

Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"

## ESTUDIO DEL TRANSPORTE MADRE-HIJO DE ANTICUERPOS ANTIESTREPTOQUINASA

*Lic. Lien López Matilla, Dr. Antonio González Griego, Dra. Alina Alerm González, Dr. Arturo Santiesteban Torres, Dra. Sonia Águila Setién, Lic. Amada Wanton, Téc. Edna Bancoul Moya y Téc. María Herminia Álvarez Díaz*

### RESUMEN

Se estudió cómo se comporta el transporte de anticuerpos anti-estreptoquinasa entre la madre y el recién nacido y cuáles son los factores que influyen en este. Se colectaron 125 muestras sanguíneas de puérperas, por la vena antecubital y de sus respectivos hijos a partir del cordón umbilical. Se confeccionaron encuestas para la recolección de datos a partir de las historias clínicas de las madres y los recién nacidos. Se empleó un método inmunoenzimático, heterogéneo, cualitativo, tipo *sandwich* de doble antígeno para la detección de anticuerpos anti-estreptoquinasa. A partir de los resultados obtenidos se concluyó que existe un transporte activo de los anticuerpos anti-estreptoquinasa de la madre al feto y que este transporte se ve influenciado por la edad cronológica de la madre, la edad gestacional, el estado nutricional de la madre y el peso del recién nacido.

*DeCS:* INMUNIDAD MATERNO-ADQUIRIDA/genética; ANTICUERPOS; ESTREPTOQUINASA; TECNICAS PARA INMUNOENZIMAS/métodos.

En la especie humana, los anticuerpos (Ac) maternos transmitidos al feto antes del nacimiento le brindan protección contra muchas enfermedades virales y bacterianas durante los primeros meses de vida.<sup>1</sup> Los Ac de tipo IgG pasan de la circulación de la mujer embarazada a su feto y los de tipo IgA a través de la lactancia materna. Varias IgG maternas son detectadas en la sangre fetal en la semana doce de la gestación, pero la mayoría se adquieren durante el tercer trimestre. Muchos estudios muestran que los niveles de IgG en la circulación fetal o neonatal al término son

significativamente mayores que en la circulación materna.<sup>2</sup> Estos Ac maternos protectores caen porque son catabolizados en la medida en que el infante crece y alcanzan un mínimo entre 3 y 6 meses después de nacer, y desaparecen entre los 4 y 12 meses de edad.<sup>3,4</sup>

Los niveles de IgG en el suero son además bajos en embarazadas con hipogammaglobulinemia, lo cual es un factor que incrementa el riesgo de pérdida fetal o infecciones en el recién nacido. En los niños a término de estas madres se ha comprobado un bajo nivel de Ac en el suero, esto ha sido prevenido administrándole a

la madre IgG intravenosa para incrementar las cantidades disponibles para el feto.<sup>4</sup>

Este transporte a través de la placenta ocurre vía receptor para Fc neonatal originalmente identificado en ratas lactantes, es abundante en la barrera epitelial que cruza la IgG materna para entrar al feto o al recién nacido. Después del período neonatal, se continúa expresando en bajos niveles en el hígado, riñones e intestino y aparece en estos tejidos para proteger la IgG del catabolismo del fluido extracelular. Este receptor<sup>5</sup> une la IgG con una afinidad de  $2 \times 10^7 - 1 \times 10^8 M^{-1}$ .

Los estreptococos del grupo B han emergido como la mayor causa de infecciones generalizadas y focales en los recién nacidos y pueden afectar de 1 a 5 infantes por cada 1 000 nacidos vivos. Estas bacterias colonizan el tracto genital de 5-30 % de las mujeres embarazadas y de 50 - 70 % de sus niños son colonizados durante el parto. Alrededor de 1 % de los niños afectados desarrollan ataques severos por estos microorganismos incluidas sepsis y meningitis.<sup>6,7</sup>

