

58. Suara RO, Adegbola RA, Mulholland EK, Greenwood BM, Baker CJ. Seroprevalence of antibodies to group B streptococcal polysaccharides in Gambian mothers and their newborns. *J Natl Med Assoc.* 1998; 90 (2): 109-14.

59. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5: 520.
60. França EL, Calderon IMP, Vieira EL, Morceli G, Honorio-França AC. Transfer of Maternal Immunity to Newborns of Diabetic Mothers. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012: Article ID 928187, 7 pages.
61. Kennedy DM, Skillen AW, Self CH. Glycation of monoclonal antibodies impairs their ability to bind antigen. *Clin Exp Immunol*. 1994; 98 (2): 245-51.
62. Hammes HP, Kiefel V, Laube H, Federlin K. Impaired agglutination of IgM resulting from non-enzymatic glycation in diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 1990; 9 (1): 37-42.
63. Einarsdottir HK, Stapleton NM, Scherjon S, Andersen JT, Rispens T, van der Schoot CE, Vidarsson G. On the perplexingly low rate of transport of IgG2 across the human placenta. *PLoS One*. 2014; 9 (9): e108319.
64. Einarsdottir H, Ji Y, Visser R, Mo C, Luo G, Scherjon S, van der Schoot CE, Vidarsson G. H435-containing immunoglobulin G3 allotypes are transported efficiently across the human placenta: implications for alloantibody-mediated diseases of the newborn. *Transfusion*. 2014; 54 (3): 665-71.
65. de Moraes-Pinto MI, Verhoeff F, Chimsuku L, Milligan PJ, Wesumperuma L, Broadhead RL, Brabin BJ, Johnson PM, Hart CA. Placental antibody transfer: influence of maternal HIV infection and placental malaria. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1998; 79 (3): 202-5.
66. Bryan EM. IgG deficiency in association with placental oedema. *Early Hum Dev*. 1977; 1 (2): 133-43.
67. Chen H, Xu J, Lu Q, Ma T. Immunohistochemical analysis of globulin and complements in blood vessels of placental villi during pregnancy induced hypertension. *J Tongji Med Univ*. 1996; 16 (4): 253- 6.
68. Englund JA. The influence of maternal immunization on infant immune responses. *J Comp Pathol*. 2007; 137 Suppl 1: 16-19.

69. Hodgins DC, Shewen PE. Vaccination of neonates: problem and issues. *Vaccine*. 2012; 30 (9): 1541-59.
70. Lindsey B, Kampmann B, Jones C. Maternal immunization as a strategy to decrease susceptibility to infection in newborn infants. *Curr Opin Infect Dis*. 2013; 26 (3): 248-53.
71. US National Institute of health. Clinicaltrials.gov. 2015; available from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01446289>
72. Li N, Zhao M, Hilario-Vargas J, Prisayanh P, Warren S, Diaz LA, Roopenian DC, Liu Z. Complete FcRn dependence for intravenous Ig therapy in autoimmune skin blistering diseases. *J Clin Invest*. 2005; 115 (12): 3440-50.
73. Mathiesen L, Nielsen LK, Andersen JT, Grevys A, Sandlie I, Michaelsen TE, Hedegaard M, Knudsen LE, Dziegiele MH. Maternofetal transplacental transport of recombinant IgG antibodies lacking effector functions. *Blood*. 2013; 122 (7): 1174-81.