LAILA LIMA

**Impacto da imunização materna com *Bordetella pertussis* na
resposta celular e nos níveis de anticorpos IgG séricos e IgA
secretores adquiridos passivamente pelo recém-nascido**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção de
título de Mestre em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Palmeira

Daenekas Jorge

São Paulo

2018

LAILA LIMA

Impacto da imunização materna com *Bordetella pertussis* na resposta celular e nos níveis de anticorpos IgG séricos e IgA secretores adquiridos passivamente pelo recém-nascido

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Palmeira

Daenekas Jorge

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Laila

Impacto da imunização materna com Bordetella pertussis na resposta celular e nos níveis de anticorpos IgG séricos e IgA secretores adquiridos passivamente pelo recém-nascido / Laila Lima. -- São Paulo, 2018.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Pediatria.

Orientadora: Patricia Palmeira Daenekas Jorge.

Descritores: 1.Bordetella pertussis 2.Vacinas contra difteria, tétano e coqueluche acelular 3.Gestantes 4.Imunidade materno-adquirida 5.Imunoglobulina G 6.Imunoglobulina A secretora 7.Imunização passiva 8.Recém-nascido 9.Linfócitos T

USP/FM/DBD-271/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

A minha amada família

Dedico esta dissertação a minha mãe Maria, minha irmã Luana e meu noivo Rodrigo que sempre me incentivaram a estudar, me encorajaram nas horas difíceis e me ajudaram de todas as formas possíveis e imagináveis para que todo o meu tempo e atenção fossem dedicados para conclusão deste trabalho. É enorme a admiração que sinto por vocês. Obrigada por estarem sempre ao meu lado.

Agradecimento especial

À minha orientadora Dra. Patricia Palmeira pela oportunidade oferecida, por dividir comigo seu enorme conhecimento científico, por acreditar em mim, muito mais do que eu mesmo, por ouvir cada opinião minha como ouviria a de alguém com anos de pesquisa, por toda alegria, sinceridade e paciência (ou a falta dela rs..) no nosso dia-a-dia no laboratório. Enfim, agradeço por tê-la ao meu lado durante esta caminhada.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus por me iluminar e me guiar todos os dias e por me abençoar com família e amigos maravilhosos.

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

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

À Dra. Maria Isabel Valdomir Nadaf e à Dra. Olga Akiko Takano pela imprescindível colaboração para realização deste trabalho. Obrigada pela dedicação, incentivo, confiança e carinho.

À Dra. Mariela da Gama Fortunato Molina por coletar as amostras utilizadas, bem como, todas as informações referentes às parturientes e seus filhos.

À Beatriz Sena Pereira, aluna de iniciação científica e amiga querida, por me auxiliar na realização dos experimentos científicos e análises de resultados.

Às todos os amigos do Laboratório de Investigação Médica (LIM-36): Andreia Rangel Santos, Thiago Porto Silva, Simone Corrêa da Silva, Regina Célia de Paula Pena, Bernadete de Lourdes Liphhaus e Aline Paulino Sposito. Em especial agradeço à Ana Lucia Silveira Lessa, Fernanda Andrade Macaferri da Fonseca e Yingying Zheng, pelo carinho, pela alegre convivência, por serem tão solidárias e por me ensinarem o poder de uma palavra amiga.

À Dra. Hisako Gondo Higashi, diretora da Divisão Bioindustrial do Instituto Butantan, por ter cedido gentilmente à suspensão de bactéria Bordetella pertussis utilizada nos testes “in vitro”.

Às mães que cederam gentilmente suas amostras para que fosse possível a realização deste trabalho.

Aos membros da Banca examinadora do Exame de Qualificação: Dra. Heloísa Helena de Souza Marques, Dra. Ana Paula Moschione Castro e Dra. Maria Esther Jurfest Rivero Ceccon, que aceitaram gentilmente meu convite e contribuíram de forma muito construtiva com sugestões para o melhor desenvolvimento do nosso trabalho.

À Monica Souza, secretária da Pós-Graduação do Departamento de Pediatria, por estar sempre prontamente disposta para me auxiliar no que fosse preciso.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à FAPEMAT (Fundação de Amparo a Pesquisa de Mato Grosso) pelo apoio financeiro.

E, finalmente, agradeço ao meu cunhado Guilherme, minha vizinha, meus queridos primos e minhas amigas do coração, por todo carinho. Mesmo que alguns deles não estejam a par do andamento deste trabalho, me ajudaram de forma indireta em cada momento de descontração e alegria, necessários para seguir esta jornada.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACIP	<i>Advisory Committee on Immunization Practices</i>
ACT	Toxina adenilato ciclase (<i>Adenylate cyclase toxin</i>)
ADP	Adenosina bifostato
APC	Célula apresentadora de antígeno (<i>Antigen presenting cell</i>)
APC	Alofococianina
ATP	Adenosina trifosfato
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>)
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD	Grupamento de diferenciação (<i>Cluster of Differentiation</i>)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DLC	Divisão de Laboratório Central
DNT	Toxina dermonecrótica (<i>Dermonecrotic toxin</i>)
DO	Densidade ótica
dT	Dupla tipo adulto (difteria e tétano)
dTpa	Difteria, tétano e pertussis acelular em menor concentração
DTPa	Difteria, tétano e pertussis acelular
DTPw	Difteria, tétano e pertussis celular
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
et al.	E outros
FcRn	Receptor Fc neonatal (<i>Neonatal Fc receptor</i>)

FHA	Hemaglutinina filamentosa (Filamentous hemagglutinin)
FIM	Fimbrias
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	<i>Forward scatter</i>
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HBV	Vírus da hepatite B (<i>Hepatitis B virus</i>)
Hib	<i>Haemophilus Influenzae B</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human immunodeficiency virus</i>)
IFN-γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina de classe A
IgG	Imunoglobulina de classe G
IL	Interleucina
IPV	Vacina contra poliomielite (<i>Inactivated poliovirus vaccine</i>)
kDa	<i>Kilodalton</i>
LOS	Lipooligossacarídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MFI	Mediana de Intensidade de Fluorescência (<i>Median fluorescence intensity</i>)
mg	Miligrama
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
ml	Mililitro
MT	Mato Grosso

N	Normal (concentração)
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
NISBC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PE	Ficoeritrina
PECy5	Ficoeritrina-cianina 5
PECy7	Ficoeritrina-cianina 7
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Fitohemaglutinina
pIgR	Receptor polimérico de imunoglobulina
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PRN	Pertactina
PT	Toxina pertussis (<i>Pertussis toxin</i>)
RN	Recém-nascido
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SIgA	Imunoglobulina A secretória
Sinan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SSC	<i>Side scatter</i>
TCT	Citotoxina traqueal (<i>Tracheal cytotoxin</i>)
Th	<i>T helper</i>

TLR	<i>Toll-Like receptor</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-alfa (<i>Tumor necrosis fator-alfa</i>)
TORCHS	Toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, herpes simples e sífilis.
UA	Unidade arbitrária
UE	Unidade de ELISA
UI	Unidade internacional
V450	Violeta 450
V500	Violeta 500
WHO	<i>World Health Organization</i>
μl	Microlitro
%	Porcentagem
>	Maior

LISTA DE FIGURAS

Figura - 1	Distribuição dos casos de coqueluche segundo idade (meses e anos) e esquema de vacinação no Brasil	8
Figura - 2	Mecanismos de imunidade induzidos pelos diferentes tipos de vacinas para coqueluche	14
Figura - 3	Idade gestacional de vacinação das parturientes com a vacina dTpa (semanas)	37
Figura - 4	Intervalo de tempo entre a vacinação com a vacina dTpa e o parto (dias)	38
Figura - 5	Concentrações de anticorpos IgG anti- <i>B. pertussis</i> , anti-PT, anti-FHA e anti-PRN em amostras de soro materno e soro de seus respectivos recém-nascidos dos grupos caso (gestantes vacinadas) e controle (gestantes não vacinadas)	40
Figura - 6	Correlação entre as amostras de soro materno (M) e soro de seus respectivos recém-nascidos (RN) quanto às concentrações de IgG anti- <i>B. pertussis</i> , anti-PT, anti-FHA e anti-PRN do grupo caso e do grupo controle	41
Figura - 7	Taxa de passagem transplacentária de anticorpos IgG anti- <i>B. pertussis</i> , anti-PT, anti-FHA e anti-PRN dos grupos caso (gestantes vacinadas) e controle (gestantes não vacinadas)	43
Figura - 8	Taxa de passagem de anticorpos IgG anti- <i>B. pertussis</i> , anti-PT, anti-FHA e anti-PRN de acordo com a idade gestacional de vacinação (semanas) das gestantes do grupo caso	45
Figura - 9	Correlação entre as taxas de passagem de anticorpos IgG anti- <i>B. pertussis</i> , anti-PT, anti-FHA e anti-PRN e o tempo da vacinação com a vacina dTpa até o parto (dias) das gestantes do grupo caso	46
Figura - 10	Concentrações de anticorpos IgA anti- <i>B. pertussis</i> em amostras de colostro materno dos grupos caso (gestantes vacinadas) e controle (gestantes não vacinadas)	48
Figura - 11	Horas de realização da coleta de colostro dos grupos caso (gestantes vacinadas) e controle (gestantes não vacinadas) contadas a partir do momento do parto	49

Figura - 12	Concentrações de anticorpos IgA anti-PT em amostras de colostro materno dos grupos caso (gestantes vacinadas) e controle (gestantes não vacinadas)	50
Figura - 13	<i>Dot plot</i> representativo do <i>gate</i> de linfócitos com base no tamanho (<i>forward scatter</i> , FSC) e granulosidade celular (<i>side scatter</i> , SSC)	51
Figura - 14	<i>Dot plots</i> representativos dos <i>gates</i> das populações de linfócitos T CD4 (CD3+CD4+) e de linfócitos T CD8 (CD3+CD4-) e de linfócitos B CD19+CD3-	51
Figura - 15	<i>Dot plots</i> representativos das análises da expressão, em porcentagem, dos marcadores CD40L e IFN- γ dentro dos <i>gates</i> das populações de linfócitos TCD4 de células não estimuladas e estimuladas com <i>B. pertussis</i>	52
Figura - 16	Análise da porcentagem de células T CD4+, células T CD8+ e células CD19+ dentro da população de linfócitos nas amostras de sangue de cordão dos RN do grupo caso (gestantes vacinadas), do grupo controle (gestantes não vacinadas) e do sangue periférico de adultos	54
Figura - 17	Análise da porcentagem de células T CD4+ CD40L+, células T CD4+ CD69+, células T CD8+ CD40L+ e células CD19+ CD40+ dentro da população de linfócitos nas amostras de sangue de cordão dos RN do grupo caso (gestantes vacinadas), do grupo controle (gestantes não vacinadas) e do sangue periférico de adultos	56
Figura - 18	Porcentagens de proliferação quantificadas por meio da ligação dos anticorpos anti-Ki67 nas células T CD4+ e T CD8+ dentro da população de linfócitos nas amostras de sangue de cordão dos RN do grupo caso (gestantes vacinadas), do grupo controle (gestantes não vacinadas) e do sangue periférico de adultos, antes e depois do estímulo com PHA e com <i>B. pertussis</i> (Bp)	58
Figura - 19	Análise das porcentagens e do MFI de células T CD4+IFN- γ +, e das porcentagens e do MFI de células T CD8+IFN- γ +, dentro da população de linfócitos nas amostras de sangue de cordão dos RN do grupo caso (gestantes vacinadas), do grupo controle (gestantes não vacinadas) e do sangue periférico de adultos.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela - 1	Marcadores de superfície e intracelulares de linfócitos T e/ou B	31
Tabela - 2	Características das parturientes e de seus RN, de acordo com seu estado em relação à vacinação com dTpa	36
Tabela - 3	Análise estatística descritiva das concentrações de IgG sérica total nas amostras de soro materno e de soro de cordão umbilical dos RN e taxas de transferência de IgG (%) dos grupos caso e controle ...	39
Tabela - 4	Medianas das concentrações de anticorpos IgG anti- <i>B. pertussis</i> , anti-PT, anti-FHA e anti-PRN nas amostras de soro materno e de soro de cordão umbilical dos RN dos grupos caso e controle e diferenças das concentrações entre os grupos caso e controle	42
Tabela - 5	Análise estatística descritiva das concentrações de IgA total nas amostras de colostro materno dos grupos caso e controle	47
Tabela - 6	Concentrações de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A nos sobrenadantes de cultura de leucócitos do sangue dos RN do grupo caso (gestantes vacinadas), do grupo controle (gestantes não vacinadas) e do sangue periférico de adultos	63

RESUMO

LIMA L. *Impacto da imunização materna com Bordetella pertussis na resposta celular e nos níveis de anticorpos IgG séricos e IgA secretores adquiridos passivamente pelo recém-nascido* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A imunização materna com a vacina acelular para pertussis (dTpa) é uma intervenção adicional que visa fornecer proteção aos recém-nascidos (RN). No entanto, tem sido relatado que altos níveis de anticorpos adquiridos por transferência placentária podem afetar adversamente a resposta imune desses RN após a imunização ativa, devido ao mascaramento antigênico. Neste estudo, avaliamos a aquisição passiva neonatal de anticorpos específicos para pertussis e sua influência na resposta imune celular dos neonatos. A casuística foi composta por gestantes vacinadas com a vacina dTpa (grupo caso, n=66) ou por gestantes que não receberam a vacina (grupo controle, n=101). As concentrações de anticorpos IgG séricos específicos para *Bordetella pertussis* total (Bp), toxina pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA) e pertactina (PRN) foram quantificadas em soro materno e de cordão umbilical de seu respectivo RN, e as concentrações de anticorpos IgA específicos para Bp e PT foram dosadas nas amostras de colostro por meio de ensaio imunoenzimático. A responsividade dos linfócitos do sangue neonatal foi avaliada após estimulação *ex vivo* com Bp inativada por citometria de fluxo com o intuito de detectar a proliferação, produção de citocinas e fenótipo de ativação dos linfócitos T em um contexto de altas concentrações de IgG específicas adquiridas após a vacinação materna. As concentrações de anticorpos IgG anti-Bp, PT, FHA e PRN foram maiores nas amostras de soro materno e de cordão umbilical do grupo caso quando comparadas ao grupo controle ($p<0,0001$), com índices de correlação positivos em ambos os grupos para todos os antígenos estudados ($p<0,0001$). As vacinações realizadas entre 26 e 31 semanas de gestação foram associadas com as melhores taxas de transferência placentária, embora índices significativamente menores foram detectados no grupo caso ($p<0,01$). As concentrações de anticorpos IgA anti-Bp e anti-PT no colostro não foram afetadas pelo estado vacinal da parturiente.

Os ensaios de cultura celular revelaram que os RN responderam ao estímulo com Bp, com maior expressão de CD40L, CD69 e proliferação de células T CD4, em comparação com células não estimuladas. Também foi observada uma menor resposta Th1, enquanto a resposta Th2 foi preservada, em comparação com os adultos, mas sem diferenças entre os grupos de neonatos em nenhum dos parâmetros estudados. Nossos resultados indicam que níveis mais altos de anticorpos IgG específicos para *B. pertussis* no soro dos RN após a vacinação materna não afetam a resposta imune neonatal mediada por células.

Descritores: *Bordetella pertussis*; vacinas contra difteria, tétano e coqueluche acelular; gestantes; imunidade materno-adquirida; imunoglobulina G; imunoglobulina A secretora; imunização passiva; recém-nascido; linfócitos T.

SUMMARY

LIMA L. *Impact of maternal immunization with Bordetella pertussis in cellular response and in serum IgG and secretory IgA antibody levels acquired passively by the newborn* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Maternal immunization with pertussis acellular vaccine (Tdap) is an additional intervention that provides protection to newborns. However, it has been reported that high antibody levels acquired via placental transfer may adversely affect the immune response of newborns after active immunization due to epitope masking. In this study, we evaluated neonatal passive acquisition of pertussis-specific antibodies and their influence on the neonatal cell-mediated immune response. The sample consisted of pregnant women vaccinated with the Tdap vaccine (case group, n=66) or pregnant women who received no vaccine (control group n=101). Whole-cell *Bordetella pertussis* (Bp), pertussis toxin (PT), filamentous hemagglutinin (FHA) and pertactin (PRN)-specific serum IgG concentrations were quantified in paired maternal-cord sera, and Bp- and PT-specific IgA concentrations were evaluated in colostrum samples by immunoenzymatic assay. Ex vivo neonatal blood lymphocyte responsiveness after inactivated Bp stimulation was assessed using flow cytometry to detect the proliferation, cytokine production and activation phenotype of T lymphocytes in the context of high specific IgG concentrations acquired after maternal vaccination. Anti-Bp, PT, FHA and PRN IgG antibody concentrations in maternal and cord serum samples from case group were higher than those in control group ($p<0.0001$), with positive correlation indexes in both groups for all pertussis antigens ($p<0.0001$). Vaccinations performed between 26 and 31 gestation weeks were associated with the best placental transfer ratios, although significantly lower ratios were detected in case group ($p<0.01$). Anti-Bp and anti-PT IgA concentrations in colostrum were not affected by vaccine status. Cell culture assays revealed that newborns responded to Bp stimulation with higher expression of CD40L CD69 and CD4⁺ T cell proliferation compared to unstimulated cells. It was also observed a lower Th1 response, while a

preserved Th2 response compared to adults, but there were no differences between neonatal groups for any of the studied parameters. Our results indicate that higher pertussis-specific IgG levels in newborn sera after maternal vaccination do not affect the neonatal cell-mediated immune response.

Descriptors: *Bordetella pertussis*; diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccines; pregnant women; immunity, maternally-acquired; immunoglobulin G; immunoglobulin A, secretory; immunization, passive; infant, newborn; T-lymphocytes.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivos específicos	20
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	Ética	22
3.2	Casuística	22
3.3	Obtenção e processamento das amostras de sangue materno, sangue de cordão umbilical e colostro	23
3.4	Linhagem Bacteriana	26
3.5	Estudo das concentrações de anticorpos das classes IgG e IgA	26
3.5.1.	Detecção de IgG total nas amostras de soro	26
3.5.2.	Detecção de IgA total nas amostras de colostro	26
3.5.3.	Dosagem de IgG e IgA anti- <i>B. pertussis</i> nas amostras de soro e colostro	28

3.6.	Estudo da ativação dos linfócitos T e B de sangue total de cordão umbilical	29
3.6.1.	Cultura de linfócitos T e B do sangue total	29
3.6.2.	Imunofenotipagem dos linfócitos T e B em cultura	30
3.6.3.	Dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura	32
3.7.	Análise Estatística	33
4.	RESULTADOS	35
4.1	Análise do Grupo Amostral	35
4.2	Anticorpos IgG totais e taxa de passagem transplacentária	38
4.3	Anticorpos IgG específicos (anti- <i>B. pertussis</i> , anti-PT, anti-FHA e anti-PRN) e taxas de passagem transplacentária	39
4.4	Avaliação do momento de vacinação com a vacina dTpa	44
4.5	Anticorpos IgA totais	46
4.6	Anticorpos IgA específicos (anti- <i>B. pertussis</i> e anti-PT)	47
4.7.	Estudo da ativação dos linfócitos T CD4, T CD8 e B	50
5.	DISCUSSÃO	65
6.	CONCLUSÕES	86
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Características individuais e descrição dos resultados de anticorpos das mães e recém-nascidos do Grupo Caso

APÊNDICE 2 – Características individuais e descrição dos

resultados de anticorpos das mães e recém-nascidos do Grupo Controle

ANEXOS

ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

ANEXO 2 – Aprovação do Comitê Universidade de Cuiabá (UNIC)

ANEXO 3 – Carta de ciência do Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Primeiramente isolada em 1906, por Jules Bordet e Octave Gengou, a bactéria *Bordetella pertussis* consiste em um cocobacilo Gram-negativo, pleomórfico, aeróbio e encapsulado (Nieves e Heiningen, 2015). É um patógeno que infecta exclusivamente humanos, causando uma doença respiratória aguda altamente contagiosa denominada coqueluche, popularmente conhecida como tosse comprida (Mattoo e Cherry, 2005).

Dentre as nove espécies de *Bordetella* identificadas, além da *B. pertussis*, outras quatro espécies estão relacionadas com infecções respiratórias em humanos ou animais mamíferos, são elas: i. *B. parapertussis*; ii. *B. bronchiseptica*; iii. *B. holmesii*; e iv. *B. petrii* (Zlamy, 2016). Infecções respiratórias graves causadas por *B. bronchiseptica* foram observadas em pessoas imunodeficientes, como portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (Mattoo e Cherry, 2005). Para *B. parapertussis* já foram identificados dois hospedeiros, os seres humanos (*B. parapertussis_{hu}*) e as ovelhas (*B. parapertussis_{sh}*). *B. holmesii* pode causar uma doença com presença de tosse semelhante à gerada pela *B. pertussis* ou infecções invasivas, como por exemplo, sepse, pneumonia e meningite. *B. petrii* foi isolada de paciente com fibrose cística e é responsável por causar uma infecção de longa duração (Cherry, 2012; Zlamy, 2016).

Os fatores de virulência da *B. pertussis* consistem, principalmente, em duas classes de proteínas, as toxinas e adesinas (Melvin *et al.*, 2014). A presença do lipooligossacarídeo (LOS), um componente da parede celular bacteriana altamente imunoestimulador, e das proteínas metabólicas também

contribuem para o aumento da capacidade infecciosa da bactéria (Kilgore, 2016).

Entre as toxinas encontram-se a toxina pertussis (PT), toxina adenilato ciclase (ACT), citotoxina traqueal (TCT) e toxina dermonecrótica (DNT). A PT é o fator de virulência mais complexo e discutido, composto por 5 subunidades diferentes (S1, S2, S3, S4 e S5) organizadas em uma estrutura A-B. A subunidade A, conhecida como A-promotor, é uma adenosina bifosfato (ADP) - ribosiltransferase que corresponde a S1 e representa a parte enzimaticamente ativa da toxina. A subunidade B, chamada de oligômero B, é responsável pela ligação da toxina à célula alvo e consiste em um anel pentamérico que corresponde a S2, S3, S5 e duas subunidades de S4. A ligação destas moléculas em proteínas das vias de sinalização intracelular causa a interrupção da ativação dessas vias, acarretando uma ampla gama de efeitos nas células. As consequências geradas pela ação da PT podem ser observadas em praticamente todos os tecidos afetando, entre outras células, células β pancreáticas, adipócitos, macrófagos e linfócitos. A linfocitose, utilizada como um marcador sistêmico da coqueluche em crianças é induzida pela toxina PT e está relacionada com o desenvolvimento da hipertensão pulmonar, uma importante causa de morbidade e mortalidade gerada pela doença (Fedele *et al.*, 2013; Hewlett *et al.*, 2014).

Enquanto o papel da DNT na patogênese da coqueluche ainda não é claro, a TCT está relacionada com maior estímulo de produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico, levando à geração de danos celulares. Já a ACT, por meio da conversão da adenosina trifosfato (ATP) em adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC), contribui inibindo a fagocitose, bloqueando a

produção de óxido nítrico por macrófagos, suprimindo a migração e ativação de linfócitos T e o efeito citotóxico de neutrófilos e monócitos (Matto e Cherry, 2005; Kilgore, 2016).

Entre as adesinas estão a hemaglutinina filamentosa (FHA), uma grande proteína em forma de haste que compõe a parede celular bacteriana, inicialmente sintetizada com aproximadamente 370 kDa e, após ser submetida a um processamento de maturação, dá origem a uma proteína de 220 kDa; fímbrias (FIM), também conhecidas como pili ou aglutinógenos, são estruturas filamentosas da superfície celular compostas por duas subunidades principais: Fim2 e Fim3, dependendo do sorotipo da *B. pertussis*; e pertactina (PRN), uma proteína expressa na membrana externa bacteriana, com peso molecular entre 68 e 70 kDa. Todas estão envolvidas na aderência bacteriana às células e estruturas extracelulares no epitélio respiratório e possuem atividade imunomodulatória, provocam a supressão da resposta imune inicial, contribuindo para a persistência da infecção (Fedele *et al.*, 2013; Hewlett *et al.*, 2014; Melvin *et al.*, 2014).