La estreptoquinasa (SK) producida por muchas cepas de estreptococos  $\beta$  hemolíticos, es una proteína inmunogénica que induce la formación de Ac específicos, es una fibrolisina que se une al proactivador del plasminógeno activándolo y transformándolo en plasmina, enzima proteolítica que digiere la fibrina, que disuelve trombos *in situ* y embólicos.<sup>8</sup> Esto hace que intervenga en el proceso infeccioso y evite la formación de coágulos de fibrina que detienen la hemorragia y la diseminación de la infección.<sup>9</sup>

Varios han sido los resultados que manifiestan que la mayoría de los humanos tienen niveles de Ac específicos del tipo IgG contra la SK por causa de infecciones estreptocócicas previas.<sup>10-12</sup> Por lo antes expuesto fue de interés conocer si

los Ac anti-SK atraviesan la barrera placentaria, si existen diferencias en los niveles de Ac anti-SK en recién nacidos y sus madres; estimar la posible influencia de: edad gestacional, tipo de parto, localización de la placenta y estado nutricional de la madre sobre los niveles de Ac anti-SK en el recién nacido; conocer si existe relación entre los Ac anti-SK en los recién nacidos y su peso y talla al nacer y conocer si en el calostro de las madres hay presencia de Ac anti-SK.

## MÉTODOS

### TOMA DE MUESTRAS

A 125 mujeres que se les efectuó el parto en el Hospital Ginecoobstétrico "Eusebio Hernández", se les realizó punción venosa de la región antecubital del antebrazo al día siguiente del alumbramiento y se obtuvo sangre del cordón umbilical de los recién nacidos en el momento del parto. La sangre se incubó durante 2 h a 37 °C y una vez retraído el coágulo el suero se centrifugó a 2 000 rpm (500 g) durante 5 min en centrífuga de tubos de ensayo marca HIMAC HITACHI. El suero obtenido se conservó en viales Eppendorf de 2 mL, los cuales se almacenaron a -20 °C hasta el momento del estudio.

A 15 de las madres incluidas en el estudio un día después del parto se les tomó muestras de calostro, las que se filtraron por lana de vidrio para eliminar los lípidos.

### RECOLECCIÓN DE DATOS

Se confeccionó una encuesta a partir de los carnés obstétricos y las historias clínicas de las madres y los recién nacidos que recogía los indicadores siguientes:

Talla del recién nacido, peso del recién nacido, edad cronológica de la madre, edad gestacional, tipo de parto, topografía placentaria y estado nutricional de la madre. Se clasificaron según lo establecido en el *Manual de Obstetricia y Perinatología*.<sup>13</sup>

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

A cada una de las madres que forman parte del estudio se les explicó las bondades y riesgos de este.

#### MONTAJE DE LA TÉCNICA ANALÍTICA

Se empleó un método inmunoenzimático, heterogéneo, cualitativo, tipo *sandwich* de doble antígeno, desarrollado en el Departamento de Inmunología del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas (ICBP) “Victoria de Girón”. Los sueros pareados se colocaron en un mismo soporte de ensayo inmunoenzimático, incluidos aquellos de calostro, para garantizar la homogeneidad de los resultados.

El fundamento del ensayo se basa en recubrir placas de 96 pocillos de cloruro de polivinilo (*Titertek Flow Laboratories*) con 100  $\mu\text{L}$  por pocillo de estreptoquinasa recombinante, obtenida en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Ciudad de La Habana (CIGB) a partir de la inserción en el genoma de *Escherichia coli* del gen que codifica para la estreptoquinasa en el *Streptococcus equisimilis*, la concentración en el recubrimiento de dicha proteína es de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  diluida en una solución amortiguadora de recubrimiento (tampón carbonato  $\text{pH} = 9,6$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,015 mol/L,  $\text{NaHCO}_3$  0,028 mol/L). Se incubó 1 h a 37 °C en cámara húmeda.

A continuación se realizan 3 lavados con disolución amortiguadora eliminándose el material no fijado (500  $\mu\text{L}$  de Tween-20 en regulador salino 0,1 M ( $\text{NaCl}$  0,137 mol/L),  $\text{KCl}$  0,0027 mol/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,0081 mol/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,0011 mol/L) en lavador de microplacas (*Organon Teknika*). Se incubaron 100 mL por pocillos de las muestras de suero o calostro puras durante 30 min a temperatura de laboratorio (22 - 25 °C), donde se fijó el Ac específico al antígeno de recubrimiento. Tres lavados posteriores eliminan los componentes no fijados y en el pocillo permanecen en los complejos antígeno-Ac.

Posteriormente se adicionan 100  $\mu\text{L}$  de conjugado por pocillo a una concentración de 0,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , el cual se diluye en regulador salino 0,1 M con leche descremada 40 % y 200  $\mu\text{L}$  de Tween 20 diluido 4 veces. Se incuban las placas 1 h a 37 °C en cámara húmeda y se lava nuevamente para eliminar el exceso. El sustrato cromogénico de la enzima se diluye en disolución amortiguadora de revelado (tampón fosfato-citrato  $\text{pH} = 5,5$ , ácido cítrico monohidratado 0,053 mol/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 mol/L), que consiste en 1 mg/mL de o-fenilendiamina y 10  $\mu\text{L}$  de sustrato de la enzima, peróxido de hidrógeno 30 %, se añaden 100  $\mu\text{L}$  por pocillo. Las placas se incuban durante 30 min a temperatura de laboratorio y se detiene la reacción con 50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2 mol/L. La medición se realiza a 492 nm en lector de microplacas (*Organon Teknika*) y la densidad óptica que se obtiene es proporcional a la cantidad de Ac en la muestra.

Como control negativo se empleó suero de carnero a una dilución 1: 100 en tampón fosfato-salino y como positivo una mezcla de sueros de donantes de Banco de Sangre y se empleó sin diluir. El conjugado se produjo según el método de conjugado descrito por *Nakane y Kawaoi*,<sup>11</sup> con la

utilización de peroxidasa de rábano picante (HRP, tipo VI, 268 u/mg sólido, RZ: 3,1, Sigma).

### PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO

Se utilizaron los estadísticos de posición y dispersión. Se trabajó sobre la base del coeficiente de transferencia (CT) de cada pareja madre-hijo, el cual se determinó de la forma siguiente:

$$CT = DO \text{ madre} / DO \text{ hijo}$$

### RESULTADOS

De un total de 125 pares de muestras en todas se detectó la presencia de Ac anti-SK. En 88, el CT era inferior a 1, esto representa 70,4 % del total y 37 pares mostraron un CT por encima de 1 para 29,6 %.

Del análisis de los CT y de las encuestas realizadas se fijó la atención en los parámetros: madre adolescente, madre dura, parto pretérmino, parto postérmino, madre bajo peso, niño bajo peso y macrofeto; por cumplir con estos la mayoría de las parejas con  $CT > 1$ . En la tabla 1 se reflejan los datos del total de muestras estudiadas que caían en estas clasificaciones.

TABLA 1. Datos del total de muestras procesadas que cumplen con los parámetros analizados

Parámetro	Cantidad	% del total de parejas madre-hijo analizadas
madre adolescente	10	8
madre madura	11	8,8
parto pretérmino	7	5,6
parto postérmino	5	4
madre bajo peso	17	13,6
niño bajo peso	6	4,8
macrofeto	2	1,6

Los demás parámetros que se recogieron en las encuestas se comportaron dentro de los valores normales. En el caso del tipo de parto, en este estudio solo 20 mujeres tuvieron distócico y sus valores de CT no estaban incluidos en los grupos problemas; lo mismo sucedió con las madres obesas encontradas porque de 15 estudiadas ninguna estaba en los grupos de estudio.

El valor medio de los CT fue 0,95 con una desviación estándar de 0,33. Se tomaron como valores anormales los que se encontraban por encima de 1,28. Se organizaron además otros 2 grupos, en uno de estos se incluyó las parejas madre-hijo que tenían valores de CT entre 1 y 1,28 y otro en los que este se encontraba entre 0,9 y 1, pues aunque muestran un  $CT < 1$ , estos valores se acercan más a los que se comportan con un transporte a favor de un gradiente de concentración y el valor numérico obtenido pudiera deberse a imprecisiones analíticas.