A transmissão da coqueluche se dá por gotículas respiratórias expelidas por indivíduos infectados (Warfel *et al.*, 2012). Ao ser inalada a bactéria *B. pertussis* adentra o trato respiratório superior e adere, por meio das adesinas, ao epitélio da nasofaringe e traqueia (WHO, 2010). Após o período de incubação que dura, normalmente, de 7 a 10 dias, tem início o primeiro estágio da infecção, a fase catarral, que dura de 1 a 2 semanas. Semelhante ao resfriado comum, as manifestações presentes neste período são coriza, febre de baixo grau e tosse ocasional. No segundo estágio é observado o sintoma mais clássico da coqueluche, a tosse paroxística e, dentro de uma a duas

semanas, o paciente pode chegar a ter 15 acessos de tosse em um período de 24 horas. Esta frequência é mantida por duas semanas e em seguida, vai diminuindo até a fase de convalescência (Peake e McGuire, 2014).

Raramente a bactéria dissemina-se a partir do trato respiratório, no entanto, existe a presença de sintomas sistêmicos como a linfocitose, vômitos após episódios de tosse que levam a desidratação e desnutrição, desregulação na liberação de insulina e alterações nas funções neurológicas (confusão, síncope, convulsões e perda de consciência) (Hewlett *et al.*, 2014).

Indivíduos afetados podem apresentar grande número de complicações secundárias, porém as mais comuns são as respiratórias, como a pneumonia e a otite média, ativação de tuberculose latente, atelectasia, bronquiectasia, enfisema e pneumotórax (Ministério da Saúde, 2014). Alguns fatores como idade e capacidade de resposta imunológica podem influenciar a ocorrência ou não dessas complicações, bem como, o nível de severidade das mesmas (Kilgore, 2016).

A primeira vacina para coqueluche utilizada foi a vacina de célula total, constituída pelos toxoides diftérico e tetânico e pela suspensão de células inteiras mortas de *B. pertussis* (DTPw) (Lambert, 2014; Klein, 2014). Introduzida no ano de 1940, o seu uso disseminado levou à uma diminuição de mais de 95% na incidência da doença, com redução da morbidade e mortalidade. No entanto, altas taxas de efeitos adversos estão ligadas ao uso da vacina de célula total, principalmente, em decorrência da presença do componente LOS, que leva a ativação de células da imunidade inata por meio da ligação ao receptor *Toll-like* (TLR) 4 (Allen e Mills, 2014). Associado a isso, a identificação e caracterização dos fatores de virulência da *B. pertussis*,

levaram à substituição desta vacina, em alguns países, pela vacina acelular, composta pela toxina PT e as adesinas FHA, PRN e FIM tipo 1 e 2 (DTPa), que constituem os antígenos da bactéria que induzem à produção de níveis mais elevados de anticorpos (Halperin *et al.*, 2011; Guiso, 2014).

O primeiro país a substituir a DTPw foi o Japão, que passou a utilizar a DTPa na década de 1980 e, em seguida, o mesmo foi feito por países do continente europeu e Estados Unidos (Lambert, 2014). Porém, devido aos maiores custos desta vacina, um grande número de países em desenvolvimento, como o Brasil, ainda utilizam a vacina DTPw (Feunou *et al.*, 2010).

Atualmente, no Calendário Nacional de Vacinação do Programa Nacional de Imunizações (PNI), as vacinas combinadas que contêm o componente pertussis (inativado) são a vacina Pentavalente (difteria, tétano, pertussis celular, *Haemophilus influenzae* tipo b e hepatite B - recombinante) aplicada aos dois, quatro e seis meses de idade e a vacina DTPw aplicada aos 15 meses e aos quatro anos de idade. Essas vacinas são contraindicadas para indivíduos a partir de sete anos de idade. Em substituição, é ofertada a dupla tipo adulto (dT- difteria e tétano) que não apresenta o componente pertussis (Ministério da Saúde, 2014).

Contrariando a cobertura vacinal oferecida, que segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) chegou a 86% em 2016 (considerando, no mínimo, as três primeiras doses da vacina DTPw), os casos de coqueluche vêm aumentando consideravelmente ao longo dos anos e, dessa forma, essa doença continua a ser uma preocupação de saúde pública e uma importante causa de mortalidade infantil (Gabutti *et al.*, 2015). Nos anos de 2012 a 2014 a

coqueluche foi a doença passível de prevenção por vacina mais notificada na região das Américas e, em 2015, o número de casos reduziu de quatro a sete vezes em relação aos anos anteriores (WHO, 2016). Essa redução pode estar relacionada com uma característica apresentada pela coqueluche conhecida como ciclicidade, que consiste em surtos epidêmicos da doença a cada dois a cinco anos (Ministério da Saúde, 2015). Relatos do aumento no número de casos de coqueluche, intercalados por épocas de menor incidência, são encontrados em muitos países. Sizaire e colaboradores (2014) descrevem quatro períodos de epidemia de coqueluche na Espanha, com taxas de incidência crescentes, sendo a última relatada em 2012, com 7,5 casos/100,000 habitantes. Nos Estados Unidos, em 2010, mais de 27 mil casos de coqueluche foram reportados (Shapiro, 2012). No estado da Califórnia, devido a uma epidemia em 2005, o número de notificações foi superior a 9 mil (Winter *et al.*, 2012). O Japão e Reino Unido, entre outros, também integram o grupo de países que passaram por quadros recentes de epidemias de coqueluche (Miyaji *et al.*, 2013; Boulton, 2013). No Brasil, um grande aumento no número de pessoas que contraíram coqueluche foi observado a partir de 2010 e, até o ano de 2014, dos 72.901 casos notificados, 22.426 foram confirmados (Ministério da Saúde, 2015).

A coqueluche é uma doença de notificação compulsória e qualquer caso suspeito deve ser comunicado através do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan). Um caso suspeito consiste em um indivíduo que apresente, obrigatoriamente, tosse seca há, no mínimo, 14 dias associada a mais um sintoma característico da infecção por *B. pertussis* (tosse paroxística, guincho inspiratório ou vômitos após episódio de tosse) ou que tenha tido

contato com um caso confirmado. A confirmação de um caso de coqueluche pode ser realizada baseando-se em três diferentes critérios: laboratorial, caso suspeito com isolamento da bactéria por meio de cultura; clínico-epidemiológico, quando um caso suspeito teve contato com um caso confirmado por meio de diagnóstico laboratorial durante o período de maior transmissibilidade da doença (período catarral até 3 semanas após o início do período paroxístico); clínico, caso suspeito que apresente hemograma com quadro de leucocitose (>20 mil leucócitos/mm³) e linfocitose (>10 mil linfócitos/mm³), resultado de cultura negativa ou não realizada, que não tenha tido contato com indivíduo infectado e que o diagnóstico de outras doenças tenha sido excluído após realização dos testes adequados (Ministério da Saúde, 2009).

O ressurgimento da doença, nos últimos anos, é atribuído a fatores como maior conscientização sobre a enfermidade, alterações genéticas da bactéria que tornam a vacina menos eficaz, maior número de diagnósticos devido à disponibilidade de testes laboratoriais mais eficazes, redução do *booster* natural devido a menor circulação da bactéria e o curto período de proteção (5 a 8 anos) após a infecção natural ou vacinação (Cherry, 2012; Chiappini *et al.*, 2013; Fedele *et al.*, 2013). A redução na efetividade da vacina nos anos seguintes a vacinação é o fator mais discutido atualmente. Visto que a última dose de reforço é aplicada aos quatro anos, é crescente o número de crianças em idade escolar, adolescentes e adultos que contraem a doença e se tornam a fonte de transmissão mais frequente para recém-nascidos (RN) e lactentes que ainda não iniciaram ou não completaram o esquema vacinal (WHO, 2010; Chiappini *et al.*, 2013) (**Figura 1**).

Figura 1. Distribuição dos casos de coqueluche segundo a idade (meses e anos) e esquema de vacinação no Brasil (Fonte: Ministério da Saúde, 2016).

Hendrikx e colaboradores (2011) relatam que na Holanda, até o ano de 2011, eram administradas apenas 4 doses da vacina DTPw (2, 3, 4 e 11 meses de idade) e, a partir deste ano, após surtos de coqueluche em crianças entre 4 e 5 anos de idade, foi introduzida uma dose da vacina para crianças com 4 anos. No entanto, com tal mudança, foi observado que picos da doença passaram a ocorrer em crianças com faixa etária de 9 a 10 anos. Segundo dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) e *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), alguns países, como Estados Unidos, Canadá, França, Alemanha, Itália, Áustria, Finlândia e Suécia, adotaram a prática de vacinação de adolescentes e adultos, visando à diminuição dessa fonte de contágio de coqueluche para os neonatos.

A imaturidade do sistema imune apresentada pelo RN, particularmente a falta de memória imunológica (Healy e Baker, 2007), somada a um esquema de vacinação ausente ou incompleto, torna os neonatos o grupo mais propenso a apresentar formas graves da doença, muitas vezes levando ao óbito

(Vatansever *et al.*, 2005; Healy, 2012). No Brasil, no período de 2010 a 2014, dos casos confirmados de coqueluche em crianças menores de 1 ano de idade, 87,5% ocorreram naquelas menores de 6 meses. E em relação aos óbitos neste mesmo período, 98,7 % do total, incluindo todas as faixas etárias, ocorreu em crianças menores de 1 ano de idade, e destas, 97,2% ocorreu em lactentes menores de 2 meses (Ministério da Saúde, 2015).

A antecipação da primeira dose da vacinação com *B. pertussis* com o objetivo de oferecer ao RN proteção logo após o nascimento é discutida por alguns autores. Wood e colaboradores (2010) realizaram um estudo em que os RN foram vacinados com duas doses (aos 5 dias e com 1 mês de vida - Grupo 1) ou apenas uma dose (aos 5 dias de vida - Grupo 2) de uma vacina monovalente de pertussis acelular. A partir dos dois meses de idade, todos os grupos, incluindo os controles, receberam as doses de vacina DTaP-HBV-IPV/Hib (difteria, tétano, pertussis acelular, hepatite B, poliomelite e *Haemophilus influenzae* tipo b) incluídas no calendário de vacinação (aos 2, 4, 6 meses). A vacina aplicada durante o período neonatal foi bem tolerada em todos os grupos, sem a ocorrência de reações adversas graves. Quanto à imunogenicidade, a administração precoce da vacina mostrou-se capaz de antecipar o alcance de níveis protetores para 2 meses no Grupo 1, o que só foi atingido aos 6 meses no grupo controle, embora esses níveis ainda não tenham sido estabelecidos apropriadamente para a pertussis. Porém, apesar de maiores níveis de anticorpos protetores serem adquiridos aos 2 meses de vida, o RN ainda fica desprotegido durante as primeiras semanas de vida, que seria o período de maior incidência da doença.

Nesse caso, a vacinação materna é a opção recomendada pela *Advisory Committee on Immunization Practices* (ACIP), desde 2011, como método preferencial de prevenção da morbimortalidade de neonatos por consequência de coqueluche (Ercan *et al.*, 2013). As concentrações da imunoglobulina de classe G (IgG) adquiridas pelo RN por passagem transplacentária são dependentes do nível materno que, por sua vez, é produzido por exposição prévia à uma infecção natural ou aos antígenos vacinais. Isso torna a imunização materna uma estratégia potencialmente benéfica, capaz de conferir proteção ao RN no período de maior vulnerabilidade, ou seja, logo após o nascimento (Healy e Baker, 2007; Healy, 2012).

No Brasil, em novembro de 2014, a vacina dTpa (difteria, tétano e pertussis acelular em menores concentrações comparada a DTPa) foi introduzida no Calendário Nacional de Vacinação da gestante como reforço ou complementação do esquema da vacina dT. As gestantes podem ser vacinadas a partir da 27ª semana de gestação até a 36ª semana de gestação, sendo o prazo máximo para administração de até 20 dias antes da data provável do parto. Dessa forma, o nível materno de anticorpos IgG específicos para *B. pertussis* estará em seu pico no momento em que o transporte transplacentário é mais eficiente devido a maior expressão dos receptores Fc neonatais (FcRn) no sincíotrofoblasto, responsável pelo transporte de IgG para o feto (Palmeira *et al.*, 2012; Ministério da Saúde, 2014).

A passagem transplacentária de anticorpos é um processo que pode ser influenciado pela idade gestacional no momento em que a mãe é imunizada, nível de imunoglobulina da classe IgG patógeno-específica e a coexistência de

infecções maternas que aumentem ou diminuam o transporte de anticorpos ou afetem a integridade da placenta (Ercan *et al.*, 2013).

A placenta atua como barreira seletiva entre a mãe e seu filho, permitindo a passagem ativa ou passiva de uma vasta gama de substâncias, entre elas, os anticorpos IgG. As demais classes de anticorpos não são transferidas em quantidades significativas. A taxa de transmissão de anticorpos IgG varia também de acordo com a subclasse a que pertencem. IgG1 e IgG3 atravessam a placenta de modo um pouco mais eficiente que IgG4, que, por sua vez, transpõe a interface materno-fetal de maneira mais eficiente que IgG2 (Palmeira *et al.*, 2012).

Primeiramente, os anticorpos IgG presentes no sangue materno são internalizados no sincíotrofoblasto em endossomos. A acidificação do meio permite a ligação das moléculas de IgG aos receptores FcRn expressos na superfície interna dos endossomos. Protegidas da ação de enzimas lisossomais, as moléculas de IgG acopladas aos receptores são, então, transportadas até a lâmina basal trofoblástica e o pH fisiológico promove a dissociação da IgG do FcRn. Uma vez na matriz extracelular, as moléculas de IgG ganham acesso ao endotélio fetal e, assim, à circulação fetal (Simister, 2003; Palmeira *et al.*, 2012).

A proteção do RN também pode ser complementada pela prática do aleitamento materno. A imunoglobulina A secretória (SIgA), principal imunoglobulina encontrada no colostro e leite maternos, é transferida para o bebê durante a amamentação e confere proteção por meio da ligação a microrganismos patogênicos, inibindo a colonização e invasão das membranas mucosas da criança. Através deste mecanismo, a IgA forma a primeira barreira

protetora do epitélio contra patógenos e toxinas (Hanson e Silfverdal, 2009; Maertens *et al.*, 2014). A IgA pode também facilitar a exposição de antígenos na mucosa intestinal do RN por dois diferentes mecanismos: atravessando as células M, com uso de um receptor ainda desconhecido, ou por transcitose através da ligação ao receptor polimérico de imunoglobulina (pIgR). Esses antígenos são entregues às células dendríticas, por meio da interação da IgA com o receptor Fc α RI (CD89), o que leva a uma resposta imunológica para microrganismos patogênicos ou a tolerância imune para microrganismos comensais (Faucette *et al.*, 2015).

Raya e colaboradores (2014a) avaliaram a passagem de anticorpos pelo leite materno em mulheres vacinadas com dTpa durante a gestação e, como resultado, detectaram a presença de anticorpos IgA anti-FHA e anti-PT que permanecem por até 8 semanas após o parto, no entanto, houve um decaimento nos níveis desses anticorpos ao longo desse tempo, com ênfase no expressivo declínio durante as duas primeiras semanas após o parto.

No entanto, não só a resposta humoral é importante para combater a infecção por *B. pertussis*. Trabalhos com modelos animais forneceram evidências convincentes de que a resposta celular também é necessária para uma imunidade eficaz (Mills, 2001; Carollo *et al.*, 2012). É relatado que mecanismos imunológicos envolvendo células T e B desempenham um papel relevante na proteção contra a coqueluche (Smits *et al.*, 2014), sendo responsáveis por conferir uma proteção mais duradoura quando comparados à resposta de anticorpos isolada (Schure *et al.*, 2012).

Sabe-se que o padrão de resposta imune se diferencia de acordo com estímulo, sendo que, a DTPw ou infecção natural promove um padrão de

resposta imune T *helper* (Th) 1, a qual é ativada principalmente pelo lipopolissacarídeo (LPS), induzindo a produção de interferon gama (IFN- γ) e ativando células B a produzirem anticorpos IgG1 e IgG3 opsonizantes, além de ativar macrófagos a induzir a morte intracelular bacteriana, por meio da produção de moléculas antimicrobianas e recrutamento e ativação de neutrófilos através de citocinas inflamatórias. Já a dTpa, promove um padrão de resposta imune Th1/Th2, com produção de várias citocinas, principalmente interleucina (IL) -4 e IL-5, que ativam células B a produzirem anticorpos neutralizantes e com capacidade inibitória sobre a aderência bacteriana (Higgs *et al.*, 2012; Mascart *et al.*, 2007) (**Figura 2**).

Figura 2. Mecanismos de imunidade induzidos pelos diferentes tipos de vacinas para coqueluche (Fonte: Higgs *et al.*, 2012).

A infecção ou imunização contra coqueluche, independente do tipo de vacina, induz ainda a diferenciação de células Th17 e consequente produção da citocina IL-17, a qual promove o recrutamento e ativação de neutrófilos, promovendo a fagocitose e destruição da bactéria *B. pertussis* (Ross *et al.*, 2013).

Respostas imunes celulares, em particular, os mecanismos efetores mediados por IFN-γ são necessários para prevenir a disseminação de *B. pertussis* no trato respiratório durante a infecção primária. Camundongos IFN-γ

knockout quando infectados com *B. pertussis*, desenvolvem um quadro que culmina com a translocação da bactéria e morte do animal (Mills, 2001). O IFN- γ secretado precocemente por células da imunidade inata suprime a infecção antes do desenvolvimento da resposta Th1. Contudo, células Th1 são eventualmente geradas e iniciam um papel essencial na eliminação bacteriana. Após uma infecção primária, a resposta imune adquirida é muito eficaz em lidar com uma exposição subsequente. Em síntese, a imunidade celular, juntamente com anticorpos opsonizantes, estimulados por células Th1, são os mecanismos efetores que eliminam uma infecção primária e conferem proteção contra a exposição secundária a *B. pertussis* (Mills, 2001).

Visto que a imunização com a vacina acelular gera um perfil de resposta Th2, a possível ausência da citocina IFN- γ poderia explicar o curto período de imunidade conferido por esse tipo de vacina. Frente a isso, alguns autores defendem a adição de agonistas de TLRs na composição das vacinas DTPa e dTpa. Um exemplo seriam os agonistas de TLR7, que após a ligação com o receptor, estimulam a produção de IL-12 pelas células da imunidade inata, promovendo assim, o direcionamento da resposta imunológica para um perfil Th1 (Misiak *et al.*, 2017). Quando animais imunizados com a vacina acelular comercial *Boostrix* e imunizados com a vacina acelular de mesma composição, porém com adição de agonistas de TLR7 são comparados, os animais do último grupo apresentam maiores concentrações de anticorpos específicos e maior poder de neutralização desses anticorpos frente ao desafio com a proteína PT (Misiak *et al.*, 2017). No entanto, ainda são necessários mais estudos e testes clínicos para avaliação dessa modificação em uma vacina instituída a anos e com relevante aceitação da população.

Outro ponto de intensa discussão atual consiste no fato de que, embora a vacinação materna seja amplamente utilizada e incentivada como método de proteção para os neonatos, é descrito na literatura que o alto nível de anticorpos adquiridos pelo RN por via transplacentária decorrente da imunização materna pode afetar negativamente a resposta imune desse lactente frente à imunização ativa (Mooi e Greeff, 2007). Isso ocorreria devido ao mascaramento de antígenos gerado pelos anticorpos maternos, impedindo a ligação do antígeno às células T e B do lactente no momento em que ele recebe a primeira dose da vacina, aos 2 meses de idade (Siegrist, 2003; Mooi e Greeff, 2007). Em contraste, Munoz e colaboradores (2014) em um estudo com imunização de 33 gestantes com a vacina dTpa concluíram que a vacinação resultou em maiores concentrações de anticorpos específicos para *B. pertussis* nos lactentes aos 2 meses de idade, nascidos de gestantes imunizadas. Ainda verificaram que não houve interferência na subsequente imunização destas crianças com a vacina para coqueluche após a terceira dose aos 6 meses de vida, com exceção dos anticorpos anti-FHA que foram mais baixos nos filhos de mães vacinadas. No entanto, após a quarta dose da vacina, aplicada aos 15 meses, esta redução dos níveis de anticorpos anti-FHA deixou de ser estatisticamente significativa.

Justificativa

A imunização de lactentes contra *B. pertussis* é realizada há décadas e mudou de forma significativa o quadro mundial da doença. No entanto, dados epidemiológicos indicam um aumento na incidência de casos de coqueluche ou, até mesmo, epidemias durante os últimos anos em diversos países

desenvolvidos e em desenvolvimento (Shapiro, 2012; Winter *et al.*, 2012; Miyaji *et al.*, 2013; Boulton, 2013; Sizaire *et al.*, 2014; Ministério da Saúde, 2015). Frente a isso, a imunização de gestantes visando diminuir a incidência e mortalidade dos RN, o grupo afetado de forma mais severa, conferindo proteção até o momento em que ele próprio possa ser imunizado é uma estratégia já utilizada em alguns países. No Brasil, a vacina acelular contra *B. pertussis* foi introduzida no calendário de imunização da gestante em novembro de 2014, portanto, foi um momento oportuno para a realização de trabalhos de pesquisa que visassem à coleta de dados a respeito da passagem de anticorpos por via transplacentária ou aleitamento materno após imunização de gestantes da população brasileira.

Uma vez que está descrito uma menor resposta de anticorpos anti-pertussis após a primeira dose da vacina em lactentes filhos de mães vacinadas (Maertens *et al.*, 2016) e diante das evidências convincentes de que ambas as respostas, humoral e celular, são necessárias para uma imunidade efetiva contra a bactéria (Mills, 2001), seria relevante não só analisarmos a resposta de anticorpos na gestante e a transmissão desses anticorpos para os RN, mas também estudarmos a ativação dos linfócitos T e B frente ao estímulo com *B. pertussis* em um contexto de alto nível de anticorpos séricos que estariam presentes nas amostras destes RN das mães vacinadas.

Somado a isto, o trabalho em questão dará continuidade a um trabalho de Mestrado realizado por nosso grupo (Quinello *et al.*, 2010), no qual observou-se a transferência de anticorpos reativos com *B. pertussis* para o neonato via placenta e aleitamento materno em um grupo de mães não vacinadas e, através da utilização de camundongos desafiados por via

intracerebral com *B. pertussis* viável, confirmou-se a eficácia desses anticorpos na neutralização da patogênese bacteriana.

Hipótese

A hipótese do presente projeto é que a vacinação com dTpa na gestante induza níveis mais elevados de anticorpos IgG séricos e IgA secretores maternos dirigidos a *B. pertussis* e seus fatores de virulência, bem como níveis séricos de anticorpos IgG específicos mais elevados em seus recém-nascidos quando comparados aos das mães não imunizadas. Em virtude do mascaramento antigênico, acredita-se também que a ativação dos linfócitos de recém-nascidos de mães vacinadas possa ser influenciada pelo alto título de anticorpos específicos maternos presentes no sangue de cordão umbilical.

OBJETIVOS

2. OBJETIVO

Estudar a transmissão materno-infantil de anticorpos séricos e secretores dirigidos a *Bordetella pertussis* e a resposta celular dos recém-nascidos de gestantes imunizadas ou não com a vacina dTpa durante a gestação.

2.1. Objetivos específicos

1. Avaliar a passagem transplacentária de anticorpos IgG séricos dirigidos a *Bordetella pertussis* ou aos seus antígenos purificados em parturientes imunizadas ou não com a vacina dTpa durante a gestação;
2. Avaliar a presença de anticorpos IgA secretores no leite materno dirigidos a *Bordetella pertussis* em parturientes imunizadas ou não com a vacina dTpa durante a gestação;
3. Avaliar a ativação *ex vivo* de linfócitos T e B do sangue de recém-nascidos de gestantes imunizadas ou não com a vacina dTpa após estímulo com *Bordetella pertussis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Ética

O presente projeto obteve prévia aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Cuiabá (Parecer nº: 1.005.350 em 26/03/15) e anuência da Coordenadoria de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Projeto nº 134/15 em 20/05/15). Além disso, após a apresentação minuciosa do trabalho, todas as parturientes doadoras assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido em que confirmavam estar inteiramente de acordo em participar deste estudo.