En la tabla 2 se recogen los datos de los parámetros estudiados en los 3 grupos problemas.

En la tabla 3 se muestran los datos anteriores pero desglosados en los diferentes grupos problema.

En las 15 muestras de calostro analizadas no se observó la presencia de Ac anti-SK.

TABLA 2. Datos totales de los grupos problemas según los parámetros analizados

Parámetros	Cantidad	% del total de parejas que cumplen con el parámetro
madre adolescente	8	80
madre madura	1	9,09
parto pretérmino	4	57,1
parto postérmino	4	80
madre bajo peso	8	47
niño bajo peso	2	33,3
macrofeto	1	50

TABLA 3. Datos de los parámetros analizados desglosados según los distintos grupos problemas

Parámetros	Grupo	Cantidad	% del total que cumple con el parámetro
Madre adolescente	> 1,28	3	30
	1,28-1	1	10
	0,9-1	4	40
Madre madura	> 1,28	0	0
	1,28-1	1	9
	0,9-1	0	0
Parto pretérmino	> 1,28	1	14,2
	1,28-1	1	14,2
	0,9-1	2	28,5
Parto posttérmino	> 1,28	1	20
	1,28-1	1	20
	0,9-1	2	40
Madre bajo peso	> 1,28	4	23,5
	1,28-1	2	11,7
	0,9-1	2	11,7
Niño bajo peso	> 1,28	1	16,6
	1,28-1	0	0
	0,9-1	1	16,6
Macrofeto	> 1,28	0	0
	1,28-1	1	50
	0,9-1	0	0

## DISCUSIÓN

El comportamiento de los CT en las muestras procesadas evidenció que en la mayor parte de las parejas madre-hijo estudiadas hay un transporte activo de AC anti-SK a través de la placenta, lo que coincide con lo reportado por otros autores para otros Ac de la clase IgG, que le brindarán al recién nacido protección contra varias enfermedades virales y bacterianas durante los primeros meses de vida.<sup>2,12</sup>

En este caso en particular, el paso de este Ac a través de la placenta en todas las parejas madre-hijo analizadas representa un factor de gran importancia para estos niños, los que se enfrentarán a un medio que les resultará hostil, desde el punto de vista que no tienen su sistema de defensa completamente preparado para defenderse y esta inmunidad pasiva natural es su única

arma para combatirlo y donde como se hizo referencia anteriormente, los estreptococos constituyen la primera causa de infecciones en los recién nacidos.

El método inmunoenzimático empleado en este estudio permite detectar todos los isotipos de inmunoglobulinas, por esta razón el suero de las madres tendrá presencia de los diferentes tipos en dependencia si estaba o no infectada por estreptococos  $\beta$  hemolíticos en ese momento, no es así en el caso de los recién nacidos donde, como ya se ha dicho, solo tienen Ac de la clase IgG. Por esta razón no podemos afirmar que en los casos donde la concentración de Ac en la madre es mayor que en los recién nacidos, no haya ocurrido un transporte activo de este Ac, para ello se tendría que utilizar un método que detecte específicamente Ac del isotipo IgG.

En la tabla 1 se observa que del total de muestras analizadas un porcentaje muy bajo de estas respondían a la clasificación de los parámetros analizados como problemas. Lo anterior llevó a realizar un análisis descriptivo de lo que ocurría en cada caso, además de que muestra los logros de Cuba en cuanto al Programa Nacional de Salud Materno Infantil, que abarca desde el nivel primario hasta el terciario de salud y los Hogares Maternos, donde se les presta especial atención a la educación para la maternidad y a los cuidados higiénico-dietéticos.<sup>13</sup>

Con los datos mostrados en la tabla 2 se comprobó que a excepción del parámetro madre madura, todos los demás están representados en un porcentaje considerable en los grupos problemas, donde centramos la atención. Esto llevó a hacer un análisis más detallado de cada uno y los resultados se presentan en la tabla 3.

Podemos ver que en el caso de las madres adolescentes los CT en un porcentaje bastante alto eran inferiores a 1, lo que muestra una afectación del transporte de Ac anti-SK, con una mayor cantidad de ellas incluidas en el grupo con un  $CT > 1,28$  y entre  $0,9-1$ . Este comportamiento del CT en madres adolescentes responde a que en ellas no están creadas todas las condiciones anatomofisiológicas, que debe tener una mujer para enfrentar un embarazo.

En el caso de las madres maduras solo una se comportó con valores anormales, esto podría atribuirse a que las mujeres con más de 35 años de edad también constituyen grupos de riesgo obstétricos, entre otras cosas, porque con el aumento de la edad disminuye el funcionamiento exitoso del sistema reproductor.

En el caso de los partos pretérmino, vemos que tienen una alta contribución a los grupos problema e incluso uno de es-

tos recién nacidos era bajo peso. Estos datos concuerdan con otros estudios donde se ha visto que niños prematuros tienen bajos niveles de IgG.<sup>4</sup> Esto es porque en el tercer trimestre del embarazo se trasmite la mayor parte de la IgG debido a los cambios anatómicos que se producen en la placenta en esta etapa y que hacen posible el intercambio de inmunoglobulinas. En el caso de los niños postérmino, también la gran mayoría de ellos estuvo representada en los grupos de estudio y esto puede deberse a que hacia el final del embarazo se forma material fibrinoide en la superficie de las vellosidades coriónicas de la placenta y que resulta del envejecimiento de esta y se ha visto que reduce sus funciones.<sup>14</sup>

El parámetro bajo peso de la madre constituyó otro elemento a tener en cuenta en la investigación porque un número considerable estaba incluido en los grupos problemas, con la mayor cantidad en el grupo con  $CT > 1,28$ . Este hecho está relacionado con el déficit de precursores y cofactores que pudo haber tenido la madre, porque los Ac son proteínas y para su síntesis son necesarios aminoácidos y vitaminas como cofactores enzimáticos, así como un nivel metabólico adecuado. En uno de los casos de este estudio el bajo peso de la madre repercutió en un niño bajo peso.

El factor del recién nacido que incidió en el éxito del transporte madre-hijo de Ac anti-SK lo fue el peso del recién nacido, pues aunque los niños bajo peso estaban representados en un porcentaje muy bajo, en la muestra total se encontraron algunos de ellos mostrando valores de CT que tienden a ser de tipo transporte pasivo; esto puede deberse a que por problemas en la placenta de las madres, esta no cumplió a plenitud su función transportadora y por ende se vio afectado el transporte de Ac maternos al feto. Como se

planteó anteriormente, el bajo peso de una madre causó un niño bajo peso, lo que también influyó en el paso de Ac de ella a su hijo por las causas ya explicadas. Por otra parte, en los 2 macrofetos que se estudiaron, uno se encontraba en el grupo con CT entre 1,28 -1, lo que se podría atribuir a una involución de la placenta cuando el feto alcanza las proporciones adecuadas.

En lo que respecta a la ausencia de Ac anti-SK en el calostro, parece ser que la inmunidad humoral que se le confiere al recién nacido contra este antígeno bacteriano es de tipo IgG y no de Ac de la subclase IgA, que es la que se encuentra en las secreciones humanas, lo que hace pensar que no se le brinda inmunidad mucosal contra la SK. Lo anterior será necesario confirmarlo en un mayor número de púerperas para así reafirmar esta hipótesis.

A partir de estos resultados se concluye que los Ac anti-SK atraviesan la barrera placentaria y lo hacen por un transporte activo. Los factores maternos que más afectan este transporte son la edad cronológica en madres adolescentes y maduras, la edad gestacional en el caso de partos pretérmino y postérmino y su estado nutricional cuando son bajo peso. El bajo peso del recién nacido es el factor que más afecta el transporte activo de Ac anti-SK. No se detectan Ac anti-SK en el calostro de las madres.