3.2. Casuística

O grupo caso foi composto por 66 amostras de sangue materno e de colostro de mulheres clinicamente saudáveis pós-imunização com a vacina dTpa e o grupo controle foi composto por 101 amostras de sangue materno e de colostro de mulheres clinicamente saudáveis não imunizadas. Foram coletadas também as amostras de sangue de cordão umbilical dos respectivos RN das mães do grupo caso e controle, totalizando 66 e 101 amostras de sangue de cordão umbilical, respectivamente. As participantes do estudo foram selecionadas na maternidade do Hospital Geral Universitário no município de Cuiabá, capital de Mato Grosso (MT), de acordo com os seguintes critérios:

- Critérios de inclusão: gestantes saudáveis entre 18 e 40 anos; RN sadio com idade gestacional entre 37 e 41 6/7 semanas e com peso adequado para idade

gestacional. Para as gestantes que compõem o grupo caso foi considerado como critério de inclusão a vacinação com dTpa durante a gestação. A vacina tipo adulto-dTpa utilizada neste estudo foi disponibilizada pelo PNI do Ministério da Saúde (GSK Biologicals, Rixensart, Bélgica) contendo os antígenos: toxoide tetânico (>20 UI), toxoide diftérico (≥ 2 UI), PT (8 μ g), FHA (8 μ g) e PRN (2,5 μ g).

- Critérios de exclusão: doenças crônicas, uso de medicações que poderiam interferir nos resultados (imunossupressores e anti-inflamatórios), doenças infecciosas graves durante a gestação ou no período do parto, reações sorológicas positivas ou reagentes para HIV, TORCHS (toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, herpes simples e sífilis), hepatite B e malária e doenças autoimunes.

Foram obtidas amostras de sangue periférico de adultos saudáveis, utilizadas para a padronização e controle dos testes realizados. Os critérios de seleção foram: adultos voluntários saudáveis de 18 a 35 anos, dos sexos masculino e feminino, com reações sorológicas negativas para HIV, TORCHS e hepatite B. Foi considerado critério de exclusão a presença de sintomas de infecção no período da coleta.

3.3. Obtenção e processamento das amostras de sangue materno, sangue de cordão umbilical e colostro

Após a dequitação da placenta, as amostras de sangue de cordão umbilical e de sangue periférico materno foram coletadas em tubos contendo gel separador (*BD Vacutainer SST*) e centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos

a 4°C para separação dos soros, que foram aliquotados e armazenados a -80°C. Algumas amostras de sangue de cordão umbilical também foram coletadas em tubos com heparina sódica (*BD Vacutainer SST*) para a realização das culturas de sangue, e posteriormente, citometria de fluxo, dentro de 24 horas após o parto.

As amostras de colostro foram coletadas por ordenha manual, até as primeiras 96 horas após o parto. Em seguida, foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C para delipidação. A parte lipídica e o pellet contendo as células foram descartados e o sobrenadante foi dividido em alíquotas e armazenado a -80°C.

Foram utilizados dois *Pools* controle nos testes imunoenzimáticos (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) realizados: um *Pool* de Soro Humano Controle, constituído por 41 amostras de soro de adultos doadores de sangue saudáveis, dos sexos masculino e feminino e com resultados negativos nos testes sorológicos convencionais e um *Pool* de Colostro Humano Controle, constituído por 32 amostras de colostro de parturientes clinicamente saudáveis, ambos já disponíveis no laboratório.

Como padrão foi utilizado o primeiro Padrão Internacional Humano de Antisoro para *Bordetella pertussis* (código: 06/140) do *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC, Hertfordshire, UK). Após reconstituição com 1 ml de água destilada estéril, cada ampola do padrão contém anticorpos IgG anti-PT em concentração de 335 UI/ml e IgA em concentração de 65 UI/ml; anticorpos IgG anti-FHA em concentração de 130 UI/ml e IgA em concentração de 65 UI/ml; anticorpos IgG anti-PRN (69K) em

concentração de 65 UI/ml e IgA em concentração de 42 UI/ml. Após a ressuspensão, o soro padrão foi aliquotado e armazenado a -80°C.

Delineamento Metodológico

3.4. Linhagem Bacteriana

Foi utilizada suspensão da cepa 137 de *Bordetella pertussis* inativada (NIH, Bethesda, MD, USA), lote: IB-CIIIn/P 21/07, mantida a 4°C, preparada na Seção de Vacinas Aeróbias do Instituto Butantan, que foi gentilmente cedida pela Dra. Hisako Gondo Higashi, diretora da Divisão Bioindustrial. Para os testes imunoenzimáticos, a suspensão foi utilizada na concentração de $2,6 \times 10^8$ bactérias/ml e para os testes celulares, seu conteúdo proteico foi dosado (4,627 mg/ml) e a suspensão foi utilizada na concentração de 0,5 mg/ml de proteínas, após padronização da melhor concentração.

3.5. Estudo das concentrações de anticorpos das classes IgG e IgA

3.5.1. Detecção de IgG total nas amostras de soro

As dosagens de IgG total nas amostras de soro materno e de cordão umbilical foram realizadas pela Divisão do Laboratório Central (DLC) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) utilizando a técnica de turbidimetria. As concentrações de IgG total das amostras foram expressas em mg/dl.

3.5.2. Detecção de IgA total nas amostras de colostro

A IgA total do colostro foi avaliada por ELISA conforme o método descrito por Quinello e colaboradores (2010). Microplacas de 96 orifícios (3590,

Costar, NY, USA) foram revestidas com 100 µl/orifício de anti-IgA humana (I-0884, *Sigma, MO, USA*) diluídas em PBS pH 7,4 (concentração final de 5 µg/ml) e incubadas em câmara úmida por 16 a 18 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas 4 vezes com solução salina tamponada acrescida de 0,1% de Tween 20 (PBS-T). As amostras foram diluídas em tampão PBS NaCl 0,35M Tween-20 a 0,2% e adicionadas às placas em duplicatas e em quatro diluições seriadas, onde permaneceram incubadas por 2 horas a 37°C. Em todos os ensaios, juntamente com as amostras, foi utilizado um padrão constituído de IgA de colostro (I-2636, *Sigma, MO, USA*) em concentrações variando entre 3,9 ng/ml a 250 ng/ml e o pool de colostro humano controle. Após as lavagens e posterior incubação do conjugado anti-IgA humano marcado com peroxidase (A-0295, *Sigma, MO, USA*) por 90 minutos a 37°C e novas lavagens, foi adicionada a solução de substrato contendo 0,4 mg/ml de ortofenilenodiamina (P-8287, *Sigma, MO, USA*) em solução de citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 e água oxigenada (H₂O₂) 0,01%. Após 30 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2,5N e a leitura realizada em comprimento de onda de 492 nm (*Labsystems, Finland*). Foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5.0 (USA)* para calcular os valores de cada teste. As concentrações de IgA total das amostras de colostro foram determinadas a partir dos valores da curva padrão de IgA de colostro e expressas em mg/ml.

3.5.3. Dosagem de IgG e IgA anti-*B. pertussis* nas amostras de soro e colostro

Foram realizados testes de ELISA para as dosagens de anticorpos IgG do soro materno, anticorpos IgG de soro de cordão umbilical e anticorpos IgA do colostro reativos com *B. pertussis* (bactérias inteiras), segundo método descrito por Quinello e colaboradores (2010), ou dirigidos aos antígenos purificados PT (cat. 180, *List Biological Laboratories*), FHA (cat. 170, *List Biological Laboratories*) e PRN (cat. 187, *List Biological Laboratories*), também adaptado de Quinello e colaboradores (2010). Microplacas com 96 orifícios (3590, *Costar, NY, USA*) foram adsorvidas com a suspensão bacteriana ou com os antígenos purificados (PT: 0,05µg, FHA: 0,1µg e PRN: 0,1µg) em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0 e deixadas por 16 a 18 horas a 4°C. Cada etapa do teste foi precedida por 4 lavagens com PBS-T. As placas foram, então, bloqueadas (PBS 7,4 - leite desnatado em pó a 1%) por 1 hora e, em seguida, o Padrão 06/140 da NIBSC, os *Pools* de Soro e Colostro Humano Controle e as amostras teste de soro e colostro foram 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 foram incubadas com os conjugados anti-IgG ou anti-IgA humanos marcados com peroxidase (A-0170 ou A-0295, *Sigma, MO, USA*) por 90 minutos 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 a 0,01% foi adicionada. Após 30 minutos, a reação foi

interrompida com ácido sulfúrico 2,5N e a leitura realizada em comprimento de onda de 492 nm (*Labsystems, Finland*).

Foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5.0 (USA)* para calcular os valores de cada teste. Os resultados de IgG e IgA dirigidos a *B. pertussis* (bactérias inteiras) foram expressos em Unidades Arbitrárias (UA/ml), determinados através da curva feita a partir dos resultados das densidades óticas (D.O.) obtidas com os *Pools* controle de soro e colostro, que foram definidos como contendo 1.000 UA/ml de IgG e IgA reativos com *B. pertussis*, respectivamente. As concentrações de anticorpos IgG e IgA dirigidos aos antígenos purificados foram determinadas a partir dos valores da curva padrão obtida com a utilização do Padrão 06/140 e expressas em Unidades Internacionais (UI/ml).

3.6. Estudo da ativação dos linfócitos T e B de sangue total de cordão umbilical

3.6.1. Cultura de linfócitos T e B do sangue total

O estudo da ativação de linfócitos T e B neonatais foi realizado com o sangue total do cordão umbilical com o intuito de manter um microambiente que reflete com mais precisão a fisiologia normal e o possível efeito do nível elevado de anticorpos presente no soro do cordão.

Após a dequitação da placenta, para algumas amostras selecionadas, foram coletados aproximadamente 10 ml de sangue de cordão umbilical em

tubos contendo heparina. Em placas de cultura com 48 orifícios (3548, *Costar, NY, USA*) foram adicionados volumes adequados de sangue de cordão para que em cada poço contivesse 1×10^6 leucócitos, cuja contagem foi realizada em contador automático (*Sysmex XP-300, Sysmex Corporation, Kobe, Japão*). Os leucócitos do sangue foram estimulados ou não (controle negativo) com 0,5 mg/ml da suspensão de *B. pertussis* inativada ou com 5 µl de PHA (controle positivo), diluídos em meio RPMI-1640 (*Gibco®, Life Technologies, Foster City, CA, USA*) suplementado com L-Glutamina a 1%, Gentamicina (50mg/L) e Soro Fetal Bovino (SFB) a 10% (*Sigma, St. Louis, MO, USA*) (meio R-10) durante 48 horas a 37°C. Nas últimas 4h de cultura foi adicionada a Brefeldina A (*BD GolgiPlug, San Jose, CA, USA*), que bloqueia o transporte de proteínas ao complexo de Golgi e leva ao acúmulo de proteínas, no caso, as citocinas, no retículo endoplasmático.

3.6.2. Imunofenotipagem dos linfócitos T e B em cultura

Após a cultura, as células foram transferidas para microtubos e, logo após, foram lisadas duas vezes com *BD FACS Lysing Solution™* (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*), permanecendo durante 20 minutos a temperatura ambiente e na ausência de luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com *Staining Buffer* (PBS 7,4 acrescido de 1% de SFB e 0,1% de azida sódica) e ressuspensas em 100µl da mesma solução. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais dirigidos aos antígenos de superfície de linfócitos T e B e seus marcadores de ativação (**Tabela 1**) durante 30 minutos

e, então, foram fixadas e permeabilizadas com *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) por 30 minutos. Os anticorpos monoclonais para marcação intracelular foram, então, adicionados (anticorpos anti-IFN- γ e anti-Ki67 e o controles isotípicos de ambos) realizando-se, em seguida, uma incubação por 30 minutos. Após duas lavagens, as células foram ressuspensas com 400 μ l de *Staining Buffer* e analisadas por citometria de fluxo. A aquisição foi realizada em citômetro *FACS LRS II Fortessa* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), salvando 20.000 eventos dentro do *gate* de linfócitos totais (em repouso e blastos), determinado pelos parâmetros *forward-scatter* (FSC) e *side-scatter* (SSC). As análises foram feitas no software *FlowJo* (Tree Star, Ashland, OR, USA). Os resultados foram expressos em frequência (%), que indica a quantidade de células que apresenta o marcador analisado e pela Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI, do inglês *Mean Fluorescence Intensity*) obtida nas análises, que corresponde ao número de moléculas de determinado marcador que cada célula apresenta.

Tabela 1. Marcadores de superfície e intracelulares de linfócitos T e/ou B

Anticorpo monoclonal	Clone	Fluorocromo	Fabricante
CD4	SK3	FITC	<i>BD Biosciences</i>
CD3	UCHT1	V500	<i>BD Biosciences</i>
CD69	FN50	APC	<i>BD Biosciences</i>
CD40	5C3	PE	<i>BD Biosciences</i>
CD40L	TRAP1	PECy5	<i>BD Biosciences</i>
CD19	SJ25C1	PECy7	<i>BD Biosciences</i>
IFN- γ	B27	V450	<i>BD Biosciences</i>
Controle isotípico	MOPC-21	V450	<i>BD Biosciences</i>
Ki67	B56	V450	<i>BD Biosciences</i>

*Os anticorpos que estão em azul são de marcação extracelular e os em vermelho são de marcação intracelular.

3.6.3. Dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura

Durante a realização das culturas, em alguns poços foram adicionados volumes adequados de sangue, meio R-10 e estímulos, como descrito no item anterior (3.6.1). No entanto, não foi adicionada a Brefeldina A nas últimas 4 horas, com intuito de que a célula secretasse as citocinas produzidas para o meio extracelular.

IFN- γ e IL-6. Após as 48h de cultura, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para posterior dosagem de IFN- γ e IL-6 por ELISA com a utilização dos kits *OptEIA Human ELISA Set* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) específicos para cada citocina, segundo instruções do fabricante. Foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5.0* (USA) para calcular os valores do teste. Os resultados foram expressos em pg/ml, determinados através da curva feita a partir dos resultados das densidades óticas (D.O.) obtidas com a curva padrão.

IL-2, IL-4, IL-10, Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-17A. Após as 48h de cultura, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para posterior dosagem de IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α e IL-17A por citometria de fluxo com a utilização do *Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Kit* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), segundo instruções do fabricante. As concentrações dessas citocinas nas amostras foram determinadas através do MFI de PE e baseadas na curva padrão obtida para cada citocina, e os resultados expressos em pg/ml.

3.7. Análise Estatística

No presente trabalho, para síntese dos dados foi inicialmente realizada uma análise descritiva, por meio do cálculo de médias, medianas, desvios padrão. Para verificar a normalidade dos dados, o teste de normalidade de D'Agostino-Pearson foi utilizado. Foram utilizados testes não paramétricos tais como o teste de *Wilcoxon*, para diferenças entre medianas em amostras pareadas e teste de *Mann-Whitney*, para amostras não pareadas e para os dados com distribuição normal, testes paramétricos, como o teste t de *Student*. A análise de correlação foi realizada utilizando os testes de Spearman ou Pearson de acordo com a normalidade dos dados. Todos os testes estatísticos foram realizados considerando um limite de confiança de 95% e nível de significância $p < 0,05$. As taxas de transferência de anticorpos IgG expressas em porcentagem foram definidas como a razão entre a concentração de IgG no soro de cordão e a de IgG no soro materno, multiplicada por 100.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Análise do Grupo Amostral

Para compor o grupo caso foram coletados 66 conjuntos de amostras (sangue materno, colostro e sangue de cordão umbilical do RN) de gestantes vacinadas com a vacina dTpa e, para o grupo controle, 101 conjuntos de amostras de gestantes não vacinadas. Todas as parturientes eram saudáveis e apresentaram sorologias para TORCHS negativas, bem como, resultados de sorologia para HIV e malária negativos. Os grupos possuem características semelhantes quanto à idade materna, idade gestacional, peso de nascimento do RN e Ápgar aos 5 minutos, porém diferem quanto ao tipo de parto (normal/cesárea) realizado (**Tabela 2**).

Tabela 2. Características das parturientes e de seus RN, de acordo com seu estado em relação à vacinação com dTpa.

	Estado da vacina dTpa	
	Grupo Caso (n=66)	Grupo Controle (n=101)
Idade materna (anos) *	28 (15 - 39)	24 (15 - 38)
Idade gestacional (semanas)	$39 \frac{2}{7} \pm 1$	$39 \frac{2}{7} \pm 1 \frac{5}{7}$
**	$(38 \frac{2}{7} - 40 \frac{2}{7})$	$(37 \frac{4}{7} - 41)$
Peso de nascimento (g) **	3344 ± 457 (2887 - 3801)	3335 ± 442 (2983 - 3777)
Apgar 5 minutos *	9 (5 - 10)	9 (6 - 10)
Parto Normal	26 (39,4%)	94 (93,1%) §
Parto Cesárea	40 (60,6%)	7 (6,9%) §
Idade gestacional de vacinação (semanas) **	$33 \pm \frac{3}{7}$ (30 - 36)	—
Intervalo de tempo entre a vacinação e o parto (dias) *	46 (13 - 111)	—

* Mediana (Valor mínimo e valor máximo); ** Média $\pm$ DP (Variância); — Não se aplica.

§ Diferenças entre os grupos: número de partos cesárias caso vs. controle e número de partos normais caso vs. controle ($p < 0,0001$).

A **Figura 3**, a seguir, mostra a idade gestacional na vacinação, com a vacina dTpa das parturientes do grupo caso. Em nossa casuística, a grande maioria das gestantes foi vacinada no período recomendado pelo Ministério da Saúde, ou seja, entre a 27^a e 36^a semana de gestação.

Figura 3. Idade gestacional de vacinação das parturientes com a vacina dTpa (semanas).

Em 11 gestantes, os RN nasceram antes que fossem completos 30 dias da vacinação materna, enquanto a média de tempo total entre a vacinação e o parto apresentada pelo grupo foi de 46 dias (**Figura 4**). Embora, segundo a literatura, seja necessário que a vacinação materna ocorra com maior antecedência para que haja uma passagem transplacentária de anticorpos eficaz para o feto, o Ministério da Saúde (2014) preconiza como prazo limite para vacinação 20 dias antes da provável data do parto.

Figura 4. Intervalo de tempo entre a vacinação com a vacina dTpa e o parto (dias).

4.2. Anticorpos IgG totais e taxa de passagem transplacentária

A mediana das concentrações de anticorpos IgG totais nas amostras de soro materno foi significativamente menor que a de seus respectivos RN, em ambos os grupos ($p < 0,0001$). Foi detectada correlação entre as amostras de soro materno e de seus filhos no grupo caso ($r = 0,51$; $p < 0,001$) e no grupo controle ($r = 0,31$; $p < 0,01$).

Quando comparados grupo caso versus grupo controle, foram detectadas concentrações superiores de IgG total nas gestantes não vacinadas ($p < 0,0001$) e seus respectivos RN ($p < 0,001$), em relação às vacinadas e seus RN. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto à taxa de transferência transplacentária de anticorpos IgG totais, sendo a medianas do grupo caso e controle, respectivamente, 114 e 112% (**Tabela 3**). Foi observada uma correlação inversa entre as

concentrações de IgG total materna e taxas de transferência de IgG no grupo caso ($r = -0,34$; $p < 0,01$) e no grupo controle ($r = -0,68$; $p < 0,001$).

Tabela 3. Análise estatística descritiva das concentrações de IgG sérica total nas amostras de soro materno e de soro de cordão umbilical dos RN e taxas de transferência de IgG (%) dos grupos caso e controle.

IgG Sérica Total (mg/dl)						
	Grupo Caso (n=66)			Grupo Controle (n=101)		
	M	RN	T (%)	M	RN	T (%)
Mediana	920,5 [†]	1068,0 [§]	114	1075,0 [†]	1190,0 [§]	112
Valor mínimo	520,0	603,0	31	556,0	767,0	63
Valor máximo	1476,0	1677,0	196	1964,0	1801,0	211
IC ↓	895,2	1013,0	103	1053,0	1165,0	108
IC ↑	992,6	1130,0	120	1137,0	1244,0	117
Teste de Wilcoxon	$p < 0,0001$		-	$p < 0,0001$		-

M: mãe; RN: recém-nascido; T: taxa de transferência; IC ↓: Intervalo de confiança inferior; IC ↑: Intervalo de confiança superior; - : Diferença estatística não detectada entre os grupos. Teste de Mann-Whitney: [†] Diferença entre mães caso vs. controle ($p < 0,0001$); [§] Diferença entre RN caso vs. controle ($p < 0,001$).

4.3. Anticorpos IgG específicos (anti-*B. pertussis*, anti-PT, anti-FHA e anti-PRN) e taxas de passagem transplacentária

Quanto aos anticorpos IgG séricos específicos, a análise estatística revelou títulos significativamente mais altos de IgG anti-*B. pertussis* e também para todos os antígenos purificados de pertussis (PT, FHA e PRN) nas amostras de soro materno e de cordão umbilical do grupo caso quando comparado com o grupo controle ($p < 0,0001$). Houve, ainda, a detecção de níveis significativamente mais altos de IgG anti-*B. pertussis* ($p < 0,05$), anti-PT,

anti-FHA e anti-PRN ($p<0,0001$) nas gestantes não imunizadas em relação aos seus respectivos RN (**Figura 5**).

Figura 5. Concentrações de anticorpos IgG anti-*B. pertussis* (A), anti-PT (B), anti-FHA (C) e anti-PRN (D) em amostras de soro materno (M) e soro de seus respectivos recém-nascidos (RN) dos grupos caso (gestantes vacinadas) e controle (gestantes não vacinadas). No gráfico são mostrados os valores mínimo e máximo, percentis 25% e 75%, mediana (—) e média (+).

Houve correlação entre as amostras de soro materno e de seus respectivos RN quando analisadas as concentrações de IgG anti-*B. pertussis*, anti-PT, anti-FHA e anti-PRN (**Figura 6**).

Figura 6. Correlações entre as amostras de soro materno (M) e soro de seus respectivos recém-nascidos (RN) quanto às concentrações de IgG anti-*B. pertussis* (*Bp*) (**A e B**), anti-PT (**C e D**), anti-FHA (**E e F**) e anti-PRN (**G e H**) do grupo caso (**A, C, E e G**) e do grupo controle (**B, D, F e H**).

A comparação das medianas das concentrações de anticorpos IgG anti-*B. pertussis*, anti-PT, anti-FHA e anti-PRN mostra que a vacinação induz um grande aumento nos níveis do anticorpos específicos nas gestantes vacinadas e seus respectivos RN. A **Tabela 4**, a seguir, mostra esses valores, juntamente com as diferenças entre as concentrações (em vezes) calculadas por meio da divisão das medianas do grupo caso pelas medianas do grupo controle.

Tabela 4. Medianas das concentrações de anticorpos IgG anti-*B. pertussis*, anti-PT, anti-FHA e anti-PRN nas amostras de soro materno e de soro de cordão umbilical dos RN dos grupos caso e controle e diferenças das concentrações entre os grupos caso e controle.

IgG	M			RN		
	Grupo Caso	Grupo Controle	Diferença (X)	Grupo Caso	Grupo Controle	Diferença (X)
Anti-Bp (UA/ml)	942,7	229,2	4,1	977,7	263,9	3,7
Anti-PT (UI/ml)	75,1	5,2	14,4	63,3	5,8	11,0
Anti-FHA (UI/ml)	329,9	19,1	17,3	322,4	31,0	10,4
Anti-PRN (UI/ml)	313,1	5,5	56,8	270,3	8,0	33,8

M: mãe; RN: recém-nascido; *Bp*: *Bordetella pertussis*; PT: toxina pertussis; FHA: Filamento de hemaglutinina; PRN: pertactina; X: vezes.

As taxas de passagem transplacentária de anticorpos IgG anti-*B. pertussis*, anti-PT, anti-FHA e anti-PRN mostraram-se significativamente maiores no grupo controle ($p<0,01$) (**Figura 7**). Interessantemente, as taxas apresentadas pelo grupo controle foram positivas para todos os anticorpos, ou

seja, os níveis de anticorpos foram mais elevados nos neonatos quando comparados com suas mães.