A punto de partida de este estudio se ha trazado como estrategia evaluar el comportamiento del transporte a través de la placenta de Ac frente a antígenos que más afectan a la población infantil y así contribuir con el Programa Nacional Materno-Infantil.

## SUMMARY

The behavior of the transport of streptokinase antibodies from the mother to the newborn infant, as well as the factors influencing on it, were studied here. 125 blood samples were obtained from the antecubital vein of the puerperas and from the umbilical cord of their children. Surveys were done to collect data from the medical histories of the mothers and the newborn infants. An immunoenzymatic, heterogenous and qualitative sandwich double antigen method was used to detect anti-streptokinase antibodies. According to the results, it was concluded that there is an active transport of anti-streptokinase antibodies from the mother to the fetus and that this transport is influenced by the chronological age of the mother, the gestational age, the mother's nutritional status and the birth weight.

*Subject headings:* IMMUNITY, MATERNALLY-ACQUIRED/genetics; ANTIBODIES; STREPTOKINASE; ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY/methods.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Englund J, Glezen WP, Piedra PA. Maternal immunization against viral disease. *Vaccine* 1998;16(14/15):1456-63.
2. Malek A, Sager R, Kubn P, Nicolaides KH, Schneider H. Evolution of materno-fetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1996;36:248-55.
3. Jiri K, Siegrist CA. Optimization of vaccine responses in early life: The role of delivery systems and immunomodulators. *Immunol Cell Biol* 1998;76:222-36.
4. Simister NE, Story CM. Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus. *J Reprod Immunol* 1997;37:1-23.
5. Ghetie V, Hubbard JG, Kim JK, Tsen MF, Lee Y, Ward ES. Abnormally short serum half-lives of IgG in b2-microglobulin-deficient mice. *Eur J Immunol* 1996;26:690-6.
6. Baker CJ, Edwards MS. Group B Streptococcal infections. En: Remington J. S and Klein J. O. *Infections diseases of the Fetus and the Newborn Infant*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995:980-1054.

7. Hordnes K, Tynning T, Kvan AI, Bevanger L, Brown TA, Jonsson R, Heneberg B. Cervical secretions in pregnant women colonized with Group B Streptococci have high levels of antibodies to serotype III Polysaccharide Capsular antigen and Protein R. *Scan J Immunol* 1998;47:179-88.
8. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. *Microbiología Médica*. 19 ed. México, D.F.: El Manual Moderno, 1992:213-24.
9. Lee HS, Cross SJ, Davidson R. Hypersensitivity reactions to streptokinase in patients with high pre-treatment anti-streptokinase antibodies and neutralisation titres. *Eur Heart J* 1993;14:1640-3.
10. Bom VJ, Brügemann J, van der Schaff W, van Wijk R, van der Meer J. Rapid enzyme immunoassay of anti-streptokinase antibodies in human plasma. *Clinica Chimica Acta* 1993;218:121-9.
11. Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase label antibody. A new method of conjugation. *J Histochem, FEBS Letters*, 1974:285.
12. Kovarik J, Siegrist CA. Optimization of vaccine responses in early life: The role of delivery systems and immunomodulators. *Immunol Cell Biol* 1998;76:222-36.
13. Colectivo de Autores. *Manual de diagnóstico y tratamiento en Obstetricia y Perinatología*. 1 ed. Ciudad Habana: Editorial Ciencias Médicas, 2000:35-6.
14. Moore KL, Persaud TV. *Embriología Clínica*. 5 ed. México, D.F.: Interamericana S.A. de C.V., 1998:120-30.

Recibido: 20 de julio de 2001. Aprobado: 22 de octubre de 2001.

Lic. *Lien López Matilla*. Departamento de Inmunología. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Giron". Calle 146 No. 3102, municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. CP 11600. Correo electrónico: [lien@giron.sld.cu](mailto:lien@giron.sld.cu)