Figura 7. Taxas de passagem transplacentária de anticorpos IgG anti-*B. pertussis* (*Bp*), anti-PT, anti-FHA e anti-PRN dos grupos caso (gestantes vacinadas) e controle (gestantes não vacinadas). No gráfico são mostrados os valores mínimo e máximo, percentis 25% e 75%, mediana (—) e média (+).

Foi observada correlação inversa entre as concentrações de anticorpos IgG maternos dirigidos para *B. pertussis* e para seus antígenos purificados e as taxas de transferência desses anticorpos para os RN, dos grupos caso e controle analisados conjuntamente. Essa análise foi realizada na tentativa de evidenciar o fenômeno de saturação dos receptores FcRn, o que demonstra que quanto maior os níveis de anticorpos específicos na mãe, menor a taxa de transmissão desses anticorpos para o RN. Os índices de correlação foram:

anti-*B. pertussis* ($r = - 0,2345$; $p < 0,01$); anti-PT ($r = - 0,3394$; $p < 0,0001$); anti-FHA ($r = - 0,308$; $p < 0,0001$) e anti-PRN ($r = - 0,2342$; $p < 0,01$).

4.4. Avaliação do momento de vacinação com a vacina dTpa

Foi observado que as gestantes vacinadas entre as 26^a e a 31^a semanas de gestação apresentam as maiores taxas de transferência placentária de anticorpos IgG para pertussis e todos os antígenos purificados, seguido pelas gestantes vacinadas entre 32^a e a 36^a semanas de gestação. Ambos os grupos apresentaram valores estatisticamente maiores de taxas de transferência placentária de anticorpos IgG específicos quando comparados com o grupo de gestantes vacinadas após a 37^a semana de gestação (**Figura 8**).

Figura 8. Taxas de passagem de anticorpos IgG anti-*B. pertussis* (*Bp*) (**A**), anti-PT (**B**), anti-FHA (**C**) e anti-PRN (**D**) de acordo com a idade gestacional de vacinação (semanas) das gestantes do grupo caso.

A análise da correlação entre o intervalo de tempo da vacinação na gestante até o parto e taxa de transferência placentária dos anticorpos IgG anti-PT, anti-FHA e anti-PRN mostrou-se significativamente positiva (**Figura 9**). Para os anticorpos IgG anti-*B. pertussis* não foi possível observar o mesmo resultado.

Figura 9. Correlações entre as taxas de passagem de anticorpos IgG anti-*B. pertussis* (*Bp*) (A), anti-PT (B), anti-FHA (C) e anti-PRN (D) e o tempo da vacinação com a vacina dTpa até o parto (dias) das gestantes do grupo caso.

Não foram observadas correlações entre o intervalo de tempo da vacinação na gestante até o parto e as concentrações de anticorpos IgG anti-*B. pertussis*, anti-PT, anti-FHA e anti-PRN nos RN do grupo caso.

4.5. Anticorpos IgA totais

A análise estatística não revelou diferenças significativas entre as concentrações de IgA total nas amostras de colostro dos grupos caso e controle (**Tabela 5**). Entre as amostras coletadas foram encontradas duas

parturientes com deficiência seletiva de IgA, uma pertencente ao grupo caso e outra ao grupo controle, e portanto, não foram incluídas nas análises de colostro. As demais perdas no número de amostras ocorreram em decorrência da falta de volume necessário para realização de todas as dosagens laboratoriais propostas.

Tabela 5. Análise estatística descritiva das concentrações de IgA total nas amostras de colostro materno dos grupos caso e controle.

	IgA Total (mg/ml)	
	Grupo Caso (n=62)	Grupo Controle (n=98)
Mediana	51,01	67,75
Valor mínimo	3,40	13,18
Valor máximo	257,0	233,7
IC ↓	54,51	64,35
IC ↑	82,37	79,03
Teste de Mann Whitney	-	

IC ↓: Intervalo de confiança inferior; IC ↑: Intervalo de confiança superior; - : Diferença estatística não detectada entre os grupos.

4.6. Anticorpos IgA específicos (anti-*B. pertussis* e anti-PT)

Diferenças significativas foram detectadas entre os grupos caso e controle quanto à concentração de IgA anti-*B. pertussis* nas amostras de colostro ($p < 0,05$). Gestantes não vacinadas apresentaram uma mediana maior do que as gestantes vacinadas (6315,0 UA/ml e 4287,0 UA/ml, respectivamente). Uma grande amplitude de variação nas dosagens de anticorpos IgA específicos foi observada em ambos os grupos, com concentrações variando entre 128,6 a 22195,0 UA/ml para o grupo caso e

398,8 a 42075,0 UA/ml para o grupo controle (**Figura 10**). Não foi observada correlação entre as concentrações de IgA anti-*B. pertussis* no colostro e IgG anti-*B. pertussis* no soro das gestantes de ambos os grupos.

Figura 10. Concentrações de anticorpos IgA anti-*B. pertussis* em amostras de colostro materno dos grupos caso (gestantes vacinadas) e controle (gestantes não vacinadas). No gráfico são mostrados os valores mínimo e máximo, percentis 25% e 75%, mediana (—) e média (+).

As concentrações mais baixas de IgA anti-*B. pertussis* nas amostras de colostro no grupo caso, como mostrado anteriormente, podem ser consequência do tempo de coleta de colostro após o parto, visto que a mediana de tempo diferiu entre os grupos (26,0 horas e 22,0 horas, para grupo caso e controle, respectivamente, $p < 0,0001$), como mostrado na **Figura 11**, a seguir. O colostro, secretado nas primeiras horas após o parto, contém concentrações mais elevadas de IgA que tendem a cair com o decorrer do tempo (Agarwal *et al.*, 2011; Ramírez-Santana *et al.*, 2012).

Figura 11. Horas de realização da coleta de colostro dos grupos caso (gestantes vacinadas) e controle (gestantes não vacinadas) contadas a partir do momento do parto. No gráfico são mostrados os valores mínimo e máximo, percentis 25% e 75%, mediana (—) e média (+).

A **Figura 12**, a seguir, evidencia a ausência de diferenças significativas nas concentrações de IgA anti-PT entre os grupos. As medianas mostraram-se muito semelhantes entre as gestantes vacinadas e não vacinadas (134,1 UI/ml e 138,7 UI/ml, respectivamente). Assim como para os anticorpos anti-*B. pertussis*, não foi observada correlação entre as concentrações de IgA anti-PT no colostro e IgG anti-PT no soro das gestantes de ambos os grupos. No entanto, houve correlação significativa entre as concentrações de IgA anti-*B. pertussis* e IgA anti-PT presentes nas amostras de colostro em ambos os grupos (grupo caso: $r = 0,67$, $p < 0,0001$ e grupo controle: $r = 0,62$, $p < 0,0001$).

Figura 12. Concentrações de anticorpos IgA anti-PT em amostras de colostro materno dos grupos caso (gestantes vacinadas) e controle (gestantes não vacinadas). No gráfico são mostrados os valores mínimo e máximo, percentis 25% e 75%, mediana (—) e média (+).

4.7. Estudo da ativação dos linfócitos T CD4, T CD8 e B

As culturas de linfócitos foram realizadas utilizando amostras de sangue de cordão umbilical dos RN, sendo 17 amostras do grupo caso e 15 amostras do grupo controle, acompanhadas por 11 amostras de sangue periférico de adultos saudáveis.

A análise das culturas foi realizada delimitando-se a população de linfócitos com a utilização dos parâmetros de tamanho (*forward scatter*, FSC) e granulosidade celular (*side scatter*, SSC) (**Figura 13**).

Figura 13. Dot plot representativo do *gate* de linfócitos com base no tamanho (*forward scatter*, FSC) e granulosidade celular (*side scatter*, SSC).

Em seguida, dentro do *gate* de linfócitos, utilizando os anticorpos anti-CD3 e anti-CD4 foi feita a delimitação da população de linfócitos T CD4 ($CD3^+CD4^+$) e de linfócitos T CD8 ($CD3^+CD4^-$). Já a população de linfócitos B foi delimitada com o uso dos anticorpos anti-CD3 e anti-CD19 ($CD19^+CD3^-$) (Figura 14).

Figura 14. Dot plots representativos dos *gates* das populações de linfócitos T CD4 ($CD3^+CD4^+$) e de linfócitos T CD8 ($CD3^+CD4^-$) (A) e de linfócitos B $CD19^+CD3^-$ (B).

Com base nos *gates* acima citados, juntamente com os controles de compensação para cada fluorocromo, foi realizada a análise das expressões dos marcadores de ativação (CD40L e CD69 em linfócitos T e CD40 em linfócitos B), proliferação (Ki67) e produção de citocinas (IFN- γ) para as células não estimuladas, estimuladas com PHA ou *B. pertussis*. A **Figura 15**, a seguir, mostra alguns exemplos das análises realizadas.

Figura 15. Dot plots representativos das análises da expressão, em porcentagem, dos marcadores CD40L e IFN- γ dentro dos *gates* das populações de linfócitos TCD4 de células não estimuladas e estimuladas com *B. pertussis*.

Tendo como parâmetro as células não estimuladas, nos grupos de neonatos de gestantes vacinadas e não vacinadas, é possível notar uma perda significativa na porcentagem de células T CD4⁺ em consequência do estímulo com *B. pertussis* ou com PHA (controle positivo) (**Figura 16A**). Em relação aos

linfócitos T CD8⁺, podemos observar uma diminuição significativa em sua porcentagem somente após o estímulo com PHA (**Figura 16B**). Em comparação ao grupo adulto, utilizado como controle nos experimentos, os dois grupos de neonatos apresentam uma perda na porcentagem de células estimuladas significativamente maior. Para os linfócitos B foi visualizada, ainda, uma diferença entre os grupos caso e controle, sendo maior a perda de células no grupo de RN de gestantes vacinadas (**Figura 16C**).

Figura 16. Análise das porcentagens de (A) células T CD4⁺, (B) células T CD8⁺ e (C) células CD19⁺ dentro da população de linfócitos nas amostras de sangue de cordão dos RN do grupo caso (gestantes vacinadas), do grupo controle (gestantes não vacinadas) e do sangue periférico de adultos. Nos gráficos são mostradas (-) células não estimuladas, (+) células estimuladas com PHA, (Bp) células estimuladas com *B. pertussis*, os valores mínimo e máximo, percentis 25% e 75%, mediana (—) e média (+). Os asteriscos representam valores significativamente menores quando comparados com as células não estimuladas de cada grupo (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

O estudo dos marcadores de ativação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ mostrou um aumento nas porcentagens dessas células que expressam CD40L (CD154) após o estímulo com *B. pertussis* nos grupos de RN. O CD40L consiste em uma molécula coestimuladora de expressão transiente que

interage por meio da sua ligação com o CD40, expresso constitutivamente em linfócitos B, durante o processo de apresentação antigênica (Wieland e Shipkova, 2016). O aumento das porcentagens de células T CD4⁺ ou T CD8⁺ expressando CD40L foi mais evidente no grupo caso, porém não estatisticamente diferente dos outros grupos (**Figura 17A e 17C**). Também foi evidenciado um aumento das porcentagens de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ após o estímulo com *B. pertussis* em ambos os grupos de neonatos (**Figura 17B**). O marcador CD69 é rapidamente expresso após a estimulação do complexo TCR (T-Cell Receptor)/CD3 e atua como uma molécula coestimuladora para ativação e proliferação desses linfócitos (Sava *et al.*, 2016). A análise dos linfócitos B mostra resultados condizentes com os encontrados para os linfócitos T, ou seja, um aumento significativo e semelhante das porcentagens de células B expressando o marcador CD40 em todos os grupos após estímulo com *B. pertussis* (**Figura 17D**).

Figura 17. Análise das porcentagens de (A) células T CD4⁺CD40L⁺, (B) células T CD4⁺CD69⁺, (C) células T CD8⁺CD40L⁺ e (D) células B CD19⁺CD40⁺ dentro do *gate* da população de linfócitos nas amostras de sangue de cordão dos RN do grupo caso (gestantes vacinadas), do grupo controle (gestantes não vacinadas) e do sangue periférico de adultos. Nos gráficos são mostradas (-) células não estimuladas, (+) células estimuladas com PHA, (Bp) células estimuladas com *B. pertussis*, os valores mínimo e máximo, percentis 25% e 75%, mediana (—) e média (+). Os asteriscos representam valores significativamente maiores quando comparados com as células não estimuladas de cada grupo (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

As células T CD4 e T CD8 também foram avaliadas quanto à sua capacidade de proliferação após estimulação com o uso de anticorpos anti-Ki67, que consiste em uma proteína nuclear somente expressa durante as fases de divisão celular, estando ausente em células quiescentes ou durante o reparo do DNA (Soares *et al.*, 2010). O estímulo com PHA gerou grande proliferação dos linfócitos T CD4⁺ nos grupos dos neonatos ($p<0,001$) e no grupo adulto ($p<0,01$). Já as células T CD8⁺ mostraram uma menor proliferação do que as células T CD4, no entanto, também significativa quando comparada com as células não estimuladas nos grupos caso e controle ($p<0,05$). A bactéria *B. pertussis* foi capaz de gerar uma proliferação significativa somente para as células T CD4 dos RN do grupo caso e para as células T CD4 do grupo adulto (**Figura 18**).

Figura 18. Porcentagens de proliferação quantificadas por meio da ligação dos anticorpos anti-Ki67 nas células T CD4⁺ e T CD8⁺ dentro da população de linfócitos nas amostras de sangue de cordão dos RN do grupo caso (gestantes vacinadas), do grupo controle (gestantes não vacinadas) e do sangue periférico de adultos, antes (-) e depois do estímulo com PHA (+) (coluna esquerda) e com *B. pertussis* (Bp) (coluna direita). Os asteriscos representam valores significativamente maiores quando comparados com as células não estimuladas de cada grupo (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Dada a importância da produção de IFN- γ na resposta imunológica contra a *B. pertussis*, em nosso estudo, realizamos a quantificação desta citocina nos meios intra e extracelular. Os RN dos dois grupos apresentaram aumento nas porcentagens de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ após a estimulação com *B. pertussis*, comparado com as células não estimuladas ($p < 0,05$), mas tal resultado, assim como na proliferação, não foi observado

para células T CD8⁺ (**Figuras 19A e 19C**). Quanto à produção intracelular total de IFN- γ , representada pelo MFI, as amostras de RN do grupos caso e controle apresentaram um aumento significativo da mediana após a estimulação com *B. pertussis* em células T CD4⁺ ($p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente) e em células T CD8⁺ ($p<0,05$ em ambos os grupos) (**Figura 19B e 19D**). No entanto, não foram detectadas diferenças nas porcentagens e no MFI de células produtoras de IFN- γ entre os dois grupos de RN. Importante ressaltar que para o grupo de adultos não foram observados aumentos significativos das porcentagens de células T produtoras de IFN- γ ou da produção intracelular total de IFN- γ frente ao estímulo com *B. pertussis*. Enquanto, após o estímulo com PHA, o grupo adulto apresentou frequências significativamente mais altas de células CD4 e CD8 produtoras de IFN- γ do que os grupos de neonatos ($p<0,001$ e $p<0,05$, respectivamente), bem como um maior MFI de células T CD4 IFN- γ + em relação somente ao grupo controle ($p<0,05$).

Figura 19. Análise das porcentagens (A) e do MFI (B) de células T CD4⁺IFN-γ⁺, e das porcentagens (C) e do MFI (D) de células T CD8⁺IFN-γ⁺, dentro da população de linfócitos nas amostras de sangue de cordão dos RN do grupo caso (gestantes vacinadas), do grupo controle (gestantes não vacinadas) e do sangue periférico de adultos. Nos gráficos são mostradas (-) células não estimuladas, (+) células estimuladas com PHA, (Bp) células estimuladas com *B. pertussis*, os valores mínimo e máximo, percentis 25% e 75%, mediana (—) e média (+). Os asteriscos representam valores significativamente maiores quando comparados com as células não estimuladas de cada grupo (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

As dosagens de IFN-γ nos sobrenadantes de cultura de células não estimuladas mostraram níveis baixos ou indetectáveis nas amostras dos RN de gestantes vacinadas e não vacinadas, bem como, nos adultos. Algumas amostras de RN de ambos os grupos não responderam ou apresentaram níveis

reduzidos de IFN- γ nos sobrenadantes frente ao estímulo com PHA, ao contrário do observado na cultura de sangue de adultos. Entretanto, as medianas mostram resultados significativos, indicando a produção de IFN- γ por todos os grupos após estimulação com PHA (grupo caso: $p < 0,05$; grupo controle: $p < 0,001$; grupo adulto: $p < 0,001$) e após estimulação com *B. pertussis* (grupo caso: $p < 0,01$; grupo controle: $p < 0,001$, grupo adulto: $p < 0,001$). Não foram detectadas diferenças significativas nos níveis de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura entre os dois grupos de neonatos. O grupo adulto revelou uma secreção aumentada de IFN- γ após estimulação por *B. pertussis* em comparação com ambos os grupos de RN ($p < 0,0001$).

As dosagens das outras citocinas nos sobrenadantes de cultura das amostras de soro de cordão umbilical foram realizadas com o intuito de estudar e comparar o perfil de resposta apresentado pelos RN das gestantes vacinadas ou não vacinadas. As citocinas dosadas foram TNF- α e IL-2, que correspondem ao perfil de resposta Th1; IL-4, IL-6 e IL-10, que correspondem ao perfil de resposta Th2; e IL-17, secretadas por células Th17 (Denkinger *et al.*, 2006).

A comparação das células não estimuladas com as estimuladas dentro do mesmo grupo mostra que na presença de *B. pertussis* as células dos neonatos responderam com boa produção de IL-6, IL-10, TNF- α , enquanto a produção de IL-2 e IL-4 foi muito baixa. Não houve produção de IL-17A após a estimulação com a bactéria. Os mesmos resultados foram observados para o grupo adulto. Já o estímulo com PHA foi muito mais eficaz para o grupo adulto, levando à produção de maiores níveis de todas as citocinas, com exceção da IL-6. Não foram detectadas diferenças entre os grupos caso e controle quanto

à produção de todas as citocinas em resposta à pertussis ou à PHA. Tais achados estão demonstrados na **Tabela 6**, a seguir.

Tabela 6. Concentrações de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A nos sobrenadantes de cultura de leucócitos do sangue dos RN do grupo caso (gestantes vacinadas), do grupo controle (gestantes não vacinadas) e do sangue periférico de adultos.

IL (pg/ml)	Grupo Caso (n=17)			Grupo Controle (n=15)			Grupo Adulto (n=11)		
	(-)	(+)	Bp	(-)	(+)	Bp	(-)	(+)	Bp
IL-2	0,1 (0-0,7)	6,0*** (28,6-645,8)	0,7 (0,4-2,1)	0,3 (0,2-1,3)	19,2*** (0-1628,0)	0,8 (0,5-2,5)	0,7 (0,4-1,7)	287,2*** (33,7-1787,0)	2,0 (1,0-6,9)
IL-4	0,3 (0,2-0,5)	0,8* (0,6-6,1)	1,2** (1,0-3,2)	0,6 (0,3-0,8)	1,2** (0-21,9)	1,5** (1,0-3,2)	0,6 (0,4-0,9)	75,4*** (54,9-202,8)	2,4*** (1,5-5,6)
IL-6	974.6 (227.4-4176.0)	4818.0*** (1488.0-15603.0)	10589.0** (6058.0-18510.0)	491.1 (81.9-2946.0)	6380.0* (2345.0-17359.0)	13234.0** (6583.0-26606.0)	1754.0 (505.4-6088.0)	3925.0 (2732.0-5637.0)	6781.0 (4271.0-10766.0)
IL-10	22,6 (36,1-263,8)	316,5** (105,0-934,5)	488,0** (325,2-726,6)	5,3 (25,3-272,1)	427,2** (0-1279,0)	439,1*** (238,8-826,4)	322,8 (132,8-680,0)	1422,0*** (974,5-2345,0)	557,1 (322,9-902,2)
TNF- α	2,7 (0-156,1)	10,3* (68,4-543,4)	325,0** (133,2-1599,0)	4,3 (0-68,5)	34,7** (0-1099,0)	382,9*** (200,8-1359,0)	28,1 (3,4-96,3)	599,3*** (162,6-2072,0)	1742,0*** (1179,0-3268,0)
IFN- γ	15,2 (15,2-15,2)	34,4* (24,9-354,4)	46,6** (13,5-161,4)	15,2 (15,2-15,2)	476,1*** (120,2-806,6)	35,8*** (16,9-73,0)	22,1 (4,8-190,2)	805,1*** (735,3-987,7)	465,7*** (307,6-742,9)
IL-17A	11,4 (7,0-25,3)	8,9 (5,6-16,8)	10,0 (8,8-28,4)	24,8 (17,8-38,1)	12,9** (9,9-26,8)	7,7** (5,7-19,3)	12,0 (7,3-21,3)	157,5** (100,1-440,9)	6,6 (3,8-10,9)

Grupo caso, vacinação com dTpa durante a gestação; Grupo controle, sem vacinação com dTpa durante a gestação; IL, Interleucina. Os leucócitos sanguíneos foram estimulados *ex vivo* com 5 μ L de PHA (+) ou 0,5 mg/mL de *B. pertussis* (Bp) ou deixados sem estímulo (-) por 48 horas e os sobrenadantes coletados para quantificar as concentrações de citocinas por citometria de fluxo (IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α e IL-17A) ou ELISA (IFN- γ e IL-6). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho propôs uma investigação ampla da resposta imunológica à pertussis: a resposta humoral, por meio do estudo da aquisição passiva de anticorpos pelos RN por via transplacentária e pelo aleitamento materno; e a resposta celular, avaliada pela ativação dos linfócitos neonatais, em um contexto de alta concentração de anticorpos IgG específicos adquiridos, após vacinação das gestantes com a vacina dTpa.

As coletas foram realizadas no estado do Mato Grosso, em hospitais de grande porte localizados na região de Cuiabá. Muitas gestantes que compõem nossa população de estudo são provenientes de regiões afastadas e não realizaram um pré-natal completo. Creditamos a isso a possibilidade de coletar um grande número de amostras de parturientes não vacinadas, mesmo após a implementação da vacina dTpa no calendário de vacinação da gestante, em novembro de 2014. No entanto, no decorrer do trabalho, foi encontrada maior dificuldade em realizar as coletas do grupo controle, indicando a crescente aderência à vacina, o que é extremamente benéfico para a população.

Seguindo os critérios de inclusão e exclusão, as gestantes de ambos os grupos estavam saudáveis no momento da coleta e não apresentaram histórico de doenças crônicas. Os partos ocorreram sem complicações, culminando com o nascimento de neonatos a termo, saudáveis e com peso adequado para a idade gestacional. Dessa forma, é passível de entendimento a semelhança entre as características demográficas apresentadas pelos grupos caso e controle. Uma grande discrepância foi observada apenas quanto ao tipo de parto realizado, sendo o número de cesáreas maior no grupo caso. O tipo de

parto consiste na característica obstétrica com maior potencial para influenciar os resultados encontrados nos ensaios de cultura celular e citometria de fluxo.

O aumento de citocinas como IL-6 e IL-1 β no soro de gestantes é responsável por estimular a produção da prostaglandina, importante para promover a maturação do cérvix e desencadear as contrações uterinas (Protonotariou *et al.*, 2010). Essas alterações estão presentes em partos vaginais e ausentes em cesárias eletivas. O trabalho de parto prolongado submete o feto a um quadro de stress que pode gerar alterações em seu estado metabólico, reduzindo a tensão de oxigênio e, conseqüentemente, levando ao aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 (Levy, 2007). O próprio esforço físico, exercido pela gestante durante o trabalho de parto vaginal e a ruptura das membranas podem levar a maiores concentrações de IL-6 e TNF- α , respectivamente (Malamitsi-Puchner *et al.*, 2005). Assim, o nascimento por parto vaginal pode gerar maiores concentrações de citocinas pró-inflamatórias e seus receptores no cordão umbilical de neonatos em comparação com aqueles nascidos por cesárias eletivas. Essas citocinas podem modular a resposta imune desses RN, potencializando diferentes mecanismos imunológicos como a fagocitose e expressão de moléculas de adesão celular (Malamitsi-Puchner *et al.*, 2005). Yektaei-Karin e colaboradores (2007), ao investigar o quanto a resposta imune do RN pode ser afetada em relação aos diferentes tipos de partos (normal, cesárea eletiva, ou c/ assistência cirúrgica), mostraram que o parto normal apresenta maior estresse fetal com alterações no pH e lactato da artéria umbilical, bem como, no número de neutrófilos e monócitos, quando comparado com o parto cesárea. Houve, ainda, um aumento na capacidade de transmigração espontânea ou induzida

por IL-8 dos neutrófilos de RN nascidos de parto normal, o que mostra um perfil de maior ativação celular durante este tipo de parto. No entanto, no trabalho citado, não foram encontradas alterações significativas em relação ao número de linfócitos ou às dosagens de IFN- γ , que consistem na população alvo no nosso estudo e a principal citocina envolvida na resposta imunológica à *B. pertussis*, respectivamente.

Já quanto às dosagens de anticorpos totais e específicos, não é esperado que o tipo de parto promova alterações nos resultados, visto que a concentração de anticorpos apresentada pela parturiente e seu filho no momento do parto são consequência do complexo processo de passagem transplacentária que ocorre ao longo de semanas durante a gestação, até o momento do parto.

As concentrações de anticorpos IgG específicos (anti-*B. pertussis*, anti-PT, anti-FHA e anti-PRN) no grupo caso evidenciam a capacidade da vacina dTpa de gerar uma resposta imunológica humoral específica. Os níveis apresentados pelas gestantes vacinadas e seus RN são significativamente maiores, para todos os antígenos acima citados, quando comparados com as gestantes não vacinadas e seus filhos. Maiores concentrações de anticorpos específicos nas mães e seus neonatos após a imunização com dTpa é uma observação incontestável descrita por muitos outros grupos (Gall *et al.*, 2011; Munoz *et al.*, 2014; Raya *et al.*, 2014b; Hoang *et al.*, 2016; Eberhardt *et al.*, 2016; Wanlapakorn *et al.*, 2017).

Além de maiores concentrações desses anticorpos nas amostras do grupo caso, também foi possível notar a reduzida imunogenicidade da proteína PT, revelada pelas concentrações mais baixas de anticorpos dirigidos a essa

proteína no grupo caso em comparação com os demais antígenos presentes na vacina. Isso pode ser consequência da especificidade desta proteína, produzida somente pela bactéria *B. pertussis* (Carbonetti, 2015), enquanto os antígenos FHA e PRN podem ser encontrados em outras espécies de *Bordetella*, o que levaria ao fenômeno de reatividade cruzada (Hodder *et al.*, 2000). Um trabalho de Hoiby e colaboradores, realizado em 1976, já evidenciava a reatividade cruzada de vários antígenos presentes na *B. pertussis* e em outras espécies de bactérias, principalmente Gram-negativas. Dos 44 antígenos estudados, apenas um foi descrito na época como um possível antígeno específico só da *B. pertussis*, enquanto desses mesmos 44 antígenos, 42 foram encontrados na *B. parapertussis* e 40 na *B. bronchiseptica* (Hoiby *et al.*, 1976). Particularmente, anticorpos anti-FHA podem ainda ser direcionados a epítomos presentes em outros gêneros de bactérias como *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydophila pneumoniae* (Matto e Cherry, 2005).

A proteína PRN foi a que apresentou maior capacidade imunogênica, pois o grupo de gestantes vacinadas apresenta uma mediana de concentração de anticorpos IgG anti-PRN 56 vezes maior do que o grupo de gestantes não vacinadas, assim como seus respectivos RN, que apresentam uma concentração quase 34 vezes maior do que os RN do grupo controle. A presença desses anticorpos pode ter grande potencial benéfico para os indivíduos vacinados, pois é discutido que anticorpos anti-PRN seriam responsáveis por facilitar a fagocitose das bactérias pelos fagócitos do hospedeiro (Nieves e Heininger, 2015). Cepas de *B. pertussis* PRN-negativas

já foram descritas, o que evidencia uma mutação genética que pode funcionar como um mecanismo de escape da fagocitose (Guiso *et al.*, 2014).

É esperado que RN que ultrapassem 35 semanas de gestação, apresentem concentração de anticorpos IgG mais elevada do que a de suas mães, revelando taxas de passagem transplacentária acima de 100% (Leuridan e van Damme, 2007). No entanto, muitos fatores podem afetar essa taxa e um deles consiste justamente na vacinação materna e, conseqüentemente, na concentração de anticorpos IgG específicos para os antígenos vacinais. Altas concentrações de anticorpos IgG em resposta a uma vacina estão relacionadas com uma reduzida taxa de transmissão para o feto (Englund e Glezen, 2003), provavelmente em decorrência do número limitado de receptores FcRn, o que leva à saturação desses receptores e uma menor transmissão de anticorpos para o RN (Englund, 2007; Macchiaverni *et al.*, 2011). Esse fato foi observado em nosso trabalho, para todos os antígenos específicos estudados, pois a taxa de passagem transplacentária de anticorpos foi menor no grupo caso. Além disso, as correlações inversas entre concentrações maternas de anticorpos e taxas de passagem para os RN evidenciadas para todos os antígenos, assim como para pertussis total, demonstram exatamente isso: quanto maior o nível de anticorpo materno, menor a transmissão para o RN. Em acordo com os nossos resultados, Raya e colaboradores (2014b) encontraram uma taxa de passagem de anticorpos IgG específicos para *B. pertussis* menor no grupo de gestantes vacinadas quando comparado com o grupo de gestantes não vacinadas. No entanto, embora o grupo caso apresente menor taxa de passagem, as concentrações de anticorpos no sangue de cordão umbilical de seus RN são maiores do que as encontradas no grupo controle. As correlações

entre concentrações de IgG anti-*B. pertussis*, anti-PT, anti-FHA e anti-PRN maternas e de seus respectivos RN, encontradas em nosso trabalho, completa essa informação, mostrando que os neonatos têm níveis de anticorpos compatíveis com os apresentados por suas mães. O mesmo resultado foi observado por Wanlapakorn e colaboradores (2018).

A semana gestacional em que a parturiente é imunizada também tem grande influência sobre a taxa de passagem transplacentária de anticorpos para o feto. Partindo do pressuposto de que a maior aquisição de anticorpos IgG pelo feto ocorre nas últimas quatro semanas de gestação e que um aumento nos níveis dessa imunoglobulina é visto a partir da 36ª semana de gestação (Saji *et al.*, 1999), a recomendação do Ministério da Saúde de que as gestantes sejam vacinadas até a 36ª semana de gestação se mostra muito eficiente, pois, levando-se em conta uma gestação a termo, haveria o tempo necessário para que ocorresse a passagem transplacentária desses anticorpos. No entanto, a administração da dTpa pode ocorrer até 20 dias antes da data provável do parto, o que poderia influenciar a passagem de anticorpos, fazendo com que os neonatos dessas gestantes apresentem níveis mais baixos de anticorpos IgG específicos, quando comparados aos RN de mães vacinadas mais precocemente.

Em nossa casuística, a grande maioria das gestantes foi vacinada no período recomendado, ou seja, entre a 27ª e 36ª semana de gestação. Nossos dados mostram que as gestantes que apresentam as maiores taxas de transferência de anticorpos IgG dirigidos para todos os antígenos de pertussis, são aquelas vacinadas entre a 26ª e 31ª semana de gestação. Este resultado corrobora com o trabalho realizado por Naidu e colaboradores (2016), que

mostrou que gestantes vacinadas no início do terceiro trimestre (28-32 semanas de gestação) apresentam maiores concentrações de anticorpos anti-PT, anti-FHA e anti-PRN em comparação às gestantes vacinadas no final do terceiro trimestre (33-36 semanas de gestação), comprovando que o maior tempo de exposição aos antígenos vacinais resultou em maiores concentrações de anticorpos específicos maternos e uma passagem transplacentária de anticorpos mais efetiva para os seus filhos. Ao analisar o intervalo de tempo entre o momento em que a gestante foi vacinada e o parto, observamos uma correlação positiva com a taxa de passagem transplacentária, o que também é um indicativo da importância da vacinação no período recomendado.

As gestantes vacinadas com mais de 37 semanas de gestação são as que apresentam menores taxas de passagem transplacentária de anticorpos para todos os antígenos específicos e também para a bactéria total e, assim, a proteção conferida ao RN nesses casos, seria somente pela estratégia de casulo, ou seja, evitando que a parturiente contraia a doença e transmita para seu filho nos primeiros dias de vida, o que também é uma prática muito utilizada e válida (Swamy e Wheeler, 2014). Em um estudo realizado no Reino Unido foi constatado que a incidência de coqueluche em RN reduz em 90% quando a gestante é vacinada pelo menos uma semana antes do parto (Dabrera *et al.*, 2014). Seguindo essa estratégia, alguns países recomendam a vacinação não somente da gestante, mas de todas as pessoas que mantenham contato próximo com o RN, como irmãos, avós e babás (Urwyler e Heininger, 2014). No entanto, para nosso país e outros países em

desenvolvimento, esta medida não é praticada em redes públicas, visto que envolveria um gasto muito maior para a saúde pública.

São poucos os dados encontrados na literatura referente aos anticorpos IgA específicos para *B. pertussis* no leite materno. Em nosso trabalho, as concentrações de IgA anti-*B. pertussis* nas amostras de colostro mostraram-se mais baixas no grupo caso. Esta diferença inesperada entre o grupo caso e controle, pode ser consequência do tempo de coleta do colostro após o parto, visto que a mediana de tempo diferiu entre os grupos (26,0 horas e 22,0 horas, respectivamente, $p < 0,0001$). A composição do leite materno sofre alterações ao longo de 3 períodos de lactação, definidos como colostro, leite de transição e leite maduro (Agarwal *et al.*, 2011; Ramírez-Santana *et al.*, 2012). Segundo a literatura, a concentração de SIgA no colostro é de, aproximadamente, 12 mg/ml e decai para 0,3 - 1 mg/ml no leite maduro (van de Perre, 2003). Quanto aos anticorpos IgA anti-PT não houve diferença significativa entre os grupos, o que difere dos dados de Raya e colaboradores (2014a), que observaram níveis de anticorpos IgA anti-PT e anti-FHA no colostro maiores no grupo imunizado comparado com o grupo não imunizado. Esses anticorpos permaneceram por até 8 semanas pós-parto, no entanto, houve um decaimento nos níveis ao longo do tempo, com ênfase no expressivo declínio durante as duas primeiras semanas após o parto. De Schutter e colaboradores (2015) também encontraram maiores níveis de anticorpos anti-PT em mulheres vacinadas durante a gestação e em mulheres vacinadas logo após o parto quando comparadas com gestantes vacinadas há, no mínimo, 5 anos antes do parto. Porém, mesmo que tenhamos encontrado trabalhos com resultados contradizentes, era esperado por nosso grupo que a vacina dTpa não

provocasse o aumento nas concentrações de anticorpos SIgA específicos. Vacinas capazes de despertar a produção dessa classe de anticorpo e, conseqüentemente, seu aumento no leite materno são aquelas administradas por via oral ou nasal e que induzem a resposta imunológica em sítios de mucosa, pois os anticorpos presentes na mama em lactação são produzidos por plasmócitos que preferencialmente migram do intestino e do trato respiratório (Pandolfi *et al.*, 2017; Saso e Kampmann, 2017).

Um estudo realizado, com o uso de macacos como modelo animal, há mais de 50 anos, já havia concluído que a proteção contra coqueluche seria melhor adquirida com a inoculação da bactéria viva, visto que com esse procedimento os macacos não eram reinfectados mediante uma inoculação subsequente (Huang *et al.*, 1962). Baseados nesta proposta, trabalhos recentes têm direcionado a atenção para o desenvolvimento de vacinas compostas por *B. pertussis* viva e atenuada por alterações genéticas, para ser administrada por via oral (Locht, 2016). Uma das vacinas proposta seria a BPZE1 e os testes clínicos de fase I, realizados com jovens do sexo masculino, demonstraram que a vacina foi segura e capaz de colonizar transitoriamente a nasofaringe, induzindo respostas de anticorpos IgG específicos nos indivíduos colonizados (Thorstensson *et al.*, 2014; Jahnmatz *et al.*, 2014).

Até o momento não foi estabelecido nenhum correlato de proteção após a vacinação para coqueluche, porém muitos trabalhos são realizados com esse objetivo. Um dos obstáculos encontrados consiste na presença de vários antígenos na formulação vacinal, o que se faz necessário o conhecimento da exata concentração com que cada anticorpo específico contribuiria para conferir a proteção ao indivíduo vacinado (Plotkin, 2010). Embora não seja um

consenso, é descrito que concentrações de anticorpos anti-PT maiores que 5 a 10 unidades de ELISA (UE) funcionem como um relevante indício de proteção (Plotkin, 2010). Assim, após a vacinação, a soroconversão contra PT poderia ser definida como concentrações de anticorpos anti-PT superiores a 5 UI/ml (equivalente a UE) para indivíduos que inicialmente apresentem concentrações inferiores a este valor e para aqueles que já apresentem concentrações pré-vacinais acima de 5 UI/ml seria necessário um aumento de, no mínimo, duas vezes o valor inicial (Gröndahl-Yli-Hannuksela *et al.*, 2016). Em nosso trabalho, não possuímos valores anteriores à vacinação que possibilitem este tipo de análise. Portanto, utilizando apenas a concentração <5 UI/ml como valor limiar, 52,5% das gestantes e 41,6% dos RN do grupo controle estariam propensos a adquirir coqueluche, enquanto no grupo caso apenas 7,6% das gestantes e dos RN. No entanto, vários outros valores de *cut-off* já foram propostos (Guiso *et al.*, 2011).

Visto que as concentrações de anticorpos tendem a cair ao longo dos anos seguintes à vacinação, porém crianças imunizadas se mantêm protegidas contra as formas graves de coqueluche, pode-se sugerir que células T e B de memória, em especial, as células T de memória efetora podem ser responsáveis por essa imunidade em longo prazo (Higgs *et al.*, 2012). As células T de memória efetora se ativariam prontamente e as células B de memória seriam capazes de responder em dias à nova estimulação antigênica, levando à sua rápida proliferação e diferenciação em células produtoras de anticorpos e, conseqüente aumento no nível de anticorpos protetores (Hendrikx *et al.*, 2011). Embora a maioria dos trabalhos que buscam estudar respostas celulares específicas para coqueluche concentram-se, principalmente, nas

células T CD4, a descrição de que a *B. pertussis* consiste em um patógeno intracelular facultativo trouxe grande atenção para a análise da participação de linfócitos T CD8. Dados reportados por Dirix e colaboradores (2012), em um trabalho realizado com a utilização de bloqueadores de MHC de classe I e II, indicam a participação de células T CD8 na resposta à infecção por *B. pertussis*. Com isso, optamos por incluir o estudo deste subtipo de linfócito T em nossos ensaios.

Como revelado pelos nossos ensaios de cultura celular, não foram observadas diferenças entre os grupos de RN para nenhum dos parâmetros estudados, contudo podemos afirmar que os neonatos responderam muito bem à estimulação com *B. pertussis*, exibindo maior expressão de marcadores de ativação e melhor proliferação de células T CD4 do que suas respectivas células não estimuladas. Algumas exceções à equiparidade visualizada entre os grupos foram a expressão de CD40L em CD4 e CD8 e a proliferação de células T CD4, que apresentaram porcentagens mais altas, porém não significativas no grupo caso, provavelmente devido ao número amostral. Esses resultados mostraram que os RN de gestantes vacinadas responderam igualmente bem ou até melhor do que aqueles do grupo controle. Receptores FcRn, responsáveis pelo transporte transplacentário de IgG, são susceptíveis à ligação de complexos imunes provenientes da circulação da materna, que resistem ao pH ácido do endossomo e, assim, alcançam a circulação fetal (Simister, 1998). Baseado nesse mecanismo é possível que a vacinação materna com pertussis gere o primeiro contato dos neonatos com os antígenos bacterianos, causando assim uma sensibilização das células imunes neonatais que, em um segundo contato com a bactéria total durante a estimulação ex

vivo, por exemplo, leve a uma resposta imunológica maior e, presumivelmente, mais eficiente.

Portanto, diferentemente da hipótese proposta por nós, os resultados encontrados indicam que a vacinação materna não prejudica a resposta imune celular específica dos seus filhos, ou seja, a presença de altos níveis de anticorpos maternos na circulação dos neonatos nascidos de gestantes vacinadas não seria responsável por gerar o fenômeno de mascaramento antigênico ou apenas geraria em níveis incapazes de alterar de forma significativa a resposta imune do RN frente ao estímulo com *B. pertussis*. Um ponto relevante consiste no fato de que se os anticorpos maternos não influenciam a resposta imune do RN logo após o parto, podemos supor que aos 2 meses, quando o neonato é vacinado, essa possível influência seria ainda menor, pois os níveis de anticorpos maternos decaem significativamente com o decorrer dos dias após o nascimento, sendo 36 dias a meia vida da imunoglobulina IgG anti-PT materna (Healy e Baker, 2007). No entanto, devemos levar em consideração que os trabalhos que mostram as interferências dos anticorpos maternos no momento da vacinação ativa do lactente relatam que esse quadro somente é revertido após a última dose da primeira série de vacinas ou após o primeiro *booster* (Hardy-Fairbanks *et al.*, 2013; Munoz *et al.*, 2014).

São muitos os mecanismos pelos quais poderia ocorrer a inibição da resposta vacinal de crianças em razão da presença de anticorpos maternos. Dentre eles, neutralização de vacinas virais vivas, onde a ligação do anticorpo materno impede a replicação viral e, conseqüentemente, níveis suficientes de antígenos para estimulação de células T e B dos lactentes; ligação de

complexos imunes (antígeno vacinal e anticorpo materno) com o receptor FcγRIIB, um regulador negativo que leva à inibição da ativação de células B neonatais; eliminação do antígeno vacinal opsonizado com anticorpos maternos por meio da fagocitose; mascaramento de antígenos vacinais com anticorpos maternos, gerando, assim, inibição da ativação de células B dos RN (Siegrist, 2003), este último o mais fortemente relacionado à vacina materna dTpa dentre todos os mecanismos citados (Mooi e Greeff, 2007).

É relatado que o fenômeno de mascaramento antigênico aconteça quando a gestante e o RN utilizam o mesmo tipo de vacina para coqueluche, principalmente as vacinas acelulares (Gerdtts *et al.*, 2016). Essa situação não ocorre no Brasil, pois a gestante é vacinada com a dTpa e seu filho com a vacina DTP. O estímulo com a bactéria total, utilizado em nossos ensaios, pode fornecer um diferente repertório antigênico a ser reconhecido pelas células dos RN. Assim sendo, a resposta imune celular do neonato seria despertada por antígenos diferentes daqueles que, até então, ele teve contato, ou seja, os três antígenos que compõem a vacina materna. Esta situação pode tornar irrelevante ou, no mínimo, menos significativo o mascaramento antigênico ocasionado pelos anticorpos maternos transferidos via passagem transplacentária, visto que esses anticorpos tem especificidade para os antígenos presentes na vacina dTpa.

A cooperação das células T e B durante o processo de apresentação de antígenos proteicos leva à expansão clonal dos linfócitos B, a mudança de classe das imunoglobulinas, geralmente para IgG1 e IgG3, a maturação de afinidade desses anticorpos e a diferenciação das células B em células de memória (Mesquita *et al.*, 2010). Em nosso trabalho, os resultados de

expressão de CD40 em células B indicam a ocorrência dessa interação, visto que foi possível observar maior expressão dessa molécula nas células B dos neonatos de ambos os grupos e também do grupo adulto, assim como foi observado o aumento na expressão de CD40L em células T, já citado anteriormente. Não podemos deixar de ressaltar que foi observada uma redução significativa na frequência de células B de adultos após 48 horas de cultura sem estímulo, que foi ainda mais acentuada nas células estimuladas com PHA e *B. pertussis*. Esse efeito foi observado para todos grupos e poderia influenciar nas frequências dessas células expressando o marcador CD40.

A estimulação dos linfócitos com o componente PHA (controle positivo) trouxe bons resultados de proliferação celular, principalmente, para os grupos de neonatos. A ativação e expansão clonal das células T requer a apresentação do antígeno específico via moléculas de MHC presentes em células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *Antigen presenting cell*) bem como, sinais adicionais, que consistem na expressão de moléculas coestimuladoras e na presença de citocinas (Mesquita *et al.*, 2010). Ciente de que foi observado em nossos resultados, após a estimulação com *B. pertussis*, o aumento da expressão de CD40L, CD69 e CD40, pode-se pensar que a reduzida escala de proliferação em alguns grupos em resposta à bactéria decorra da baixa produção de IL-2 visualizada no sobrenadante de cultura de linfócitos de todos os grupos. De fato, os resultados das dosagens de IL-2 revelaram valores bem compatíveis com os de proliferação, mostrando concentrações maiores de IL-2 nos sobrenadantes de cultura das células que apresentaram maior proliferação e menores nas que proliferaram menos ou não proliferaram significativamente. As concentrações de IL-2 foram maiores

após estímulo com PHA em virtude desta molécula ser um estímulo policlonal (Wu *et al.*, 2017), enquanto o estímulo gerado pela bactéria é direcionado para clones específicos de células T. No entanto, essa teoria é falha quando observamos o grupo adulto, pois é possível constatar que após a estimulação com PHA houve uma relevante produção de IL-2, porém uma baixa proliferação dos linfócitos T CD4 e CD8 em relação aos neonatos. A menor produção de IL-2 e seus receptores (CD25, CD122 e CD132) em células de lactentes e crianças até 18 meses de idade comparado com células de sangue periférico de adultos é descrita na literatura (Zola *et al.*, 1998).

As citocinas também são extremamente importantes para direcionar o perfil de resposta imunológica (Rafhael *et al.*, 2015). Em resumo, a resposta imune de perfil Th1 dos neonatos foi menor que a dos adultos, com menores concentrações de TNF- α e IFN- γ após a estimulação com *B. pertussis*, enquanto a resposta Th2 foi preservada, com concentrações de IL-4, IL-10 e IL-6 semelhantes ou, até mesmo, mais elevadas. No entanto, embora a resposta de células T CD4 em RN e lactentes classicamente mostre uma mudança para um perfil Th2, Vermeulen e colaboradores (2010) demonstraram que a vacinação neonatal com a vacina acelular ou de células inteiras contra coqueluche induz uma resposta IFN- γ antígeno-específica, que é de grande importância para a resposta imune efetiva (Rowe *et al.*, 2000).

A marcação intracelular de IFN- γ revelou que os RN de ambos os grupos foram capazes de produzir esta citocina após a estimulação com *B. pertussis*. Foi visualizado um aumento na porcentagem de células T CD4 produtoras de IFN- γ , bem como, um aumento significativo da mediana, representada pelo MFI, de produção de IFN- γ em células T CD4 e T CD8 após

a estimulação com a bactéria, comparado com as respectivas células não estimuladas. Já a análise do IFN- γ nos sobrenadantes das culturas também mostrou valores significativamente mais altos após a estimulação com a bactéria, mas em uma escala consideravelmente menor, sendo que algumas amostras apresentaram valores indetectáveis. O motivo pelo qual foi possível uma melhor quantificação do IFN- γ intracelular não é claro, limitações da técnica aplicada, embora tenha sido realizada a padronização visando as melhores condições para a realização dos testes, podem justificar este acontecimento.

Os neonatos apresentaram menores níveis de IFN- γ no sobrenadante de cultura após a estimulação com *B. pertussis* ou com PHA, o que está em acordo com o descrito na literatura, ou seja, a conhecida capacidade reduzida destes indivíduos de secretar IFN- γ , quando comparados com crianças mais velhas e adultos (Vermeulen *et al.*, 2010). Este déficit da resposta imune celular dos RN pode ser explicado pela falta de células T de memória e uma imaturidade das células apresentadoras de antígenos, que possuem menor capacidade de produção de IL-12 (Mascart *et al.*, 2003). Comparando a marcação intracelular com a secreção de IFN- γ no sobrenadante, podemos inferir que os neonatos têm a capacidade de produção dessa citocina em níveis semelhantes aos dos adultos, no entanto secretam em concentrações muito inferiores.

Estudos com camundongos indicam que a infecção por *B. pertussis* leva a geração de linfócitos T reguladores (Treg), com especificidade de reconhecimento para a molécula FHA, que secretam IL-10 e, assim, levam a supressão de células Th1 (McGuirk *et al.*, 2002). A boa produção da citocina IL-

10 pelos neonatos e adultos também pode explicar a reduzida escala de produção de IFN- γ pelos linfócitos estimulados com *B. pertussis* em ambos os grupos de RN. Importante ressaltar que o grupo adulto apresentou níveis basais de secreção de IL-10 surpreendentemente altos, da mesma forma que a IL-6. A manipulação das células para a realização da cultura *in vitro*, por si só, pode induzir uma ativação celular e produção de citocinas, o que ficou mais evidenciado na cultura dos adultos, pois nesse caso, não se esperaria um aumento de citocinas em função do parto, como nos RN, e o aumento de IL-6 e IL-10 pode evidenciar a tentativa de contrabalancear uma resposta inflamatória com uma anti-inflamatória.

O estímulo com *B. pertussis* gerou uma grande produção de TNF- α para todos os grupos. Essa citocina induz a produção de quimiocinas e provoca o aumento da expressão de moléculas de adesão em leucócitos, o que facilita o extravasamento dessas células para os tecidos, além de estimular o *burst* oxidativo, degranulação e atividade bactericida. O TNF- α parece limitar o acúmulo de leucócitos e a resistência nas vias aéreas de camundongos infectados com *B. pertussis*, causando infecções moderadas. Camundongos TNF- α *knockout* foram incapazes de reduzir o número de bactérias e, conseqüentemente, o influxo de leucócitos nos pulmões, não sobrevivendo à infecção (Wolfe *et al.*, 2007). Essa ação provocada pelo TNF- α seria relevante considerando que uma das principais causas de morte de RN após contrair coqueluche consiste na hipertensão pulmonar (Paddock *et al.*, 2008). A vasoconstrição das vias áreas e o intenso recrutamento leucocitário nos pulmões de indivíduos infectados são provocados pela presença da PT (Rocha *et al.*, 2015). É provável que o TNF- α atue aumentando a capacidade dos

neutrófilos de fagocitar as bactérias e, assim, reduzindo a disponibilidade da toxina no microambiente.

Em nosso trabalho não foi observada resposta de células Th17 após a estimulação das células, com exceção do estímulo com PHA para o grupo adulto, que levou a concentrações mais altas da citocina IL-17A, principal citocina produzida por este subtipo de linfócitos T (Iwakura *et al.*, 2008). Este resultado não era esperado, visto que a descrição de que células Th17 desempenham um papel importante na imunidade de mucosas, especialmente para patógenos respiratórios, trouxe grande atenção para o estudo da participação dessas células na proteção contra coqueluche (Dubin e Kolls, 2008). Após a vacinação de camundongos com a vacina de células totais para coqueluche, a ligação do lipooligossacarídeo (LOS) com o receptor TLR4, presentes em células dendríticas, foi capaz de induzir a produção de IL-23 e gerar a expansão de células Th17, assim como observado na infecção por *B. pertussis*. A IL-17 ainda é capaz de aumentar a atividade antibacteriana de macrófagos, visto que após a infecção de camundongos com *B. pertussis* foi possível visualizar um aumento na expressão do receptor de IL-17 em macrófagos localizados nos pulmões dos animais infectados (Higgins *et al.*, 2006).

A comparação de parte do nosso trabalho, especificamente, o estudo da resposta celular dos RN frente à estimulação com *B. pertussis*, com o encontrado na literatura sofre algumas limitações. A maioria dos trabalhos publicados busca a avaliação da resposta imune celular utilizando células mononucleares do sangue periférico estimuladas com PT purificada (Mascart *et al.*, 2007; Dirix *et al.*, 2012; Carollo *et al.*, 2012; Palazzo *et al.*, 2016). Como um

dos nossos objetivos foi estudar o possível mascaramento antigênico, provocado pela presença de anticorpos maternos na circulação fetal, optamos por realizar as culturas utilizando amostras de sangue total de cordão umbilical. Somado a isso, a escolha de utilizar como estímulo a bactéria *B. pertussis*, íntegra e inativada, é justificada por esta suspensão bacteriana ser, exatamente, parte da composição da vacina DTP, ainda utilizada para vacinação dos lactentes aos 2 meses de idade no Brasil. Dessa forma, seria possível mimetizar, com maior precisão, o microambiente que, presumivelmente, seria encontrado quando estes RN fossem vacinados pela primeira vez. Uma deficiência do experimento *ex vivo* proposto que deve ser considerada consiste no fato de que do nascimento até o momento da vacinação aos 2 meses, o sistema imunológico do lactente passará por processos de maturação que não podem ser reproduzidos (Goenka e Kollmann, 2015). No entanto, a dificuldade de realizar coletas de amostras de crianças saudáveis, torna relevante abordagens como a realizada por nosso grupo.

Nossos resultados, em conjunto, revelam que a vacinação com pertussis durante a gestação induz um significativo aumento nas concentrações de anticorpos específicos dirigidos a todos os antígenos nas mães e, consequentemente, nos RN. Esses anticorpos não promoveram o mascaramento do antígeno após estímulo dos linfócitos neonatais *ex vivo* com *B. pertussis*, pois os RN responderam ao estímulo com boa expressão de CD40L e CD69 em linfócitos T e CD40 em linfócitos B e boa produção de IFN- γ . Podemos afirmar ainda que neonatos do grupo caso apresentam uma tendência a uma maior resposta imunológica após o estímulo com a bactéria,

sugerindo que, possivelmente, a vacinação materna seja responsável por estimular as células T e B neonatais intraútero.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. Gestantes imunizadas com a vacina dTpa e seus respectivos RN apresentam níveis mais elevados de anticorpos IgG séricos dirigidos a *Bordetella pertussis* em relação as parturientes não imunizadas e seus RN, porém a taxa de passagem transplacentária foi significativamente menor.
2. Os níveis de anticorpos IgA secretores anti-*Bordetella pertussis* e anti-PT no colostro não foram afetados pelo estado vacinal da parturiente.
3. Os RN de ambos os grupos responderam ao estímulo com *Bordetella pertussis*, com grande expressão de CD40L, CD69 e proliferação de células T CD4, em comparação às células não estimuladas; porém apresentaram menor resposta Th1, enquanto a resposta Th2 se manteve preservada em comparação com os adultos. Não foram observadas diferenças em nenhum dos parâmetros estudados entre neonatos nascidos de gestantes vacinadas ou não com dTpa, sugerindo que a presença de altos níveis de anticorpos maternos específicos para pertussis na circulação de neonatos de gestantes vacinadas não foi responsável por gerar o fenômeno de mascaramento antigênico.

BIBLIOGRAFIA

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal S, Karmaus W, Davis S, Gangur V. Immune markers in breast milk and fetal and maternal body fluids: A systematic review of perinatal concentrations. *J Hum Lact.* 2011;27(2):171-86.

Allen AC, Mills KH. Improved pertussis vaccines based on adjuvants that induce cell-mediated immunity. *Expert Rev Vaccines.* 2014;13(10):1253-64.

Boulton J. The UK pertussis epidemic: implications for immunisation. *Br J Nurs.* 2013;22(18):1046-50.

Carbonetti NH. Contribution of pertussis toxin to the pathogenesis of pertussis disease. *Pathog Dis.* 2015;73(8):ftv073.

Carollo M, Palazzo R, Bianco M, Smits K, Mascart F, Ausiello CM. Antigen-specific responses assessment for the evaluation of *Bordetella pertussis* T cell immunity in humans. *Vaccine.* 2012;30:1667-74.

Cherry JD. Epidemic Pertussis in 2012 — The resurgence of a vaccine-preventable disease. *N Engl J Med.* 2012;367(9):785-7.

Chiappini E, Stival A, Galli L, Martino M. Pertussis re-emergence in the post-vaccination era. *BMC Infect Dis.* 2013;13(151):1-12.

Dabrera G, Amirthalingam G, Andrews N, Campbell H, Ribeiro S, Kara E, Fry NK, Ramsay M. A case-control study to estimate the effectiveness of maternal pertussis vaccination in protecting newborn infants in England and Wales, 2012-2013. *Clin Infect Dis.* 2015;60(3):333-7.

De Schutter S, Maertens K, Baerts L, De Meester I, Van Damme P, Leuridan E. Quantification of vaccine-induced antipertussis toxin secretory IgA antibodies in breast milk: comparison of different vaccination strategies in women. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34(6):e149-52.

Denkinger CM, Denkinger MD, Forsthuber TG. Pertussis toxin-induced cytokine differentiation and clonal expansion of T cells is mediated predominantly via costimulation. *Cell Immunol.* 2007;246(1):46-54.

Dirix V, Verscheure V, Vermeulen F, De Schutter I, Goetghebuer T, Locht C, Mascart F. Both CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes participate in the IFN- γ response to filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis* in infants, children, and adults. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:795958.

Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev.* 2008;226:160-71.

Eberhardt CS, Blanchard-Rohner G, Lemaître B, Boukrid M, Combescure C, Othenin-Girard V, Chilin A, Petre J, de Tejada BM, Siegrist CA. Maternal

immunization earlier in pregnancy maximizes antibody transfer and expected infant seropositivity against pertussis. *Clin Infect Dis*. 2016;62(7):829-36.

Englund JA, Glezen WP. Maternal immunization with *Haemophilus influenza* type b vaccines in different populations. *Vaccine*. 2003;21(24):3455-9.

Englund JA. The influence of maternal immunization on infant immune responses. *J Comp Path*. 2007;137:S16-9.

Ercan TE, Sonmez C, Vural M, Erginoz E, Torunoglu MA, Perk Y. Seroprevalance of pertussis antibodies in maternal and cord blood of preterm and term infants. *Vaccine*. 2013;31:4172-6.

Faucette AN, Unger BL, Gonik B, Chen K. Maternal vaccination: moving the science forward. *Hum Reprod Update*. 2015;21(1):119-35.

Fedele G, Bianco M, Ausiello CM. The virulence factors of *Bordetella pertussis*: talented modulators of host immune response. *Arch Immunol Ther Exp*. 2013;61:445-57.

Feunou PF, Bertout J, Locht C. T- and B-cell-mediated protection induced by novel, live attenuated pertussis vaccine in mice. Cross protection against parapertussis. *PLoS One*. 2010; 5(4):e10178.

Gabutti G, Azzari C, Bonanni P, Prato R, Tozzi AE, Zanetti A, Zuccotti G. Pertussis: current perspectives on epidemiology and prevention. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11(1):108-17.

Gall SA, Myers J, Pichichero M. Maternal immunization with tetanus-diphtheria-pertussis vaccine: effect on maternal and neonatal serum antibody levels. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;204(4):334.e1-5.

Gerdtz V, van Drunen Littel-van den Hurk S, Potter A. Protection of neonates and infants by maternal immunization. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(11):1347-9.

Goenka A, Kollmann TR. Development of immunity in early life. *J Infect*. 2015;71 Suppl 1:S112-20.

Gröndahl-Yli-Hannuksela K, Kauko L, Van Der Meeren O, Mertsola J, He Q. Pertussis specific cell-mediated immune responses ten years after acellular pertussis booster vaccination in young adults. *Vaccine*. 2016;34(3):341-9.

Guiso N. *Bordetella pertussis*: why is it still circulating? *J Infect*. 2014;68:S119–24.

Guiso N, Berbers G, Fry NK, He Q, Riffelmann M, Wirsing von König CH; EU Pertstrain group. What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30(3):307-12.

Halperin BA, Morris A, MacKinnon-Cameron D, Mutch J, Langley JM, McNeil SA, MacDougall D, Halperin SA. Kinetics of the antibody response to tetanus-diphtheria-acellular pertussis vaccine in women of childbearing age and postpartum women. *Clin Infect Dis*. 2011;53(9):885-92.

Hanson LA, Silfverdal SA. The mother's immune system is a balanced threat to the foetus, turning to protection of the neonate. *Acta Paediatr*. 2009;98(2):221-8.

Hardy-Fairbanks AJ, Pan SJ, Decker MD, Johnson DR, Greenberg DP, Kirkland KB, Talbot EA, Bernstein HH. Immune responses in infants whose mothers received Tdap vaccine during pregnancy. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(11):1257-60.

Healy CM, Baker CJ. Maternal immunization. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26:945-8.

Healy CM. Vaccines in pregnant women and research initiatives. *Clin Obstet Gynecol*. 2012;55(2):474-86.

Hendrikx LH, Rond LGH, Öztürk K, Veenhoven RH, Sanders EAM, Berbers GAM, Buisman AM. Impact of infant and preschool pertussis vaccinations on memory B-cell responses in children at 4 years of age. *Vaccine*. 2011;29(34):5725-30.

Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KH. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol*. 2006;177(11):7980-9.

Hewlett EL, Burns DL, Cotter PA, Harvill ET, Merkel TJ, Quinn CP, Stibitz ES. Pertussis pathogenesis-what we know and what we don't know. *J Infect Dis*. 2014;209(7):982-5.

Higgs R, Higgins SC, Ross PJ, Mills KH. Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol*. 2012;5(5):485-500.

Hoang HT, Leuridan E, Maertens K, Nguyen TD, Hens N, Vu NH, Caboré RN, Duong HT, Huygen K, Van Damme P, Dang AD. Pertussis vaccination during pregnancy in Vietnam: results of a randomized controlled trial Pertussis vaccination during pregnancy. *Vaccine*. 2016;34(1):151-9.

Hodder SL, Cherry JD, Mortimer EA Jr, Ford AB, Gornbein J, Papp K. Antibody responses to *Bordetella pertussis* antigens and clinical correlations in elderly community residents. *Clin Infect Dis*. 2000;31(1):7-14.

Huang CC, Chen PM, Kuo JK, Chiu WH, Lin ST, Lin HS, Lin YC. Experimental whooping cough. *N Engl J Med*. 1962;266:105-11.

Høiby N, Hertz JB, Andersen V. Cross-reactions between *Bordetella pertussis* and twenty-eight other bacterial species. *Acta Pathol Microbiol Scand B*. 1976;84B(6):395-400.

Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, Ishigame H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol Rev.* 2008;226:57-79.

Jahnmatz M, Amu S, Ljungman M, Wehlin L, Chiodi F, Mielcarek N, Loch C, Thorstensson R. B-cell responses after intranasal vaccination with the novel attenuated *Bordetella pertussis* vaccine strain BPZE1 in a randomized phase I clinical trial. *Vaccine.* 2014;32(27):3350-6.

Kilgore PE, Salim AM, Zervos MJ, Schmitt HJ. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(3):449-86.

Klein NP. Licensed pertussis vaccines in the United States: history and current state. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(9):2684-90.

Lambert LC. Pertussis vaccine trials in the 1990s. *J Infect Dis.* 2014;209(Suppl 1):S4-S9.

Leuridan E, Van Damme P. Passive transmission and persistence of naturally acquired or vaccine-induced maternal antibodies against measles in newborns. *Vaccine.* 2007;25(34):6296-304.

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

Locht C. Live pertussis vaccines: will they protect against carriage and spread of pertussis? *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(5):S96-S102.

Macchiaverni P, Arslanian C, Frazão JB, Palmeira P, Russo M, Verhasselt V, Condino-Neto A. Mother to child transfer of IgG and IgA antibodies against *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Scand J Immunol.* 2011;74(6):619-27.

Maertens K, Caboré RN, Huygen K, Vermeiren S, Hens N, Van Damme P, Leuridan E. Pertussis vaccination during pregnancy in Belgium: Follow-up of infants until 1 month after the fourth infant pertussis vaccination at 15 months of age. *Vaccine.* 2016;34(31):3613-9.

Maertens K, De Schutter S, Braeckman T, Baerts L, Van Damme P, De Meester I, Leuridan E. Breastfeeding after maternal immunisation during pregnancy: providing immunological protection to the newborn: a review. *Vaccine.* 2014;32(16):1786-92.

Malamitsi-Puchner A, Protonotariou E, Boutsikou T, Makrakis E, Sarandakou A, Creatsas G. The influence of the mode of delivery on circulating cytokine concentrations in the perinatal period. *Early Hum Dev.* 2005;81(4):387-92.

Mascart F, Hainaut M, Peltier A, Verscheure V, Levy J, Loch C. Modulation of the infant immune responses by the first pertussis vaccine administrations. *Vaccine.* 2007;25(255):391-8.

Mascart F, Verscheure V, Malfroot A, Hainaut M, Piérard D, Temerman S, Peltier A, Debie AS, Levy J, Del Giudice G, Locht C. *Bordetella pertussis* infection in 2-month-old infants promotes type 1 T cell responses. *J Immunol*. 2003;170(3):1504-9.

Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(2):326-82.

McGuirk P, McCann C, Mills KH. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med*. 2002;195(2):221.

Melvin JA, Scheller EV, Miller JF, Cotter PA. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12:274-88.

Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Cruvinel WM, Andrade LEC, Silva NP. Sistema imunitário – parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reumatol*. 2010;50(5):552-80.

Mills KHG. Immunity to *Bordetella pertussis*. *Microbes Infect*. 2001;3:655-77.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações. Informe técnico para implantação da vacina adsorvida difteria, tétano e coqueluche (pertussis acelular) tipo adulto – DTPa. Brasília: Ministério da Saúde, 2014;1-22.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico-coqueluche no Brasil: análise da situação epidemiológica de 2010 a 2014: Ministério da Saúde. 2015;46(39):1-8.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico-coqueluche no Brasil: situação epidemiológica da coqueluche, Brasil, 2015: Ministério da Saúde. 2016;47(32):1-9.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica: Ministério da Saúde. 2009;7:1-816.

Misiak A, Leuzzi R, Allen AC, Galletti B, Baudner BC, D'Oro U, O'Hagan DT, Pizza M, Seubert A, Mills KHG. Addition of a TLR7 agonist to an acellular pertussis vaccine enhances Th1 and Th17 responses and protective immunity in a mouse model. *Vaccine*. 2017;35(39):5256-63.

Miyaji Y, Otsuka N, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K. Genetic Analysis of *Bordetella pertussis* Isolates from the 2008–2010 Pertussis Epidemic in Japan. *Plos One*. 2013;8(10):1-8.

Mooi FR, de Greeff SC. The case for maternal vaccination against pertussis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(9):614-24.

Munoz FM, Bond NH, Maccato M, Pinell P, Hammill HA, Swamy GK, Walter EB, Jackson LA, Englund JA, Edwards MS, Healy CM, Petrie CR, Ferreira J, Goll JB, Baker CJ. Safety and immunogenicity of tetanus diphtheria and acellular pertussis (Tdap) immunization during pregnancy in mothers and infants: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2014;311(17):1760-9.

Naidu MA, Muljadi R, Davies-Tuck ML, Wallace EM, Giles ML. The optimal gestation for pertussis vaccination during pregnancy: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215(2):237.e1-6.

Nieves DJ, Heininger U. *Bordetella pertussis*. *Microbiol Spectr*. 2016;4(3).

Paddock CD, Sanden GN, Cherry JD, Gal AA, Langston C, Tatti KM, Wu KH, Goldsmith CS, Greer PW, Montague JL, Eliason MT, Holman RC, Guarner J, Shieh WJ, Zaki SR. Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin Infect Dis*. 2008;47(3):328-38.

Palazzo R, Carollo M, Bianco M, Fedele G, Schiavoni I, Pandolfi E, Villani A, Tozzi AE, Mascart F, Ausiello CM. Persistence of T-cell immune response induced by two acellular pertussis vaccines in children five years after primary vaccination. *New Microbiol*. 2016;39(1):35-47.

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

Pandolfi E, Gesualdo F, Carloni E, Villani A, Midulla F, Carsetti R, Stefanelli P, Fedele G, Tozzi AE; Pertussis Study Group. Does breastfeeding protect young infants from pertussis? case-control study and immunologic evaluation. *Pediatr Infect Dis J*. 2017;36(3):e48-e53.

Peake E, McGuire LK. The growing global pertussis problem. *J Christ Nurs*. 2014;31(3):152-8:quiz159-60.

Plotkin SA. Correlates of Protection Induced by Vaccination. *Clin Vaccine Immunol*. 2010; 17(7): 1055-65.

Protonotariou E, Chrelas C, Kassanos D, Kapsambeli H, Trakakis E, Sarandakou A. Immune response parameters during labor and early neonatal life. *In Vivo*. 2010;24(1):117-23.

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.

Ramírez-Santana C, Pérez-Cano FJ, Audí C, Castell M, Moretones MG, López-Sabater MC, Castellote C, Franch A. Effects of cooling and freezing storage on the stability of bioactive factors in human colostrum. *J Dairy Sci*. 2012;95(5):2319-25

Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. 2015;74(1): 5-17.

Raya BA, Srugo I, Kessel A, Peterman M, Bader D, Gonen R, Bamberger E. The effect of timing of maternal tetanus, diphtheria, and acellular pertussis (Tdap) immunization during pregnancy on newborn pertussis antibody levels – A prospective study. *Vaccine*. 2014b;32(44):5787-93.

Raya BA, Srugo I, Kessel A, Peterman M, Bader D, Peri R, Ashtamker N, Gonen R, Bamberger E. The induction of breast milk pertussis specific antibodies following gestational tetanus–diphtheria–acellular pertussis vaccination. *Vaccine*. 2014a;(32):5632-7.

Rocha G, Soares P, Soares H, Pissarra S, Guimarães H. Pertussis in the newborn: certainties and uncertainties in 2014. *Paediatr Respir Rev*. 2015;16(2):112-8.

Ross PJ, Sutton CE, Higgins S, Allen AC, Walsh K, Misiak A, Lavelle EC, McLoughlin RM, Mills KH. Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to *Bordetella pertussis*: towards the rational design of an improved acellular pertussis vaccine. *PLoS Pathog*. 2013;9(4):e1003264.

Rowe J, Macaubas C, Monger TM, Holt BJ, Harvey J, Poolman JT, Sly PD, Holt PG. Antigen-specific responses to diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine in human infants are initially Th2 polarized. *Infect Immun*. 2000;68(7):3873-7.

Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Koyama M. Dynamics of immunoglobulins at the feto-maternal interface. *Rev Reprod*. 1999;4(2):81-9.

Saso A, Kampmann B. Vaccine responses in newborns. *Semin Immunopathol*. 2017;39(6): 627-42.

Schure RM, Hendrikx LH, Rond LGH, Oztürk K, Sanders EAM, Berbers GAM, Buismana AM. T-Cell responses before and after the fifth consecutive acellular pertussis vaccination in 4-year-old dutch children. *Clin Vaccine Immunol*. 2012; 19(11):1879-86.

Shapiro ED. Acellular vaccines and resurgence of pertussis. *JAMA*. 2012;308(20):2149-50.

Siegrist CA. Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: review of hypotheses and definition of main determinants. *Vaccine*. 2003;21(24):3406-12.

Simister NE. Human placental Fc receptors and the trapping of immune complexes. *Vaccine*. 1998;16(14-15):1451-5.

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

Sizaire V, Garrido-Esteba M, Masa-Calles J, Martinez de Aragon MV. Increase of pertussis incidence in 2010 to 2012 after 12 years of low circulation in Spain. *Euro Surveill.* 2014;19(32):1-8.

Smits K, Pottier G, Smet J, Dirix V, Vermeulen F, Schutter I, Carollo M, Locht C, Ausiello CM, Mascart F. Different T cell memory in preadolescents after whole-cell or acellular pertussis vaccination. *Vaccine.* 2014;32:111-8.

Swamy GK, Wheeler SM. Neonatal pertussis, cocooning and maternal immunization. *Expert Rev Vaccines.* 2014;13(9):1107-14.

Thorstensson R, Trollfors B, Al-Tawil N, Jahnmatz M, Bergström J, Ljungman M, Törner A, Wehlin L, Van Broekhoven A, Bosman F, Debie AS, Mielcarek N, Locht C. A phase I clinical study of a live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine--BPZE1; a single centre, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of BPZE1 given intranasally to healthy adult male volunteers. *PLoS One.* 2014;9(1):e83449.

Urwyler P, Heininger U. Protecting newborns from pertussis – the challenge of complete cocooning. *BMC Infect Dis.* 2014;14:397.

Van de Perre P. Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine.* 2003;21:3374-6.

Vatansever Ü, Çöplü N, Öner N, Sönmez C, Karasalihoglu S, Kurtoglu D, Esen B, Ekuklu G. Seroprevalance of *Bordetella pertussis* antibodies among healthy adolescent girls in Edirne. *Swiss Med Wkly.* 2005;35:531-6.

Vermeulen F, Verscheure V, Damis E, Vermeylen D, Leloux G, Dirix V, Locht C, Mascart F. Cellular immune responses of preterm infants after vaccination with whole-cell or acellular pertussis vaccines. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(2):258-62.

Wanlapakorn N, Maertens K, Chaithongwongwatthana S, Srimuan D, Suratannon N, Vongpunsawad S, Mai Phuong Tran T, Hens N, Van Damme P, Locht C, Poovorawan Y, Leuridan E. Assessing the reactogenicity of Tdap vaccine administered during pregnancy and antibodies to *Bordetella pertussis* antigens in maternal and cord sera of Thai women. *Vaccine.* 2018;36(11):1453-9.

Wanlapakorn N, Thongmee T, Vichaiwattana P, Leuridan E, Vongpunsawad S, Poovorawan Y. Antibodies to *Bordetella pertussis* antigens in maternal and cord blood pairs: a Thai cohort study. *PeerJ.* 2017;5:e4043.

Warfel JM, Beren J, Merkel TJ. Airborne transmission of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis.* 2012;206:902-6.

Winter K, Harriman K, Zipprich J, Schechter R, Talarico J, Watt J, Chavez G. California pertussis epidemic, 2010. *J Pediatr.* 2012;161:1091-6.

Wolfe DN, Mann PB, Buboltz AM, Harvill ET. Delayed role of tumor necrosis factor- α in overcoming the effects of pertussis toxin. *J Infect Dis*. 2007;196(8):1228-36.

Wood N, McIntyre P, Marshall H, Robertson D. Acellular pertussis vaccine at birth and one month induces antibody responses by two months of age. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(3):209-15.

World Health Organization. Pertussis vaccines - WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 2010;85:385-400.

World Health Organization. Vaccine-preventable disease monitoring system. Global and regional immunization profile - Region of the Americas. 2016. Disponível em: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/data/ga_amrprofile.pdf

Wu SF, Chang CB, Hsu JM, Lu MC, Lai NS, Li C, Tung CH. Hydroxychloroquine inhibits CD154 expression in CD4⁺ T lymphocytes of systemic lupus erythematosus through NFAT, but not STAT5, signaling. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):183.

Yektaei-Karin E, Moshfegh A, Lundahl J, Berggren V, Hansson L-O, Marchini G. The stress of birth enhances in vitro spontaneous and IL-8-induced neutrophil chemotaxis in the human newborn. *Pediatr Allergy Immunol*. 2007;18:643-51

Zlamy M. Rediscovering Pertussis. *Front Pediatr*. 2016;4:52.

Zola H, Ridings J, Elliott S, Nobbs S, Weedon H, Wheatland L, Haslam R, Robertson D, Macardle PJ. Interleukin 2 receptor regulation and IL-2 function in the human infant. *Hum Immunol*. 1998;59(10):615-24.

APÉNDICES

Características individuais e descrição dos resultados de anticorpos das mães e recém-nascidos do Grupo Caso

Nº M/RN	IG dTpa (sem)	Id Mãe (anos)	Tipo Parto	IG (sem)	Peso RN (g)	Coleta colostró (h)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	Total (mg/ml)	Anti-Bp (UA)	Anti-PT (UI)
							IgG Total (mg/dl)	IgG anti Bp (UA/ml)			IgG anti-PT (UI/ml)			IgG anti-FHA (UI/ml)			IgG anti-PRN (UI/ml)			IgA				
MP/P1	32	37	C	38 4/7	2550	26	959	1474	154	5034,98	4985,64	99	1,95	3,14	161	346,19	443,59	128	2705,77	2993,43	111	44,97	7667,11	387,11
MP/P2	35	38	C	38 4/7	3230	29	636	840	132	930,10	643,49	69	61,60	46,23	75	222,43	159,59	72	613,04	234,73	38	63,94	15636,37	110,65
MP/P3	35	28	C	37 0/7	3530	23	718	682	95	324,06	85,94	27	12,30	3,81	31	1552,68	191,81	12	134,68	18,34	14	25,42	742,14	16,45
MP/P5	34	26	C	39 4/7	2700	24	816	1031	126	933,65	1559,64	167	106,87	85,96	80	600,62	723,73	120	48,87	48,72	100	57,32	11831,40	70,94
MP/P6	36	18	N	39 0/7	3095	27	905	1255	139	2176,44	1393,18	64	175,17	142,92	82	198,63	174,59	88	1934,91	623,28	32	159,47	9494,41	95,41
MP/P8	36	30	N	40 0/7	3445	18	616	812	132	690,39	163,06	24	104,12	17,06	16	326,28	77,81	24	624,40	104,93	17	42,81	10604,34	55,50
MP/P9	30	22	N	37 5/7	3140	20	709	1171	165	333,98	458,53	137	34,90	67,53	194	958,09	1643,74	172	158,08	282,66	179	66,36	14585,62	246,22
MP/P10	29	18	C	39 6/7	3960	34	875	1123	128	2265,57	1582,44	70	122,19	134,12	110	282,55	243,33	86	28,76	195,38	679	31,13	2426,41	32,44
MP/P11	39	21	C	41 0/7	3290	S/A	919	1068	116	1652,63	696,36	42	324,74	63,94	20	4437,55	466,61	11	1730,15	218,84	13	S/A	S/A	S/A
MP/P12	33	35	N	39 0/7	3960	29	1137	847	74	2863,42	1183,67	41	299,03	187,51	63	1853,13	1229,11	66	841,26	480,45	57	45,14	3702,05	61,45
MP/P13	34	35	N	39 0/7	3450	25	997	1220	122	182,07	198,27	109	74,51	109,36	147	209,56	261,13	125	2,88	2,99	104	19,62	1248,97	49,89
MP/P14	31	29	C	40 1/7	2720	32	775	824	106	326,88	310,05	95	4,22	5,45	129	188,02	176,71	94	38,85	64,67	166	84,82	9659,23	323,68
MP/P15	30	32	C	37 6/7	3245	26	775	702	91	470,12	260,69	55	57,94	37,52	65	398,69	346,34	87	96,71	56,66	59	135,99	8590,98	182,67
MP/P16	35	28	C	40 0/7	2940	24	1014	1326	131	597,72	750,66	126	124,37	166,31	134	939,51	1302,13	139	240,13	421,66	176	68,73	10811,78	186,39
MP/P17	34	35	C	39 0/7	3025	24	924	926	100	1038,18	987,73	95	137,69	101,97	74	129,77	155,94	120	339,94	265,21	78	231,93	12614,95	479,04
MP/P18	32	35	C	38 1/7	2755	24	1129	1250	111	6280,72	5125,58	82	293,93	461,25	157	506,54	685,56	135	4939,79	3919,57	79	46,83	21422,91	401,35
MP/P19	34	30	C	38 4/7	3460	26	914	914	100	472,80	764,86	162	56,21	61,70	110	4073,26	3350,87	82	42,16	36,97	88	35,84	3305,78	46,47
MP/P20	31	29	C	39 1/7	3620	26	918	1159	126	503,32	370,85	74	8,26	7,60	92	463,40	361,83	78	74,39	87,02	117	35,21	4150,80	104,13
MP/P21	35	34	C	37 6/7	4040	50	648	735	113	1487,63	1368,79	92	64,97	31,67	49	175,77	56,84	32	457,06	220,85	48	16,94	3479,56	68,69
MP/P22	32	21	C	39 0/7	3440	25	1151	904	79	713,28	518,52	73	75,67	69,18	91	104,69	149,84	143	303,25	275,39	91	15,38	967,96	71,73
MP/P23	30	33	N	39 2/7	3490	23	993	1180	119	446,43	817,51	183	69,13	61,42	89	263,05	406,84	155	144,89	156,34	108	26,06	938,27	76,36
MP/P24	37	22	C	40 3/7	3170	24	1167	1499	128	10151,25	10114,70	100	241,24	211,46	88	516,89	690,89	134	6242,94	5036,38	81	92,74	5017,96	231,56
MP/P25	36	18	N	39 2/7	2370	36	912	866	95	12475,26	5704,98	46	145,93	62,70	43	2597,69	908,42	35	5001,37	1949,78	39	54,99	3382,71	184,06
MP/P26	27	30	C	37 6/7	3395	50	795	612	77	583,12	656,63	113	14,31	18,28	128	85,66	125,73	147	170,75	163,41	96	65,85	3384,66	137,37
MP/P27	29	34	C	38 4/7	3595	23	810	958	118	588,55	589,51	100	45,21	61,96	137	2157,91	2239,08	104	115,76	138,11	119	29,44	3833,73	32,50
MP/P28	32	22	C	39 0/7	4040	38	818	824	101	2661,84	2174,96	82	80,78	77,49	96	208,17	291,21	140	340,79	359,01	105	44,53	3691,82	111,99
MP/P29	29	24	N	39 0/7	3880	24	890	1276	143	4602,24	6915,16	150	30,76	48,08	156	194,69	275,53	142	2425,95	3504,25	144	19,72	2218,88	135,89
MP/P31	38	18	N	40 0/7	2530	24	1290	990	77	272,21	102,48	38	18,83	3,19	17	1591,83	175,77	11	57,64	15,47	27	43,52	5498,83	135,45
MP/P32	32	28	C	38 4/7	3415	25	922	1068	116	3788,98	2489,87	66	79,01	112,42	142	817,30	917,88	112	3642,86	3596,13	99	131,83	9606,82	442,45
MP/P34	35	28	N	39 2/7	3240	S/A	941	806	86	945,12	1651,70	175	94,27	13,05	14	93,63	779,99	833	60,55	285,65	472	S/A	S/A	S/A
MP/P35	34	31	C	39 5/7	2545	29	953	977	103	868,32	1302,62	150	75,89	114,18	150	339,64	374,49	110	222,16	416,85	188	53,24	1993,09	245,55
MP/P36	31	26	N	39 2/7	3930	22	959	1013	106	3387,10	5079,65	150	234,03	403,77	173	1207,96	1877,37	155	2676,83	2373,54	89	47,53	1955,58	96,26
MP/P38	36	19	N	40 3/7	3195	28	1476	1187	80	369,91	296,09	80	210,32	117,79	56	681,79	431,36	63	83,24	43,15	52	19,52	729,41	6,80
MP/P40	29	32	C	38 5/7	3175	84	943	845	90	449,56	444,89	99	62,35	81,07	130	97,32	132,78	136	308,46	355,84	115	13,60	512,86	37,67
MP/P41	36	34	C	42 3/7	3885	24	1196	1120	94	5200,38	3472,97	67	75,82	54,16	71	689,28	317,19	46	4697,44	2953,48	63	31,34	7107,62	51,96
MP/P42	36	35	C	39 0/7	3180	24	678	603	89	58,81	42,36	72	112,15	46,86	42	84,16	79,94	95	9,14	6,60	72	76,77	2677,72	103,62
MP/P43	33	18	N	40 0/7	3230	23	699	1159	166	1308,51	1438,69	110	31,48	68,24	217	25,48	50,42	198	460,58	1012,63	220	48,78	2471,49	158,36
MP/P44	33	35	C	38 4/7	3600	53	520	851	164	1139,23	978,73	86	77,61	68,37	88	398,11	238,38	60	705,87	550,42	78	122,06	7665,07	222,23
MP/P45	32	25	C	40 5/7	3525	26	1417	1254	88	2041,05	1251,03	61	243,75	319,32	131	741,34	540,71	73	841,25	363,20	43	45,56	4139,84	87,13
MP/P46	33	25	C	39 0/7	2425	23	892	1120	126	3941,50	5026,90	128	26,26	57,09	217	67,04	303,84	453	6054,69	9687,47	160	53,34	5453,15	181,58
MP/P47	34	27	N	39 2/7	3340	22	966	1170	121	104,51	132,85	127	47,19	56,48	120	890,67	1688,45	190	5,58	6,31	113	92,48	6775,16	469,77

Características individuais e descrição dos resultados de anticorpos das mães e recém-nascidos do Grupo Caso

Nº M/RN	IG dTpa (sem)	Id Mã (anos)	Tipo Parto	IG (sem)	Peso RN (g)	Coleta colostro (h)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	Total (mg/ml)	Anti-Bp (UA)	Anti-PT (UI)
							IgG Total (mg/dl)			IgG anti Bp (UA/ml)			IgG anti-PT (UI/ml)			IgG anti-FHA (UI/ml)			IgG anti-PRN (UI/ml)					
MP/P48	27	27	N	40 0/7	2900	25	1139	1370	120	100,29	114,04	114	0,35	0,62	179	6,41	4,80	75	0,88	1,12	127	134,31	9942,02	440,15
MP/P50	34	22	N	38 1/7	3095	26	854	954	112	82,59	97,40	118	36,66	33,07	90	142,13	107,74	76	38,77	31,22	81	69,50	4182,26	56,42
MP/P51	35	34	N	40 0/7	3140	26	913	1247	137	520,92	485,07	93	45,31	44,04	97	333,59	344,88	103	25,24	25,76	102	30,57	4811,16	107,95
MP/P52	34	35	C	39 0/7	2905	22	814	1004	123	940,33	912,37	97	89,20	88,32	99	104,33	102,10	98	340,97	339,71	100	98,57	11739,17	132,77
MP/P53	29	25	C	39 0/7	3670	72	836	722	86	1021,05	854,74	84	25,55	25,13	98	98,99	86,75	88	724,33	669,40	92	4,56	1431,87	6,56
MP/P54	34	32	C	40 0/7	3645	96	658	763	116	1596,68	1953,54	122	3,00	4,10	137	107,54	149,55	139	2225,58	2463,14	111	3,41	128,62	6,70
MP/P55	32	28	C	39 2/7	3360	36	991	1510	152	1774,32	1884,48	106	223,18	426,71	191	463,03	629,79	136	2365,58	4457,47	188	61,30	12167,29	181,90
MP/P56	35	24	C	40 5/7	3380	27	811	935	115	1535,65	976,67	64	92,37	75,86	82	689,25	850,27	123	292,64	230,46	79	18,51	2837,89	79,04
MP/P B	36	29	N	41 4/7	4580	38	804	905	62	1705,44	1342,09	79	143,64	170,28	119	1162,77	668,87	58	1678,58	1036,00	62	29,77	834,56	20,90
MP/P E	31	18	C	38 1/7	2580	49	1158	959	54	1831,75	1451,34	79	448,05	226,64	51	397,91	230,78	58	1718,28	923,06	54	94,86	6356,93	403,83
MP/P F	30	39	N	39 2/7	3140	25	1225	1331	104	1413,15	1498,76	106	7,86	10,74	137	220,70	330,74	150	1025,16	1067,84	104	46,44	6982,31	274,00
MP/P H	NI	25	N	39 5/7	2840	NI	830	962	83	457,03	349,64	77	187,16	147,56	79	1363,10	1166,34	86	119,51	99,58	83	42,80	3819,41	53,80
MP/P K	NI	15	N	38 3/7	3400	NI	1130	1390	111	1684,41	1367,20	81	72,36	68,53	95	79,33	120,29	152	164,35	182,46	111	250,62	11920,77	510,56
MP/P M	32	29	C	38 4/7	3470	NI	934	1152	121	1019,19	1035,11	102	65,51	95,49	146	2187,60	2717,77	124	326,30	394,13	121	133,54	4938,18	280,18
MP/P N	38	30	C	41 0/7	3615	NI	1046	1184	31	515,21	421,23	82	79,25	42,02	53	324,53	156,37	48	250,48	78,56	31	91,81	12537,72	948,19
MP/P O	37	22	C	40 6/7	4280	NI	826	1014	49	615,58	468,84	76	35,73	19,79	55	228,76	215,09	94	379,55	186,15	49	66,61	22194,93	1383,21
MP/P P	NI	20	C	41 2/7	3730	NI	1122	1192	142	2331,32	2233,03	96	4,15	5,31	128	57,65	92,57	161	7,42	10,55	142	70,36	2979,60	164,82
MP/P Q	28	23	C	39 2/7	3740	Def. IgA	1170	1677	39	718,25	336,02	47	53,19	42,47	80	223,63	653,16	292	317,77	123,21	39	Def. IgA	Def. IgA	Def. IgA
MP/P S	33	20	N	39 6/7	3050	NI	1055	1492	150	1767,24	2105,72	119	351,53	492,95	140	372,70	442,87	119	3886,06	5840,09	150	77,46	84584,88	712,71
MP/P U	24	36	C	39 0/7	3850	S/A	1286	988	106	383,94	410,66	107	24,75	27,92	113	293,90	299,27	102	77,16	81,89	106	S/A	S/A	S/A
MP/P V	33	27	N	39 6/7	3460	NI	1009	1389	140	1234,82	2189,00	177	574,19	870,62	152	1085,45	1088,69	100	752,51	1055,09	140	257,09	4476,21	221,21
MP/P X	31	30	N	37 1/7	3575	NI	916	1281	184	253,71	338,13	133	186,87	307,60	165	240,51	327,57	136	4,66	8,56	184	153,05	11735,54	158,92
MP/P W	33	20	N	39 2/7	3760	NI	647	1193	196	692,94	1029,93	149	31,24	61,96	198	107,73	261,54	243	286,57	562,96	196	45,30	3892,85	162,74
MP/P Z	30	23	N	38 1/7	3060	NI	1287	1174	39	2347,83	1764,29	75	380,89	179,99	47	1755,42	836,48	48	2234,26	871,19	39	29,66	3406,18	39,01
MP/PX5	31	16	C	40 1/7	3705	NI	1063	1298	180	220,27	185,51	84	27,98	48,10	172	94,48	172,09	182	1,49	2,68	180	92,80	4286,56	58,40

Abreviaturas: Nº, número; M, mãe; P, placenta; RN, recém-nascido; Id, idade; IG, idade gestacional; sem, semanas; g, gramas; h, horas; Bp, *Bordetella pertussis* ; PT, toxina pertussis; FHA, hemaglutinina filamentosa; PRN, pertactina; C, cesária; N, normal; NI, não informado; S/A, sem amostra; Def. IgA, deficiente de IgA.

Características individuais e descrição dos resultados de anticorpos das mães e recém-nascidos do Grupo Controle

Nº M/RN	Id Mãe (anos)	Tipo Parto	IG (sem)	Peso RN (g)	Coleta colostro (h)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	Total (mg/ml)	Anti-Bp (UA)	Anti-PT (UI)
						IgG Total (mg/dl)			IgG anti Bp (UA/ml)			IgG anti-PT (UI/ml)			IgG anti-FHA (UI/ml)			IgG anti-PRN (UI/ml)					
M/P3	21	C	39 0/7	3305	23	1532	1178	77	526,93	316,19	60	55,28	48,69	88	24,64	18,46	75	39,22	31,21	80	48,60	5632,69	52,77
M/P8	25	C	41 3/7	3645	22	1262	1166	92	92,04	52,53	57	0,56	0,56	101	5,53	6,24	113	3,03	2,67	88	104,97	29198,80	186,36
M/P9	20	N	38 5/7	3050	23	981	1086	111	247,42	237,08	96	3,00	3,13	104	17,98	26,54	148	8,99	8,61	96	55,79	26509,30	120,18
M/P13	22	N	41 6/7	3560	22	1069	1475	138	100,77	164,77	164	3,74	5,82	156	11,52	18,97	165	6,51	8,93	137	108,39	3969,59	110,06
M/P15	24	N	39 0/7	4155	22	1038	1240	119	151,15	225,06	149	0,91	3,78	413	6,95	15,14	218	3,67	5,15	140	57,24	8022,88	144,45
M/P16	23	N	40 4/7	3870	22	960	1253	131	562,33	372,67	66	9,76	15,19	156	6,99	13,26	190	7,28	10,52	144	87,35	13762,18	274,07
M/P17	34	C	40 6/7	3775	23	1306	1643	126	228,78	448,75	196	11,58	27,51	238	12,36	24,90	201	3,28	8,07	246	62,81	41783,05	140,79
M/P19	20	N	37 0/7	3010	24	1062	1340	126	265,30	277,91	105	0,71	1,01	144	35,64	55,98	157	5,93	6,66	112	51,33	3122,80	148,82
M/P29	31	N	40 0/7	3784	19	1231	1346	109	235,28	155,70	66	6,40	51,40	803	2,75	57,85	2101	1,67	93,85	5611	75,09	6696,14	165,79
M/P32	27	N	40 6/7	4868	24	723	835	115	161,98	239,61	148	1,00	1,25	126	13,19	14,60	111	3,45	4,58	133	90,17	6102,42	232,08
M/P33	25	N	36 1/7	3222	18	1223	1137	93	98,88	106,44	108	0,47	0,48	102	72,92	45,28	62	3,04	1,88	62	29,38	2682,53	45,91
M/P40	28	N	37 1/7	2700	22	1038	1198	115	864,38	671,59	78	1,52	2,02	133	153,64	251,47	164	22,45	35,14	157	72,92	5340,24	82,19
M/P41	21	N	37 6/7	3084	24	970	1321	136	116,37	454,94	391	0,57	0,75	131	11,61	16,30	140	2,64	2,80	106	90,96	10291,56	333,46
M/P54	24	N	39 6/7	3714	22	1277	1319	103	127,94	144,24	113	3,28	3,84	117	9,58	12,13	127	2,18	2,69	123	147,54	6866,24	135,50
M/P55	20	N	39 4/7	3094	21	1964	1542	79	128,62	95,52	74	0,60	0,50	84	25,60	41,24	161	1,77	1,92	108	Def. IgA	Def. IgA	Def. IgA
M/P59	24	C	41 1/7	3655	23	556	1003	180	315,49	372,16	118	16,04	21,40	133	27,86	38,46	138	66,64	75,28	113	69,79	10738,30	374,24
M/P64	25	N	39 1/7	3305	22	854	1801	211	153,36	274,44	179	0,53	1,73	327	5,01	17,70	353	3,63	7,94	219	53,17	1942,00	59,84
M/P65	28	N	34 4/7	3066	23	1244	1171	94	1137,24	591,04	52	1,15	1,00	87	34,60	32,12	93	135,28	100,43	74	45,69	10994,16	124,58
M/P66	26	N	34 2/7	3796	18	1007	1218	121	166,11	185,23	112	9,42	13,89	147	35,65	64,61	181	4,75	5,86	123	106,02	12284,39	547,18
M/P67	20	N	39 2/7	3080	20	1072	1040	97	148,03	234,04	158	1,08	4,43	409	22,61	84,26	373	9,41	12,51	133	100,56	7085,81	111,79
M/P68	24	N	39 3/7	3302	23	872	1073	123	263,39	154,72	59	4,57	5,72	125	42,82	61,95	145	44,28	70,60	159	58,88	6566,86	166,37
M/P69	28	N	40 1/7	3690	22	369	1202	326	53,05	153,09	289	0,36	1,45	404	8,96	27,74	310	9,93	41,51	418	25,87	5066,64	182,41
M/P70	25	N	40 0/7	3390	18	1356	1370	101	236,10	173,72	74	3,74	3,78	101	6,14	6,27	102	0,19	0,34	179	45,03	4576,90	128,83
M/P74	22	N	40 5/7	3750	22	988	1076	109	215,29	262,33	122	15,12	28,99	192	7,73	14,64	190	64,42	97,71	152	69,91	3381,37	69,49
M/P75	27	N	39 0/7	3780	21	1076	1202	112	335,27	372,46	111	72,52	82,11	113	60,73	102,93	169	153,53	165,23	108	92,80	13868,49	568,62
M/P76	22	N	41 1/7	3300	18	1306	1409	108	224,45	211,70	94	12,51	15,77	126	36,85	44,77	121	14,57	17,97	123	24,26	4797,16	147,38
M/P81	21	N	39 1/7	3368	22	688	812	118	48,03	117,34	244	15,81	23,66	150	17,26	27,65	160	8,59	17,63	205	67,75	4257,24	431,46
M/P83	30	N	37 3/7	3380	20	1349	1305	97	135,99	106,93	79	7,37	7,38	100	13,42	12,42	93	4,77	4,33	91	68,41	4878,85	126,46
M/P84	30	N	38 2/7	3512	20	1170	1144	98	253,35	265,48	105	2,17	1,64	75	25,97	31,32	121	19,75	17,96	91	133,65	396331,36	491,77
M/P100	21	N	43 0/7	2904	19	1074	858	80	150,02	143,28	96	1,03	0,95	92	5,57	4,11	74	1,83	2,17	119	S/A	S/A	S/A
M/P101	31	N	35 4/7	3450	21	1078	1052	98	512,62	362,45	71	1,57	2,49	159	17,95	26,21	146	1,49	1,21	81	142,39	26064,62	165,68
M/P102	31	N	39 4/7	3908	23	1172	1125	96	24,83	24,05	97	8,70	9,83	113	47,73	49,22	103	2,38	1,26	53	97,92	6121,47	168,16
M/P103	23	N	37 3/7	2840	22	1092	1153	106	331,34	517,49	156	5,58	9,08	163	12,80	16,80	131	26,37	38,07	144	119,54	11247,63	249,44
M/P104	29	N	40 5/7	3240	22	1085	1090	100	183,57	160,40	87	6,64	5,38	81	12,41	10,53	85	4,36	3,68	84	35,19	3401,32	91,00
M/P105	26	N	38 0/7	3270	20	628	983	157	1263,67	1747,75	138	34,39	44,14	128	45,88	79,30	173	149,35	197,64	132	30,22	2797,43	55,13
M/P106	28	N	40 5/7	2592	21	1161	1328	114	158,02	181,88	115	0,34	0,77	225	79,30	138,89	175	2,60	4,18	161	52,18	2619,31	125,72
M/P107	34	N	38 0/7	2900	20	1391	1316	95	267,30	235,88	88	1,04	1,31	126	8,85	8,77	99	5,77	6,25	108	90,20	13123,87	217,98
M/P108	23	N	36 0/7	3130	22	1390	1323	95	660,91	638,25	97	11,74	16,77	143	44,64	56,35	126	61,72	72,64	118	29,03	1637,78	69,59

Características individuais e descrição dos resultados de anticorpos das mães e recém-nascidos do Grupo Controle

Nº M/RN	Id Mãe (anos)	Tipo Parto	IG (sem)	Peso RN (g)	Coleta colostro (h)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	Total (mg/ml)	Anti-Bp (UA)	Anti-PT (UI)
						IgG Total (mg/dl)			IgG anti Bp (UA/ml)			IgG anti-PT (UI/ml)			IgG anti-FHA (UI/ml)			IgG anti-PRN (UI/ml)					
M/P109	15	N	40 3/7	3610	20	964	1629	169	155,09	284,34	183	2,49	3,84	154	14,57	27,75	190	1,20	1,29	108	65,65	7074,45	193,32
M/P110	27	N	41 2/7	3910	19	1136	1313	116	177,02	267,88	151	2,91	4,27	147	25,06	45,27	181	12,60	20,24	161	53,24	25859,21	865,35
M/P111	27	N	40 5/7	3275	25	896	1362	152	67,68	118,92	176	0,74	1,64	221	19,84	41,76	210	1,37	1,50	110	68,75	16892,09	110,65
M/P112	29	N	37 0/7	3230	21	1027	1564	152	249,76	594,10	238	0,71	2,48	349	18,32	60,38	330	5,63	19,56	347	95,18	38298,26	438,80
M/P113	20	N	38 6/7	2555	21	1272	1284	101	214,51	220,71	103	15,46	12,10	78	439,05	348,61	79	53,11	45,36	85	78,07	30995,23	158,61
M/P114	24	N	37 1/7	2920	23	953	1178	124	720,38	965,00	134	39,44	41,43	105	102,58	112,79	110	42,77	63,80	149	38,42	3328,74	95,42
M/P115	31	N	39 2/7	3760	37	1484	1115	75	490,83	478,12	97	4,72	8,54	181	114,92	152,56	133	35,74	40,99	115	73,75	6315,18	303,62
M/P116	21	N	39 5/7	3410	21	1027	1221	119	191,92	197,16	103	241,42	201,36	83	99,21	103,83	105	0,26	0,61	233	52,36	12292,66	250,62
M/P117	22	N	38 1/7	2770	22	1021	1333	131	59,60	93,29	157	0,43	0,40	91	5,33	3,93	74	3,40	4,31	127	13,18	398,79	15,14
M/P118	29	N	40 0/7	3998	20	893	1064	119	431,27	410,27	95	5,57	7,23	130	38,80	72,60	187	34,33	51,04	149	51,20	7566,12	206,53
M/P120	25	N	38 6/7	3234	22	972	1292	133	459,60	703,15	153	2,10	4,46	213	52,89	103,96	197	21,18	34,79	164	84,15	10442,90	86,65
M/P121	30	N	42 2/7	3722	22	1073	1058	99	1152,64	1341,31	116	55,21	44,07	80	231,86	192,47	83	106,93	128,38	120	66,26	6884,75	63,91
M/P139	21	N	41 2/7	4228	23	727	929	128	247,49	375,19	152	2,16	3,18	147	13,10	22,02	168	21,43	38,35	179	51,16	2672,11	45,22
M/P140	26	N	38 4/7	3252	21	1342	1373	102	115,06	136,05	118	4,73	5,49	116	8,58	6,57	76	1,25	1,81	145	28,38	24448,42	62,07
M/P142	20	N	40 5/7	2746	22	1154	1319	114	121,01	138,71	115	43,57	49,60	114	14,64	23,49	160	1,27	1,15	90	95,05	8773,27	212,41
M/P144	20	N	37 6/7	1920	18	1231	1051	85	147,76	157,56	107	0,57	0,40	71	8,30	11,48	138	1,20	0,45	37	37,70	917,90	43,98
M/P169	20	N	38 4/7	2846	24	1199	1021	85	618,82	523,80	85	4,79	5,59	117	115,38	98,63	85	76,05	56,49	74	59,25	7743,99	279,85
M/P173	21	N	41 4/7	2728	24	913	1589	174	230,70	413,66	179	2,07	5,78	279	8,94	30,57	342	14,54	38,11	262	92,00	13153,00	126,27
M/P174	30	N	39 3/7	2990	22	1076	1368	127	120,66	98,79	82	0,50	0,87	174	125,33	193,20	154	27,93	57,79	207	58,24	5383,43	26,71
M/P175	36	N	38 6/7	3245	19	1205	1239	103	137,95	96,07	70	6,73	5,81	86	9,50	11,09	117	3,41	3,46	101	62,29	1246,19	29,20
M/P176	20	N	39 0/7	3,126	21	932	1047	112	834,91	877,76	105	4,60	5,26	114	72,83	95,78	132	104,93	109,86	105	13,55	1232,72	25,15
M/P177	30	N	44 0/7	2774	24	1272	1289	101	442,83	447,07	101	26,10	40,37	155	10,79	19,65	182	5,08	7,25	143	109,50	3311,88	113,81
M/P178	25	N	40 3/7	3164	19	853	1005	118	343,57	392,65	114	2,38	5,42	228	5,28	13,15	249	5,39	13,30	247	21,42	728,85	60,88
M/P179	22	N	38 6/7	2858	24	1295	812	63	294,85	159,06	54	9,21	6,25	68	15,17	12,40	82	0,44	0,26	59	67,17	8890,90	234,06
M/P180	25	N	38 0/7	3128	19	1266	1188	94	423,18	329,91	78	6,48	4,23	65	36,25	49,32	136	15,95	11,24	70	110,51	31576,31	407,51
M/P181	25	N	41 5/7	2726	22	1210	1283	106	734,70	675,55	92	6,51	6,72	103	45,25	45,70	101	43,14	36,45	84	34,54	9404,09	106,33
M/P182	20	N	38 0/7	3666	30	1023	1191	116	794,99	906,22	114	60,38	105,98	176	25,42	36,92	145	26,25	47,95	183	60,58	4866,70	1606,19
M/P183	30	N	38 0/7	2974	21	1243	913	73	387,17	261,07	67	14,77	13,13	89	63,59	63,14	99	3,32	3,30	99	81,80	5146,68	136,39
M/P188	27	N	39 1/7	3566	23	1019	1169	115	66,83	62,61	94	0,23	0,16	71	6,33	3,64	58	0,40	0,45	114	128,51	12550,21	125,52
M/P192	23	N	39 0/7	3284	21	1149	1432	125	189,05	344,47	182	5,56	7,22	130	17,05	27,51	161	36,26	2,14	6	51,81	5678,17	172,90
M/P197	20	N	40 1/7	3170	23	1087	1459	134	407,72	376,39	92	76,50	73,59	96	72,78	57,16	79	358,71	205,81	57	54,29	5084,08	164,56
M/P198	21	N	38 6/7	3232	21	925	1119	121	185,06	226,39	122	10,33	16,05	155	5,25	7,24	138	2,73	4,34	159	44,33	3244,88	63,95
M/P199	24	N	41 0/7	3630	19	920	1236	134	221,26	366,95	166	0,30	2,15	718	11,18	89,68	802	4,65	14,15	304	90,52	5331,96	136,61
M/P200	23	N	40 1/7	3732	19	1221	1274	104	839,66	835,38	99	6,69	11,42	171	129,62	124,31	96	3,68	4,24	115	51,13	2657,87	27,57
M/P201	22	N	39 0/7	3480	22	1085	1012	93	121,50	149,93	123	9,22	17,51	190	21,42	16,60	77	5,15	0,24	5	64,64	7059,09	132,89
M/P202	23	N	40 2/7	3066	22	1207	1112	92	183,45	147,46	80	31,91	11,55	36	16,92	24,84	147	0,23	7,46	3309	29,35	2289,35	69,74
M/P204	33	N	38 0/7	3480	19	1360	1799	132	92,51	94,21	102	2,47	2,49	101	52,87	66,10	125	1,78	2,10	118	70,44	5461,48	1145,06
M/P205	27	N	39 0/7	3590	19	1463	1135	78	65,56	49,38	75	10,68	8,80	82	8,61	5,52	64	0,76	0,26	35	76,92	13123,24	245,14

Características individuais e descrição dos resultados de anticorpos das mães e recém-nascidos do Grupo Controle

Nº M/RN	Id Mãe (anos)	Tipo Parto	IG (sem)	Peso RN (g)	Coleta colostro (h)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	M	RN	Taxa (%)	Total (mg/ml)	Anti-Bp (UA)	Anti-PT (UI)
						IgG Total (mg/dl)			IgG anti Bp (UA/ml)			IgG anti-PT (UI/ml)			IgG anti-FHA (UI/ml)			IgG anti-PRN (UI/ml)					
M/P209	29	N	40 1/7	3610	21	1202	882	73	101,61	61,53	61	0,16	0,18	114	8,51	6,35	75	1,45	1,13	78	120,88	5763,63	154,77
M/P210	25	N	40 3/7	3182	21	1109	1141	103	177,45	185,36	104	4,27	5,48	129	6,00	5,65	94	3,34	2,37	71	135,28	42075,04	843,74
M/P211	23	N	39 6/7	3388	25	854	1073	126	346,08	452,35	131	7,51	18,48	246	8,31	18,61	224	7,21	19,08	265	27,17	3778,55	189,44
M/P212	25	N	40 1/7	3810	23	990	1262	127	908,17	1393,13	153	114,84	175,19	153	70,89	109,01	154	119,52	127,05	106	32,10	1074,19	37,07
M/P213	26	N	39 1/7	3478	20	1199	1268	106	152,68	242,95	159	5,40	10,84	201	34,66	56,87	164	0,54	0,83	155	30,51	5384,76	94,70
M/P217	20	N	39 0/7	3330	19	1337	1009	75	1292,47	507,88	39	5,00	2,87	57	54,48	34,65	64	62,61	35,18	56	95,99	7010,55	325,88
M/P218	22	N	38 0/7	3042	22	946	1199	127	106,82	114,59	107	1,22	1,53	126	5,35	4,04	75	0,82	0,60	73	85,20	8248,33	132,89
M/P219	26	N	40 2/7	4272	20	1223	1308	107	267,46	307,91	115	2,84	3,53	124	4,38	4,81	110	2,55	2,78	109	36,90	1244,26	85,29
M/P222	27	N	39 0/7	4090	22	1068	1083	101	136,08	136,57	100	1,09	1,55	142	8,24	10,20	124	0,47	0,45	96	125,32	10489,50	215,94
M/P238	21	N	38 1/7	3120	20	1383	1245	90	137,71	111,68	81	0,17	0,24	146	5,98	6,73	112	1,49	1,34	90	40,85	4395,12	83,40
M/P A	20	N	40 0/7	4156	22	956	975	102	247,37	225,68	91	5,56	5,59	101	44,30	54,52	123	42,67	46,02	108	97,01	10928,67	105,25
M/P C	25	N	41 6/7	3100	22	1042	1421	136	120,51	179,61	149	8,29	17,04	206	20,96	44,02	210	2,17	3,16	145	57,86	3651,01	209,57
M/P D	27	N	40 3/7	3030	NI	906	1111	123	377,40	477,00	126	9,58	14,52	152	12,03	13,27	110	7,53	9,54	127	S/A	S/A	S/A
M/P G	22	N	39 4/7	3405	NI	1113	1153	104	312,00	417,23	134	0,40	0,56	139	4,49	7,51	167	6,49	7,30	112	93,01	9350,19	452,33
M/P I	22	N	38 5/7	3075	NI	961	1134	118	229,54	308,09	134	93,61	151,72	162	945,09	1782,53	189	75,42	85,47	113	24,00	1978,58	41,94
M/P J	20	C	NI	2550	NI	1059	1266	120	913,49	1107,02	121	92,25	108,96	118	389,57	446,55	115	102,35	109,57	107	128,23	14232,82	189,14
M/P L	20	N	41 2/7	3555	NI	835	955	114	390,73	396,19	101	448,89	536,83	120	92,82	113,63	122	61,39	68,27	111	68,09	12246,43	263,92
M/P R	15	N	37 3/7	3155	NI	810	767	95	138,73	134,33	97	17,19	17,99	105	9,39	11,84	126	1,53	2,07	135	105,72	7008,83	134,39
M/P T	20	N	40 0/7	3660	NI	1059	1390	131	649,12	541,66	83	149,37	54,96	37	611,96	139,02	23	71,77	88,44	123	71,97	13349,51	152,95
M/P X1	28	C	40 0/7	3390	NI	892	1042	117	87,19	78,38	90	0,28	0,38	137	15,15	18,60	123	2,82	2,94	104	55,44	2087,84	62,92
M/P X2	31	C	NI	3300	NI	803	1013	126	273,53	374,28	137	2,81	4,52	161	204,90	320,63	156	54,74	103,23	189	233,74	14018,98	1150,33
M/P X3	38	N	39 1/7	3145	NI	1314	1424	108	372,05	340,74	92	1,83	2,78	152	26,26	28,77	110	3,27	1,80	55	149,00	4610,23	184,31
M/P X4	24	N	38 1/7	3870	NI	1262	1154	91	134,32	87,99	66	6,81	7,62	112	9,43	9,17	97	1,65	1,65	100	31,45	1419,90	58,44
M/P X6	24	N	NI	2665	NI	897	1107	123	223,37	266,64	119	27,95	29,09	104	56,70	95,71	169	41,96	60,15	143	81,33	5651,88	78,54
M/P X7	33	N	40 3/7	3315	NI	958	1330	139	576,56	813,63	141	6,12	10,19	167	30,15	56,68	188	12,66	20,25	160	67,90	14548,37	245,33

Abreviaturas: Nº, número; M, mãe; P, placenta; RN, recém-nascido; Id, idade; IG, idade gestacional; sem, semanas; g, gramas; h, horas; Bp, *Bordetella pertussis* ; PT, toxina pertussis; FHA, hemaglutinina filamentosa; PRN, pertactina; C, cesária; N, normal; NI, não informado; S/A, sem amostra; Def. IgA, deficiente de IgA.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos convidando-a para participar, como voluntária, da pesquisa ***“Impacto da imunização materna com Bordetella pertussis na resposta celular e nos níveis de anticorpos IgG séricos e IgA secretadores adquiridos passivamente pelo recém-nascido”***

Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Em caso de recusa você não terá nenhum prejuízo no seu atendimento médico no hospital. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Cuiabá (UNIC), Av. Beira Rio, 3100, Bloco da Saúde II, Térreo – Coordenação de Mestrado, Jardim Europa, CEP: 78065-900, telefone (65) 3363-1271.

O objetivo deste estudo é avaliar se a vacinação com a vacina acelular dirigida a *B. pertussis* (dTpa), bactéria responsável por causar a doença coqueluche, será eficiente para conferir uma resposta celular mais adequada em seu filho (células que irão combater a infecção) e se irá induzir níveis mais elevados de anticorpos (substância que protege contra infecções) no sangue e leite materno da senhora e se esses anticorpos passaram para o seu bebê através da placenta, para que assim, ele fique mais protegido. A sua participação neste estudo possibilitará um maior conhecimento de como a mãe vacinada protege o seu filho contra a coqueluche. Se concordar em participar desta pesquisa será:

- coletado um pouco mais de seu sangue junto com os exames de rotina na sala de parto.
- coletado um pouco de sangue do cordão umbilical.
- coletado um pouco de seu colostro (leite de até 72 horas após o parto).

Os riscos para a senhora são mínimos, apenas dor no local de coleta do sangue. Para o bebê não haverá risco algum porque o sangue será coletado do cordão umbilical da placenta.

O benefício direto para você enquanto participante da pesquisa será saber se a vacina é eficiente para conferir uma maior proteção para a senhora e seu filho. O benefício indireto será o melhor conhecimento de proteção passada da mãe para o filho contra a coqueluche.

Os dados referentes à sua pessoa serão confidenciais e garantimos o sigilo de sua participação durante toda pesquisa, inclusive na divulgação da mesma. Os dados serão guardados em forma numérica sem identificação por nome. A pesquisadora responsável é Maria Isabel Valdomir Nadaf, Professora na Universidade Federal de Mato Grosso, Departamento de Pediatria, telefone: (65) 3615-7320, celular (65) 8423-0254 ou e-mail gugubibi@gmail.com.

Considerando os dados acima, **CONFIRMO** que fui informada e esclarecida por escrito e verbalmente dos objetivos desta pesquisa e eu concordo em participar da pesquisa,

.....
RG Nº:.....

Assinatura do pesquisador principal:

Testemunha*

* Testemunha só é exigido caso o participante não possa por algum motivo, assinar o termo.

Cuiabá, ____ de _____ de 20__

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Impacto da imunização materna com Bordetella pertussis na resposta celular e nos níveis de anticorpos IgG séricos e IgA secretores adquiridos passivamente pelo recém-nascido

Pesquisador: Patricia Palmeira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 42995115.2.0000.5165

Instituição Proponente: ASSOCIACAO DE PROTECAO A MATERNIDADE E A INFANCIA DE CUIABA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.005.350

Data da Relatoria: 26/03/2015

Apresentação do Projeto:

A coqueluche é uma doença respiratória causada por uma bactéria Gram-negativa, denominada Bordetella pertussis. Muitos países passaram por quadros recentes de epidemias e o número de casos de coqueluche aumentou significativamente entre crianças em idade escolar e adultos jovens. Estes se tornaram uma fonte de infecção potencial para recém-nascidos, que representam o grupo mais susceptível a desenvolver formas graves da

doença. Baseado na transferência de anticorpos maternos por via transplacentária e aleitamento materno, a imunização de gestantes com a vacina acelular dirigida a B. pertussis (DTPa) é uma medida adicional para conferir proteção aos neonatos. No entanto, alguns autores levantam a questão de que o elevado nível de anticorpos adquiridos por transferência transplacentária decorrente da imunização materna poderia afetar adversamente a resposta imune do recém-nascido após a imunização ativa, devido ao mascaramento antigênico gerado pelos anticorpos maternos. Dessa forma, os objetivos deste estudo são avaliar as concentrações de anticorpos IgG no soro e de anticorpos IgA no colostro reativos com Bordetella pertussis em gestantes imunizadas ou não com a vacina DTPa e a transmissão destes anticorpos para seus recém-nascidos; e avaliar a ativação ex vivo de linfócitos T e B dos recém-nascidos de gestantes imunizadas ou não com a vacina DTPa após estimulação com B. pertussis. Amostras de sangue

Endereço: Avenida Beira Rio, 3100, Bloco de Saúde II, térreo - Coordenação Mestrado

Bairro: Jardim Europa

CEP: 78.065-900

UF: MT

Município: CUIABA

Telefone: (65)3363-1271

E-mail: margarete.lovato@kroton.com.br

Continuação do Parecer: 1.005.350

materno, sangue do cordão umbilical e do colostro serão coletadas de 40 gestantes imunizadas com a vacina DTPa e 80 gestantes não imunizadas. A avaliação de IgG total em soro materno e do cordão será realizada por nefelometria. Para a determinação de IgA total do colostro e anticorpos IgG e IgA dirigidos a B. pertussis e seus principais fatores de virulência presentes na vacina DTPa (toxina pertussis, pertactina e hemaglutinina filamentosa) serão feitos ensaios imunoenzimáticos. A ativação de células T e B neonatais será avaliada após estímulo com B. pertussis inativada por meio da expressão de marcadores de ativação celular e marcação intracelular de IFN-gama em linfócitos T.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Os objetivos deste projeto são: 1. Avaliar a transferência materno-infantil de anticorpos IgG séricos via passagem transplacentária e IgA secretores

via aleitamento materno dirigidos a Bordetella pertussis em parturientes imunizadas ou não com a vacina dTpa durante a gestação. 2. Avaliar a ativação ex vivo de linfócitos T e B de recém-nascidos de gestantes imunizadas ou não com a vacina dTpa após estímulo com Bordetella pertussis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos para a parturiente são mínimos, apenas dor mínima no local de coleta do sangue. Para o bebê não haverá risco algum porque o sangue será coletado do cordão umbilical da placenta. A coleta do colostro será realizada por ordenha manual, sendo um processo indolor, apresentando incômodo ou não.

Benefícios:

O benefício a ser obtido será um melhor conhecimento da proteção contra a coqueluche no recém-nascido e condutas que poderão beneficiar os pacientes evitando maiores riscos ao recém-nascido.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

está dentro dos parâmetros das determinações do CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

OK

Endereço: Avenida Beira Rio, 3100, Bloco de Saúde II, térreo - Coordenação Mestrado

Bairro: Jardim Europa

CEP: 78.065-900

UF: MT

Município: CUIABA

Telefone: (65)3363-1271

E-mail: margarete.lovato@kroton.com.br

Continuação do Parecer: 1.005.350

Recomendações:

sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CUIABA, 30 de Março de 2015

Assinado por:
Margarete Lovato
(Coordenador)

Endereço: Avenida Beira Rio, 3100, Bloco de Saúde II, térreo - Coordenação Mestrado

Bairro: Jardim Europa

CEP: 78.065-900

UF: MT

Município: CUIABA

Telefone: (65)3363-1271

E-mail: margarete.lovato@kroton.com.br

CIÊNCIA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **20.05.15** tomou ciência do Projeto nº **134/15** intitulado “**IMPACTO DA IMUNIZAÇÃO MATERNA COM BORDETELLA PERTUSSIS NA RESPOSTA CELULAR E NÍVEIS DE ANTICORPOS IgG SÉRICOS E IgA SECRETORES ADQUIRIDOS PASSIVAMENTE PELO RECÉM NASCIDO.**” vinculado à pós-graduação do Departamento De Pediatria da FMUSP, que envolverá atividade prática e/ou experimental no âmbito da Faculdade de Medicina ou Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e que conta com prévia aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Cuiabá.

Pesquisador(a) Responsável: Patrícia Palmeira

Pesquisador(a) Executante : Laila Lima

CEP-FMUSP, 22 de Maio 2.015

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa