

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Doutorado Acadêmico em Saúde Pública

PRISCILA MAYRELLE DA SILVA CASTANHA

**TRANSFERÊNCIA PLACENTÁRIA E CINÉTICA DE ANTICORPOS
ANTIDENGUE MATERNO TRANSFERIDOS EM UMA COORTE DE CRIANÇAS
NO PRIMEIRO ANO DE VIDA**

RECIFE

2016

PRISCILA MAYRELLE DA SILVA CASTANHA

**TRANSFERÊNCIA PLACENTÁRIA E CINÉTICA DE ANTICORPOS
ANTIDENGUE MATERNO TRANSFERIDOS EM UMA COORTE DE CRIANÇAS
NO PRIMEIRO ANO DE VIDA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora:

Dra. Maria Cynthia Braga

Co-orientadores:

Dra. Marli Tenório Cordeiro

Dr. Ernesto Torres de Azevedo Marques Júnior

Recife

2016

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

C346t Castanha, Priscila Mayrelle da Silva.
Transferência placentária e cinética de anticorpos
antidengue materno transferidos em uma coorte de
crianças no primeiro ano de vida / Priscila Mayrelle da
Silva Castanha. - Recife: [s.n.], 2013.
96 p. : ilus., graf., tab.

Tese (doutorado em saúde pública) - Centro de
Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.
Orientadores: Maria Cynthia Braga.
Coorientadores: Marli Tenório Cordeiro, Ernesto
Torres de Azevedo Marques Júnior.

1. Dengue - epidemiologia. 2. Imunidade Materno-
Adquirida. 3. Lactentes. 4. Vírus da dengue –
imunologia. 5. Estudos de Coortes. 6. Anticorpos
Antivirais. 7. Anticorpos Neutralizantes - sangue. 8.
Imunoglobulina G – sangue. 9. Brasil. I. Braga, Maria
Cynthia. II. Cordeiro, Marli Tenório. III. Marques
Júnior, Ernesto Torres de Azevedo.. IV. Título.

CDU 616.98

PRISCILA MAYRELLE DA SILVA CASTANHA

**TRANSFERÊNCIA PLACENTÁRIA E CINÉTICA DE ANTICORPOS
ANTIDENGUE MATERNO TRANSFERIDOS EM UMA COORTE DE CRIANÇAS
NO PRIMEIRO ANO DE VIDA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 29/ 04/ 2016

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cynthia Braga
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

Profa. Dra. Celina Maria Turchi Martelli
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

Profa. Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

Profa. Dra. Maria Júlia Gonçalves de Mello
Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira

Profa. Dra. Ariani Impieri de Souza
Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira

Dedico este trabalho a Deus, amigos e familiares.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que permitiu mais uma vitória em minha vida.

A Ele seja dada toda honra e toda a glória.

Aos meus pais, Arlete e Carlos, pela atenção, carinho e incentivo ao longo dos anos.

À minha orientadora, Dra. Cynthia Braga, pelo apoio, confiança, empenho e aprendizado proporcionado durante esses 10 anos de parceria.

Aos meus co-orientadores, Dra. Marli Tenório e Dr. Ernesto Marques Jr., pelo aprendizado, confiança e atenção.

À equipe do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental, em especial a Verônica Gomes, Geórgia Guimarães, Amanda Oliveira e Clintiano Curvelo, por terem sido sempre solícitos.

À equipe do Center for Vaccine Research, da Universidade de Pittsburgh, pelo carinho, atenção e amizade, em especial ao amigo, orientador e parceiro de bancada Dr. Eduardo Nascimento, por ter sido sempre solícito.

Ao amigo, namorado e companheiro de todas as horas Adriano Maron, pela infundável paciência durante os dias/noites de trabalho e pela ajuda e incentivo durante o processo de escrita.

Aos meus queridos amigos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, em especial Leandro Wanderley, Almerice Lopes, Eduardo Brandão, Paula Oliveira, Paula Fernanda, Maria José, Socorro e Solange pelos momentos de alegria e descontração dedicados.

As minhas queridas amigas Mirella Moraes, Gabriella Vilella e Carolina Nunes pela amizade, carinho e incentivo.

Aos pesquisadores Fábio Lopes, Zulma Medeiros, Paulo Sérgio, Wayner Souza, George Diniz e Celina Martelli pelo apoio e atenção.

Ao Programa de Pós-graduação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela oportunidade de aprendizado.

À equipe da secretaria acadêmica do curso, por terem sido sempre solícitas.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dessa pesquisa.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

CASTANHA, Priscila Mayrelle da Silva. Transferência placentária e cinética de anticorpos antidengue materno transferidos em uma coorte de crianças no primeiro ano de vida. 2016. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

RESUMO

Anticorpos antidengue materno transferidos têm sido implicados na imunopatogênese da dengue grave em lactentes. Postula-se que esses anticorpos possuam um papel distinto durante os primeiros anos de vida: ao nascimento, anticorpos antidengue materno adquiridos conferem proteção, e em seguida declinam a níveis subneutralizantes capazes de facilitar a infecção pelo vírus dengue (DENV) mediante o mecanismo de ADE (Antibody dependent enhancement), aumentando o risco de ocorrência das formas graves da dengue. Estudos prospectivos conduzidos em lactentes Asiáticos têm mostrado que o pico de anticorpos materno adquiridos com a capacidade de mediar aumento da infecção pelo DENV ocorre entre o sexto e o nono mês de vida, o que correlaciona com a epidemiologia da dengue grave em lactentes dessa região. Esta tese descreve o perfil de imunidade materna antidengue e a transferência placentária de anticorpos dengue-específicos em pares mãe-cordão recrutados em um estudo de coorte prospectivo conduzido na cidade do Recife, Nordeste do Brasil. Adicionalmente, esse trabalho analisa o papel dos níveis de IgG total maternos e da imunidade antidengue materna na transferência de anticorpos ao feto. Na coorte de lactentes, a tese avalia a cinética de declínio dos anticorpos antidengue materno-transferidos e sua capacidade de mediar ADE durante os primeiros anos de vida. Níveis de IgG DENV-específico e de anticorpos neutralizantes sorotipo específicos (DENV1-4) foram determinados em 376 pares mãe-cordão. A cinética de anticorpos materno transferidos neutralizantes e/ou mediadores de ADE foi investigada em uma subamostra das crianças inseridas na coorte. A maior parte das gestantes apresentava imunidade ao sorotipo DENV-3 (53,7%) ou a combinação DENV-3/DENV-4 (30,6%). Níveis de IgG DENV-específico e de anticorpos neutralizantes para os sorotipos DENV-3 e DENV-4 foram significativamente maiores nas amostras do cordão umbilical do que nas respectivas amostras maternas. Mães imunes a apenas um sorotipo do vírus transferiram maiores níveis de IgG DENV-específico ($p=0,02$) e de anticorpos neutralizantes para o DENV-3 ($p=0,04$) quando comparado a mães imunes a múltiplos sorotipos do DENV. Níveis de anticorpos materno transferidos para o DENV-3 foram indetectáveis em >90% das crianças aos 4 meses de idade. O pico de atividade ADE foi detectado no segundo mês de vida ($p<0,0001$) e rapidamente declinou no quarto mês de vida ($p=0,0035$). Diferente do observado em lactentes asiáticas, o pico de atividade ADE mediado pelos anticorpos maternos transferidos ocorreu mais nos lactentes Brasileiros. Esses resultados possuem importantes implicações para a imunopatogênese da dengue durante a infância e para o estabelecimento de futuros esquemas vacinais antidengue nos primeiros anos de vida.

Palavras-chave: dengue, epidemiologia, imunologia, coorte, lactentes.

CASTANHA, Priscila Mayrelle da Silva. Placental transfer and kinetics of maternally transferred dengue-specific antibodies in a cohort of children during the first year. 2016. Thesis (Doctor's Degree in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

ABSTRACT

Maternal-fetal transferred Dengue virus (DENV)-specific antibodies have been implicated in the immunopathogenesis of dengue during infancy. These antibodies play a dual role in infants during the first year of life: first, maternally-acquired antibodies confer protection at birth, and then decline to a lower level capable of enhance DENV infection through the mechanism of ADE (antibody-dependent enhancement), increasing the chance of development of severe dengue. Prospective studies conducted in Asian infants have provided evidence that the peak of enhancing activity by maternally transferred dengue antibodies occurs between 6th to 9th month of age, which correlates with the age-related epidemiology of the dengue severe cases in this region. This thesis describes the placental transfer of dengue-specific antibodies in mother-cord pairs enrolled in a prospective cohort study carried out in the city of Recife, Northeast Brazil. Moreover, we analyze the role of maternal total IgG levels and dengue immunity in the transference of dengue-specific antibodies to the fetus. In the cohort of children, we determine the kinetics of Enhancing Activity (EA) by maternally acquired dengue antibodies during their first year of life. DENV-specific IgG and serotype-specific (DENV1-4) neutralizing antibody (Nab) levels were assessed in 376 mother-cord paired samples. The kinetics of Enhancing Activity (EA) by maternally acquired dengue antibodies was determined in serum samples from children enrolled in the cohort. Mothers were mostly immune to DENV-3 (53.7%) alone or combined with DENV-4 (30.6%). Levels of DENV-specific IgG, DENV-3 and DENV-4 antibodies were significantly higher in the newborns than their respective mothers. Mothers immune to a single serotype transferred greater levels of DENV-specific IgG ($p=0.02$) and DENV-3 Nab ($p=0.04$) than mothers immune to multiple DENV serotypes. Maternally acquired DENV-3 Nab disappeared >90% of the children by the age of 4 months. The peak of EA was detected by the age of 2 months ($p<0.0001$) and rapidly declined at age of 4 months ($p=0.0035$). Unlike Asian infants, EA of dengue infection by maternal transferred dengue antibodies occurs at earlier ages in Brazilian children. These findings have implications to the immunopathogenesis of dengue during early ages and for the establishment of dengue vaccination schedules during the first years of life.

Keywords: dengue, epidemiology, immunology, cohort, children.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Mecanismo de Antibody dependent enhancement.....	30
Figura 2-	Transferência placentária de IgG mediada pelo receptor FcRn.....	35
Figura 3-	Fluxograma de recrutamento das participantes do estudo.....	45
Figura 4-	Fluxograma do seguimento da coorte.....	46
Gráfico 1-	Níveis de IgG total em 376 pares mãe-cordão.....	63
Gráfico 2-	Cinética de declínio dos anticorpos antidengue no primeiro ano de vida.....	67
Gráfico 3-	Cinética de anticorpos antidengue materno transferidos mediadores de atividade ADE da infecção por DENV-2 em amostras de crianças nascidas de mães imunes a DENV-3.....	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Frequência de complicações fetais associadas à infecção por dengue durante a gestação: síntese dos principais estudos.....	23
Quadro 2-	Frequência de marcadores sorológicos de infecções prévias pelo dengue na população de gestantes.....	25
Quadro 3-	Características clínicas mais frequentemente observadas nos lactentes com dengue quando comparado a população de crianças ou adultos com infecção pelo DENV.....	28
Quadro 4-	Comparação de fatores imunes que contribuem para imunopatogênese da dengue grave em lactentes, crianças e adultos.....	33
Quadro 5-	Descrição das medidas laboratoriais mensuradas no estudo.....	47
Quadro 6-	Definição e categorização das variáveis do estudo.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Principais características da população de estudo.....	59
Tabela 2-	Transferência placentária de anticorpos IgG dengue-específicos, anticorpos neutralizantes sorotipo-específicos (DENV1-4) e subclasses de IgG1 e IgG4 dengue-específicos em 376 pares mãe-cordão.....	61
Tabela 3-	Transferência placentária de anticorpos dengue-específicos e sua relação com perfil imune materno ao vírus dengue.....	64
Tabela 4-	Fatores potencialmente envolvidos na redução da transferência placentária de anticorpos dengue-específicos ao neonato.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ELISA	Ensaio imunoenzimático
DENV	Vírus dengue
ADE	Antibody dependente enhancement
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LaViTE	Laboratório de Virologia e Terapia Experimental
IMIP	Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira
MEM	Minimal Essential Medium
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
PRNT	Teste de soroneutralização por redução do número de placas
RNA	Ácido ribonucléico
SFB	Soro fetal bovino
FcRn	Receptor neonatal
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
RNA	Ácido ribonucleico
IFN	Interferon

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
2.1	Epidemiologia da dengue em gestantes e lactentes.....	22
2.2	Dengue: vírus, transmissão e manifestações clínicas em lactentes, crianças e adultos.....	26
2.3	Resposta imune ao vírus dengue e imunopatôgenese da dengue em lactentes e adultos.....	28
2.4	Transferência placentária de imunoglobulinas G (IgG).....	33
2.4.1	Transferência placentária e cinética de anticorpos dengue-específicos no primeiro ano de vida.....	35
3	OBJETIVOS.....	40
3.1	Objetivo geral.....	40
3.2	Objetivos específicos.....	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1	Características da área de estudo.....	42
4.2	Recrutamento e critérios de inclusão e exclusão.....	43
4.3	Tamanho da amostra.....	43
4.4	Coleta de dados.....	44
4.4.1	Linha de base da coorte.....	44
4.4.2	Seguimento da coorte de crianças.....	45
4.4.3	População de estudo.....	46
4.5	Descrição dos principais procedimentos laboratoriais.....	47
4.5.1	Deteção de IgG e subclasses de IgG1 e IgG4 dengue-específicos.....	48
4.5.2	Quantificação dos níveis de IgG total.....	48
4.5.3	Determinação da imunidade sorotipo-específica ao DENV.....	49
4.5.3.1	<i>Manutenção da Cultura Celular.....</i>	<i>49</i>
4.5.3.2	<i>Preparação dos Estoques dos Vírus: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4....</i>	<i>50</i>
4.5.3.3	<i>Soroneutralização por redução do número de placas (PRNT).....</i>	<i>50</i>
4.5.3.4	<i>Crítérios de positividade e determinação dos títulos de anticorpos.....</i>	<i>51</i>
4.5.3.5	<i>Validação dos resultados.....</i>	<i>51</i>
4.5.4	Determinação dos níveis de anticorpos mediadores de amplificação da infecção	52

(Enhancing activity – EA).....	52
4.5.4.1 <i>Manutenção da cultura de células da linhagem K562</i>	52
4.5.4.2 <i>Ensaio de EA</i>	53
4.6 Definição e categorização das variáveis	54
4.7 Análise dos dados	55
4.8 Considerações éticas	55
5 RESULTADOS	58
5.1 Características da população de estudo	58
5.2 Transferência placentária de anticorpos dengue-específicos	59
5.3 Transferência placentária de IgG total e influência dos níveis de IgG total maternos na transferência placentária de anticorpos dengue-específicos	62
5.4 Influência da imunidade materna prévia a dengue na transferência placentária de anticorpos dengue-específicos ao neonato	64
5.5 Fatores potencialmente associados à redução na transferência placentária de anticorpos dengue-específicos ao neonato	64
5.6 Cinética de anticorpos IgG dengue-específicos materno-transferidos ao neonato	66
5.7 Cinética de anticorpos antidengue materno-transferidos mediadores de imunoamplificação da infecção (ADE) viral	68
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE A – Questionário da gestante	90
APÊNDICE B – Questionário de seguimento do lactente	92
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética	96

1 CONTEXTUALIZAÇÃO



1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A dengue é uma doença febril aguda causada por quatro sorotipos de vírus (DENV-1, 2, 3 e 4) com características antigênicas similares, pertencentes à família *Flaviviridae* e transmitidos pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo a espécie *Aedes aegypti* o principal vetor (GUZMAN et al., 2010; GUZMAN; HARRIS, 2015; RICO-HESSE et al., 2010). A doença é considerada a mais importante arbovirose em termos de morbidade e mortalidade e constitui um grave problema de saúde pública com substancial impacto econômico e social, o que demanda progressivos esforços e investimentos por parte dos países endêmicos (GUZMAN; HARRIS, 2015; GUZMAN et al., 2010).

Estima-se que aproximadamente quatro bilhões de pessoas vivam em áreas sob risco de transmissão do vírus e que ocorram anualmente cerca de 390 milhões de infecções por dengue, das quais cerca de 96 milhões representam casos sintomáticos da doença, a maioria no continente asiático (BHATT et al., 2013; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015). Nesse continente, a dengue grave constitui uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre lactentes e crianças menores de 15 anos (CAPEDING et al., 2013; WILSON; CHEN, 2015).

Nas Américas tem sido observado um aumento progressivo e acentuado no número de casos da doença nas últimas décadas, tendo sido notificados 1.033,417 na década de 80, 2.725,405 na década de 90, e 4.759,007, no período de 2000-2007 (SAN MARTÍN et al., 2010). Em 2015, mais de 2 milhões de casos de dengue foram registrados, dos quais 8,797 evoluíram para dengue grave e 1,084 para o óbito (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE, 2015).

O Brasil se destaca entre as áreas com maior ocorrência de dengue nas Américas, sendo responsável por cerca de 70% dos casos registrados nesse continente (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE, 2015). Atualmente, os quatro sorotipos do vírus dengue circulam de forma simultânea em diversas regiões do país, o que resulta em um padrão de transmissão hiperendêmica da doença, caracterizado por intensa circulação viral e pela alternância dos sorotipos predominantemente circulantes (TEIXEIRA et al., 2013; WILSON; CHEN 2015). Esses fatores têm contribuído para o aumento progressivo no número de casos e hospitalizações pela doença (TEIXEIRA et al., 2013). No país, embora no período de 2006 a 2008 se tenha registrado um aumento da incidência de dengue grave entre crianças, a maior parte dos casos graves tem historicamente se concentrado na população

adulta (SAN MARTIN et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2013).

O espectro clínico da infecção pelo DENV é bastante amplo, variando desde infecções assintomáticas ou febre indiferenciada, até as formas mais graves da doença, comumente caracterizadas pelo aumento da permeabilidade vascular e consequente extravasamento plasmático, que pode resultar em instabilidade hemodinâmica e óbito, caso o volume intravascular não seja rapidamente restabelecido (GUZMAN; HARRIS, 2015).

Embora diversos fatores potencialmente envolvidos na determinação da dengue grave tenham sido investigados, tais como a virulência viral (RICO-HESSE, 2010), fatores genéticos (COFFEY et al., 2009) e imunológicos (MATHEW; ROTHMAN, 2008; WAHALA; SILVA, 2011), os mecanismos imunopatogênicos associados ao desenvolvimento da dengue grave permanecem parcialmente compreendidos. Existem evidências que suportam a hipótese de que a ocorrência de infecções secundárias está relacionada ao desenvolvimento da dengue grave, particularmente nas populações de adultos e adolescentes (HALSTEAD, 2007). Atualmente, a proposição com maior potencial explicativo para o risco aumentado de ocorrência dengue grave em indivíduos que experimentam uma infecção secundária pelo DENV é a que atribui à evolução dos casos para as formas graves ao fenômeno conhecido como Antibody dependent enhancement (ADE) (GUZMAN; ALVAREZ; HALSTEAD, 2013).

O papel do ADE na fisiopatologia da dengue e de outras infecções virais foi inicialmente postulado por Scott Halstead na década de 1960 (HALSTEAD; BUESCHER, 1961; HALSTEAD; YAMARAT; SCALON, 1963; HALSTEAD; CHOW; MARCHETTE, 1973; HALSTEAD; O'ROUKE, 1977), e desde então tem sido amplamente estudado e corroborado por inúmeros estudos (BOONNAK et al., 2008; DEJNIRATTISAI et al., 2010; HALSTEAD, 2003). Segundo a hipótese do ADE, anticorpos antidengue pré-existentes – originários de uma infecção primária - se unem ao vírus da infecção secundária, na vigência de uma nova infecção por um sorotipo distinto, e facilitam a entrada do DENV em células que possuem receptores específicos para a porção Fc de IgG, tais como monócitos, macrófagos e células dendríticas. Esse mecanismo resultaria no aumento do número de células infectadas e da carga viral e, em consequência, na exacerbação da resposta imune à infecção, especificamente o aumento da produção de citocinas e de mediadores químicos que ocasionam danos ao sistema vascular e aumento da permeabilidade vascular, levando ao surgimento de hemorragia (HALSTEAD, 2014; KYLE; HARRIS, 2008).

Em crianças nos primeiros meses de vida, estudos realizados no Sudeste Asiático têm mostrado que a dengue grave frequentemente se desenvolve em infecções primárias, sendo este fenômeno explicado pela presença de níveis subneutralizantes de anticorpos antidengue maternos, de mães previamente expostas ao vírus DENV, transferidos através da placenta (KLIKS et al., 1988; PENGSAI et al., 2006; SIMMONS et al., 2007). Anticorpos antidengue materno transferidos parecem desempenhar um papel imunoprotetor durante os primeiros meses de vida do concepto, diante de uma possível exposição ao DENV (ENDY et al., 2004; LAOPRASOPWATTANA et al., 2005; LIBRATY et al., 2009). Entretanto, o seu declínio, que ocorre progressivamente após o nascimento (CHAU et al., 2009; ENDY et al., 2004; LIBRATY et al., 2009; PANHUIS et al., 2011), propicia o aparecimento de uma janela imunológica caracterizada pela presença de níveis subneutralizantes de anticorpos que favorecem o desenvolvimento de ADE, aumentando conseqüentemente o risco de desenvolvimento de dengue grave em lactentes (KLIKS et al., 1988; SIMMONS et al., 2007).

Essa hipótese tem sido corroborada por estudos conduzidos em crianças asiáticas, que têm mostrado associação entre a atividade ADE mensurada *in vitro* com o desfecho clínico da dengue e a epidemiologia da doença em crianças nos primeiros anos de vida (CHAU et al., 2009; KLIKS et al., 1988). Em estudo conduzido no Vietnã, Chau et al. (2009) avaliaram a atividade ADE em amostras de soro de lactentes nascidos de mães que possuíam imunidade a dengue e observaram que o pico de atividade ADE ocorre em crianças com idade entre 3 e 9 meses de vida. Essa faixa etária coincide com o período no qual se observa as maiores taxas de incidência de dengue grave em lactentes nesse país (CHAU et al., 2009).

Das cinco classes de anticorpos conhecidas, a imunoglobulina G (IgG) é a única que possui a capacidade de atravessar a barreira placentária, exercendo importante função na adaptação do neonato ao ambiente extra-uterino e proporcionando proteção contra agentes infecciosos nos primeiros meses de vida (CHUCRI et al., 2010). A transferência de IgG ao feto é um processo ativo e seletivo, mediado por um receptor específico – chamado de receptor neonatal (FcRn) - para a porção Fc de IgG que está presente na membrana placentária, principalmente no sincitiotrofoblasto, a porção não-embriônica da placenta que forma uma barreira entre o feto e a mãe (CHUCRI et al., 2010; PALMEIRA et al., 2012). A transferência transplacentária de IgG se inicia por volta da 13ª semana gestacional e aumenta progressivamente, havendo passagem de maior concentração nas últimas três semanas gestacionais, quando os níveis sorológicos do neonato são, em geral, superiores aos níveis maternos (PALMEIRA et al., 2012).

Todas as subclasses de IgG humanas (IgG1-4) são produzidas durante uma infecção por dengue (KORAKA et al., 2001; THEIN et al., 1993) e possuem a habilidade de atravessar a barreira placentária, embora com eficiência distinta (WATANAVEERADEJ et al., 2003). Essas variações na eficiência de transferência placentária são atribuídas a diferenças na afinidade de ligação entre as subclasses de IgG e o receptor FcRn, devido a polimorfismos genéticos presentes no sítio de interação entre essas duas moléculas. Assim, as subclasses de IgG1 e IgG4 são transferidas de forma mais eficiente ao neonato do que as subclasses IgG2 e IgG3 (MATHIESEN et al., 2013; ROOPENIAN et al., 2007; STAPETLON et al., 2011;).

Estudos conduzidos em populações asiáticas têm sugerido que as subclasses IgG1 e IgG4 estão envolvidas na patogênese da dengue grave (KORAKA et al., 2001; WATANAVEERADEJ et al., 2003). No entanto, apesar do possível papel das subclasses IgG na determinação da dengue grave, poucos estudos têm investigado a transferência placentária desses anticorpos ao neonato. Em estudo conduzido no Sudeste Asiático, Watanaveeradej et al. (2003), ao estudarem a transferência placentária de anticorpos, verificaram que o IgG1 antidengue foi a principal subclasse de anticorpo maternamente transferida ao lactente.

Diversos fatores, tais como parto prematuro, presença de infecções e co-morbidades materna - síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e malária - integridade da placenta e uso de imunossupressores, podem interferir na transferência placentária de IgG ao concepto (CUMBERLAND et al., 2007; MORAES-PINTO et al., 1996; OKOKO et al., 2001; SCOTT et al., 2007). Outro fator que também parece ser importante para transferência transplacentária de anticorpos ao feto são os níveis de IgG total maternos (HARTTER et al., 2000; PALMEIRA et al., 2012). Altos níveis de IgG total maternos têm sido associados à redução na transferência transplacentária de anticorpos devido à saturação dos receptores FcRn, que estão presentes em número limitado na membrana placentária (ROOPENIAN et al., 2007). A redução da transferência de anticorpos antígeno específicos em gestantes com níveis elevados de IgG total tem sido demonstrada em diversas doenças virais, incluindo sarampo, herpes simplex e varicela-zoster (HARTTER et al., 2000; MORAES-PINTO et al., 1996).

No Brasil, onde a incidência de dengue grave durante os primeiros anos de vida parece ser menor do que a reportada nos países Asiáticos (HALSTEAD, 2002; SAN MARTIN et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2013), estudos que avaliem a transferência de anticorpos dengue específicos ao neonato ainda são escassos, provavelmente devido à dificuldade de se estabelecer coortes de pares de gestantes-crianças que requeiram obtenção de amostras biológicas repetidas. A maior parte do conhecimento acerca da epidemiologia e imunopatogenia da dengue em lactentes e crianças têm por base estudos clínicos e

epidemiológicos realizados em coortes de neonatos conduzidas em países do Sudeste Asiático (CHAU et al., 2009; LIBRATY et al., 2009; PENGSAI et al., 2006). Embora estudos que avaliam a transferência placentária de IgG antidengue em pares de mãe-cordão tenham sido recentemente publicados (ARGOLO et al., 2013; LEITE et al., 2014), a cinética dos anticorpos maternos transferidos ao concepto no contexto brasileiro permanece desconhecida. Esse perfil pode ser distinto, tendo em vista as particularidades epidemiológicas da dengue e fatores genéticos da população (GUZMAN; ALVAREZ; HALSTEAD, 2013).

Com base nessas considerações, um estudo de coorte de nascimento foi conduzido na cidade do Recife, uma área de alta endemicidade da doença, entre os anos de 2010 e 2014, com o objetivo de (i) investigar a incidência de dengue nos primeiros dois anos de vida, (ii) estimar a taxa de infecções sintomáticas e assintomáticas e, (iii) estudar a dinâmica dos anticorpos antidengue maternos, transferidos via placenta, no primeiro ano de vida. A metodologia e os resultados preliminares desse estudo foram recentemente publicados (BRAGA et al., 2016; LEITE et al., 2014).

A presente tese faz parte desse projeto âncora e investiga o perfil de imunidade antidengue sorotipo específica nas gestantes recrutadas na coorte, o perfil e a dinâmica dos anticorpos maternos transferidos aos neonatos, incluindo as subclasses de IgG predominantemente transferidas, durante o primeiro ano de vida. Adicionalmente, a pesquisa analisa a atividade ADE *ex vivo* e a sua relação com a cinética dos anticorpos antidengue materno-transferidos no primeiro ano de vida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO



2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia da dengue em gestantes e lactentes

Embora a infecção pelo vírus dengue durante a gestação tenha sido associada a diversas complicações maternas e fetais que incluem prematuridade, morte materna e fetal, anomalias fetais e aborto, ainda são poucos os estudos epidemiológicos e clínicos conduzidos nesse grupo populacional (PAIXAO et al., 2016).

Uma revisão sistemática foi realizada com o objetivo de avaliar o risco de complicações fetais em gestantes infectadas pelo vírus dengue e compilou os resultados de 16 estudos, publicados entre 1994 e 2004, os quais foram conduzidos em 10 países. Essa revisão inclui dois estudos conduzidos na Brasil (PAIXAO et al., 2016). Os resultados desses estudos encontram-se sumarizados no quadro 1.

O aborto associado à infecção por dengue na gestação foi verificado em oito estudos, tendo a prevalência desse efeito adverso variado de 3,8% a 16% (ALVARENGA et al., 2009; CHITRA; PANICKER, 2011; ISMAIL et al., 2006; TAN et al., 2008; WADUGE et al., 2006). Igualmente, a prevalência de natimorto entre as mães expostas ao vírus variou entre 4,7% a 13% (FRIEDMAN et al., 2014; ISMAIL et al., 2006).

A prematuridade e o baixo peso ao nascer foram as complicações mais comumente observadas entre mulheres que sofreram infecção pelo vírus dengue durante a gravidez, embora variações substanciais na frequência dessas condições tenham sido observadas entre os estudos (PAIXAO et al., 2016). Entre os estudos conduzidos na Malásia, a proporção de lactentes pré-termo entre mães infectadas variou de 3,1% a 26,6% (ISMAIL et al., 2006; TAN et al., 2008). No Brasil, um estudo conduzido na cidade de Goiás, Goiânia, encontrou uma frequência de 58% de baixo peso ao nascer ($\leq 2,500$ gramas) entre as crianças nascidas de mães com marcadores de infecção atual/recente pelo vírus dengue (ARGOLO et al., 2013). Entre as gestantes inseridas em nosso estudo de coorte, a maioria com gestação classificada como de baixo risco e residentes na cidade do Recife, Nordeste do Brasil, não se observou tal associação (LEITE et al., 2014).

Quadro 1 - Frequência de complicações fetais associadas à infecção por dengue durante a gestação: síntese dos principais estudos.

Autores (Ano)	Desenho de estudo	Local do estudo	Gestantes admitidas com dengue	Frequência de complicações fetais entre as gestantes infectadas por dengue(%)
FRIEDMAN et al. (2014)	Coorte retrospectiva	Guiana Francesa, França	86 gestantes com dengue sintomática confirmadas laboratorialmente	- Parto prematuro: 17% - Baixo peso ao nascer: 19,8% - Natimorto: 10%
TAN et al. 2008	Coorte prospectiva	Malásia	IgM positiva: 63 IgM negativa: 2,468	- Parto prematuro: 3,1% - Baixo peso ao nascer: 9,5%
RESTREPO et al. (2004)	Coorte prospectiva	Colômbia	39 gestantes com dengue sintomática confirmadas laboratorialmente	- Parto prematuro: 8,1% - Baixo peso ao nascer: 10,8% - Aborto: 5,1%
BARROSO et al (2009)	Coorte prospectiva	Cuba	IgM positiva: 30	- Retardo do crescimento uterino: 10%
ALVARENGA et al. (2009)	Série de casos	Rio de Janeiro, Brasil	13 casos de dengue confirmados laboratorialmente	- Parto prematuro: 58% - Baixo peso ao nascer: 50% - Aborto: 7,6%
ISMAIL et al. (2006)	Série de casos	Malásia	16 casos de dengue confirmados (clínica e/ou laboratorialmente)	- Parto prematuro: 26,6% - Aborto: 6,2% - Natimorto: 6,6%
LEITE et al. (2014)	Coorte prospectiva	Recife, Pernambuco - Brasil	IgM positivas: 43 IgM negativas: 361	Baixo peso ao nascer: 0%

FONTE: PAIXAO et al. (2016).

NOTA: Adaptado e traduzido pela autora.

A maior parte das informações acerca do perfil imune sorológico da dengue em gestantes tem por base estudos conduzidos em populações Asiáticas. Nesse continente, uma parcela substancial das mulheres em idade reprodutiva possui marcadores sorológicos (IgG) de infecção prévia pelo vírus (CHAU et al., 2009; KHAMIM et al., 2015; PENGSA et al.,

2003; PENGSAI et al., 2006; PERRET et al., 2005; WATANAVEERADEJ et al., 2003). O quadro 2 apresenta os principais estudos de prevalência conduzidos na população de gestantes.

Na Tailândia, um inquérito sorológico realizado por Perret et al. (2005) observou uma soroprevalência de anticorpos antidengue de 84,4% nas gestantes com idade ≤ 20 anos e de 98,3% naquelas com idade superior a 20 anos (PERRET et al., 2005). Nesse mesmo país, estudo prospectivo conduzido em 219 pares mãe-cordão verificou uma prevalência de anticorpos neutralizantes para dengue superior a 90% entre as gestantes, sendo a proporção de amostras maternas com anticorpos neutralizantes para todos os quatro sorotipos de 86,8% (PENGSAI et al., 2006). Uma elevada proporção de mães com imunidade para os quatro sorotipos do vírus também foi observada em estudo realizado com 141 gestantes, das quais mais de 90% possuíam níveis detectáveis de IgG antidengue e todas as mães com idade superior a 35 anos apresentavam anticorpos contra os quatro sorotipos do vírus (KHAMIM et al., 2015).

No Brasil, um inquérito sorológico conduzido em 505 parturientes admitidas para o parto em uma maternidade da cidade de Goiânia, Goiás, entre os anos de 2009 e 2010, encontrou uma prevalência de anticorpos IgG antidengue de 53,9% (ARGOLO et al., 2013). Diferente do observado na região central do país, resultados preliminares deste estudo de coorte mostram que entre as 415 gestantes recrutadas na linha de base, a prevalência de anticorpos IgG antidengue foi maior que 95% (LEITE et al., 2014). Essas diferenças regionais na prevalência de IgG dengue específica nas gestantes possivelmente refletem o período de introdução e circulação mais recente dos vírus dengue na região Centro-Oeste do país quando comparado a região Nordeste, onde há circulação dos vírus dengue desde a década de 80.

Quadro 2 - Frequência de marcadores sorológicos de infecções prévias pelo dengue na população de gestantes.

Autor (Ano)	Tipo de estudo	Local do estudo	Técnica laboratorial	Soroprevalência (%)
WATANAVERADEJ et al. (2003)	Coorte prospectiva	Bangkok, Tailândia	HI	96,9%
PENGSA et al. (2003)	Coorte prospectiva	Bangkok, Tailândia	PRNT, ELISA, HI	95,2% (PRNT)
PERRET et al. (2005)	Seccional	Bangkok, Tailândia	ELISA, HI	94,7% (HI)
PENGSA et al. (2006)	Coorte prospectiva	Bangkok, Tailândia	PRNT	97,3%
CHAU et al. (2009)	Coorte prospectiva	Vietnã	PRNT	98%
KHAMIM et al. (2015)	Seccional	Ban Pong, Província de Ratchaburi, Tailândia	PRNT	97,2%
ARGOLO et al. (2013)	Seccional	Goiânia, Goiás-Brasil.	ELISA	53,9%
LEITE et al. (2014)	Coorte prospectiva	Recife, Pernambuco - Brasil	ELISA	95,1%

NOTA: Elaborado pela autora.

Na população de lactentes e crianças, variações no perfil epidemiológico da dengue tem sido observadas entre os continentes. Nos países Asiáticos, a dengue grave afeta predominantemente a população de lactentes e crianças, estando entre as 10 principais causas de hospitalização e morte nesse grupo populacional (HALSTEAD, 2002; JAIN et al., 2010). Nesse continente, os primeiros casos de dengue grave em lactentes datam da década de 70 (HALSTEAD et al., 1970). Adicionalmente, a maior parte dos casos graves tem sido registrada em lactentes no primeiro ano de vida, nascidos de mães imunes à dengue, e em crianças e adolescentes (<15 anos) que experimentam infecção secundária por um sorotipo de vírus distinto da primo-infecção (HALSTEAD, 2002). Na Tailândia, Vietnam, Indonésia, Sri Lanka e Índia, cerca de 5% das hospitalizações por dengue grave são de lactentes (CHAU et al., 2008; HALSTEAD, 2002; JAIN et al., 2010; KABILAN et al., 2003).

Diferentemente do perfil epidemiológico observado na Ásia (CAPEDING et al., 2013; WILSON; CHEN, 2015), a maior parte dos casos de dengue no Brasil se concentra na população de adultos (SAN MARTIN et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2005; TEIXEIRA et al.,

2009; TEIXEIRA et al., 2013). Entretanto, mudanças transientes no padrão epidemiológico da dengue têm sido reportadas ao longo dos anos no país. Entre 2006 e 2008, um aumento na incidência e gravidade dos casos da doença foi observado em crianças e adolescentes, com consequente aumento na demanda por internações hospitalares nesse grupo populacional (TEIXEIRA et al., 2013). Em 2006, a incidência de dengue grave em crianças menores de cinco anos ultrapassou os índices registrados entre os grupos de 10-19 anos e 20-39 anos (SAN MARTIN et al., 2010). No ano seguinte, cerca de 53% dos casos graves de dengue grave notificados no país ocorreram na população com até 15 anos (TEIXEIRA et al., 2013). A maior incidência de dengue nesse grupo etário foi observada no ano de 2008. Em contraste, uma tendência de aumento na incidência da doença nos grupos etários com mais de 60 anos foi observada durante o período de 2005 a 2010 (TEIXEIRA et al., 2013). Essa heterogeneidade no padrão epidemiológico da dengue ressalta a complexidade de fatores de risco envolvidos na transmissão da doença no país.

2.2 Dengue: vírus, transmissão e manifestações clínicas em lactentes, crianças e adultos

Os vírus dengue (DENV) são membros da família *Flaviviridae* e pertencentes ao gênero *Flavivirus*, que inclui diversos vírus de importância para a saúde pública, incluindo vírus da febre amarela (YFV), Oeste do Nilo (WNV), encefalite japonesa (JEV) e o Zika (ZIKV) (KUNO et al., 1988). O DENV é transmitido para humanos através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor da doença. Diferente da maior parte dos arbovírus, os vírus dengue não necessitam de um ciclo silvestre para manutenção da transmissão epidêmica em humanos (MURPHY; WHITEHEAD, 2011; WHITEHEAD et al., 2007).

O DENV possui morfologia esférica e tamanho relativamente pequeno, medindo cerca de 50nm de diâmetro. A partícula viral possui um envelope lipoprotéico que envolve o capsídeo viral e um genoma constituído por ácido ribonucléico (RNA) de fita única, não-segmentado e de polaridade positiva. O RNA viral mede ~11 kilobases (kb) e contém uma única fase de leitura aberta (ORF, Open Reading Frame) que codifica uma poliproteína, posteriormente clivada por proteases virais e celulares em dez proteínas funcionalmente distintas: três proteínas estruturais (C, prM/M e E) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

A inoculação de um dos quatro sorotipos do vírus DENV no organismo humano ocorre através da picada de um mosquito fêmea infectado, e é seguido por um período de

incubação, no qual ocorre a replicação de novas partículas virais no citoplasma das células infectadas. Esse período dura em média de 4 a 7 dias e ainda não há o surgimento de sinais e sintomas da doença. O término do período de incubação pode coincidir com o surgimento das manifestações clínicas da doença e com o início da fase virêmica, na qual as partículas virais ou seus componentes (RNA ou antígenos virais) são detectados na corrente sanguínea e podem ser transmitidos, durante o repasto sanguíneo, aos mosquitos vetores (KAO et al., 2005; PEELING et al., 2010).

Durante a fase inicial da doença, as manifestações clínicas da dengue na criança são usualmente semelhantes à dos adultos (Quadro 3). Na população infantil, a fase inicial da dengue é frequentemente imperceptível em virtude da elevada frequência de formas assintomáticas ou pela presença de manifestações clínicas semelhantes às encontradas em outras síndromes febris próprias dessa faixa etária, como tosse, coriza, diarreia e vômitos (ELLING et al., 2013; JAIN; CHATURVEDI, 2010). Em crianças menores de dois anos de idade e particularmente nos menores de seis meses, os sintomas que compõem a definição de caso de dengue da Organização Mundial de Saúde (OMS), como cefaleia, dor retro-orbitária, artralgias e mialgias, manifestam-se principalmente pelo choro persistente, fraqueza e irritabilidade (CHAU, 2010; ELLING et al., 2013; JAIN; CHATURVEDI, 2010).

As principais diferenças entre adultos, crianças e lactentes, quanto à sintomatologia, são observadas durante a fase crítica da dengue. Uma maior frequência de manifestações graves como convulsões, disfunção hepática e extravasamento plasmático são comumente observadas em lactentes do que em crianças, sendo a taxa de fatalidade cerca de quatro vezes maior nos lactentes (JAIN; CHATURVEDI, 2010). As manifestações hemorrágicas e a gravidade do acometimento sistêmico dos órgãos são observadas principalmente na população adulta (HAMMOND et al., 2005; VERHAGEN; GROOT, 2014).

Entre lactentes e crianças, a fase de defervescência da doença, normalmente observada entre o quarto e o sétimo dia após o surgimento dos sintomas, pode ser caracterizada pela evolução súbita para quadros de dengue grave, como a síndrome do choque da dengue e a dengue com sintomas hemorrágicos (ELLING et al., 2013; JAIN; CHATURVEDI, 2010). O diagnóstico tardio da dengue grave em crianças tem sido associado à alta letalidade, havendo a necessidade de acompanhamento clínico e vigilância do surgimento de sinais de alerta de dengue grave nesse grupo populacional (ELLING et al., 2013; JAIN; CHATURVEDI, 2010).

Algumas diferenças nos achados laboratoriais de lactentes (de 1 mês até os 24 meses) e crianças durante a fase aguda de dengue são observadas: níveis de hematócrito menor que 30% e níveis mais baixos de plaquetas (média 56.900mm^3) são mais frequentemente

observados em lactentes quando comparados a crianças; contagem de leucócitos e linfócitos totais significativamente maior em lactentes do que em crianças; maior frequência de sintomas, como coriza, náusea/vômitos, exantema, petéquias e outras manifestações hemorrágicas em lactentes do que em crianças (JAIN; CHATURVEDI, 2010; WITAYATHAWORNWONG, 2005).

Quadro 3 - Características clínicas mais frequentemente observadas nos lactentes com dengue quando comparado a população de crianças ou adultos com infecção pelo DENV.

Características	Referências
Elevada taxa de mortalidade (casos graves)	HAMMOND et al. (2005); KABILAN et al. (2003); KALAYANAROOJ; NIMMANNITYA (2003); MARTINEZ et al. (1993); WITAYATHAWORNWONG (2005)
Trombocitopenia	KABILAN et al. (2003); POLI et al. (1991); WITAYATHAWORNWONG (2005)
Elevada contagem de leucócitos totais e linfocitose	HAMMOND et al. (2005); KABILAN et al. (2003); WITAYATHAWORNWONG (2005)
Manifestações clínicas graves (choque hipovolêmico, extravasamento plasmático, hemorragia interna)	HAMMOND et al. (2005); WITAYATHAWORNWONG (2005)
Disfunção hepática e hepatomegalia	KABILAN et al. (2003); SOUNDRAVALLY et al. (2010)
Esplenomegalia	HAMMOND et al. (2005); KABILAN et al. (2003)
Náusea/ vômitos, exantema e petéquias	KABILAN et al. (2003); WITAYATHAWORNWONG (2005)
Febre alta	KABILAN et al. (2003); MARTINEZ et al. (1993); WITAYATHAWORNWONG (2005)
Edema dos membros inferiores e inchaço retrobulbar	KABILAN et al. (2003); MARTINEZ et al. (1993)

FONTE: JAIN; CHATURVEDI (2010)

NOTA: Adaptado e traduzido pela autora.

2.3 Resposta imune ao vírus dengue e imunopatogênese da dengue em lactentes e adultos

Após a inoculação do DENV no hospedeiro humano, diversos mecanismos de defesa são rapidamente iniciados (MURPHY; WHITEHEAD, 2011). Na pele, células infiltradas (tais como, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos) e células residentes (queratinócitos e fibroblastos), presentes de forma abundante no epitélio, participam na produção de diversas citocinas pró-inflamatórias para combate ao vírus (RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010).

As respostas de interferon (IFN) do tipo I (α e β) constituem um dos principais mecanismos do sistema imune inato na defesa do hospedeiro contra a infecção pelo vírus (GREEN et al., 2014; NAVARRO-SANCHEZ et al., 2005). A produção de IFN do tipo I é iniciada após o reconhecimento do RNA viral por receptores de reconhecimento padrão (RRP) - tais como os receptores Toll-like (TLR) e lectinas do tipo C - expressos em células de origem mielóide e sensores intracelulares presentes no citoplasma, tais como, as helicases MDA5 (proteína do gene associado a diferenciação do melanoma 5) e RIG-I (gene I induzível por ácido retinóico) (GREEN et al., 2014). A secreção de IFN- α/β pelas células infectadas pelo vírus resulta na liberação de sinais de alerta para as células adjacentes, sinalizando que uma infecção está ocorrendo, e na indução autócrina de uma resposta celular antiviral mediante a produção de proteínas antivirais e citocinas pró-inflamatórias (GREEN et al., 2014; NAVARRO-SANCHEZ et al., 2005).

A resposta imune humoral ao vírus se inicia aproximadamente seis dias após a picada do mosquito infectado pelo DENV. Diversos estudos têm demonstrado que a resposta de anticorpos ao DENV apresenta um papel dual no controle da infecção, podendo atuar mediando neutralização do vírus e/ou aumentando a infectividade do DENV *in vivo* e *in vitro* (CHAU et al., 2008; HALSTEAD, 2014; MOI et al., 2012; NG et al., 2014; SHRESTA et al., 2006). Os anticorpos antidengue produzidos são principalmente direcionados contra as glicoproteínas E e prM expostas na superfície do DENV. Anticorpos direcionados para a proteína não-estrutural NS1, que pode ser encontrada expressa na superfície das células infectadas e como um fator solúvel secretado por essas células, também são produzidos (VALDES et al., 2000; WAHALA et al., 2011).

A produção de anticorpos antidengue apresenta-se de forma distinta entre aqueles que apresentaram infecções primárias e secundárias (MURPHY; WHITEHEAD, 2011). Em infecções primárias, a imunoglobulina M (IgM) é usualmente detectada cinco ou mais dias após o início dos sintomas, enquanto que a imunoglobulina G (IgG) é detectada em baixos níveis após cerca de 10 a 15 dias do início da infecção. Ao contrário, em infecções secundárias, os anticorpos IgG são detectados em níveis elevados na fase aguda, enquanto que os anticorpos IgM podem ser indetectáveis ou detectados em títulos mais baixos do que os observados nas infecções primárias (GUZMAN; HARRIS, 2015; MURPHY; WHITEHEAD, 2011).

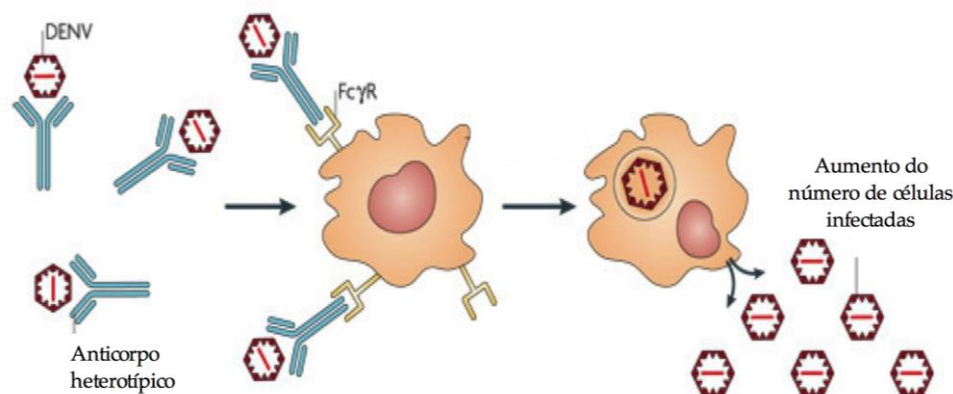
Os mecanismos imunopatogênicos envolvidos na determinação da gravidade da dengue em lactentes e adultos são parcialmente compreendidos (WHITEHORN; SIMMONS, 2011). Diversos fatores de risco para as formas graves da doença têm sido investigados e

incluem idade, sorotipo e genótipo viral e antecedentes genéticos do hospedeiro (GUZMAN; HARRIS, 2015).

As manifestações clínicas associadas à progressão para as formas graves da doença encontram-se normalmente ausentes durante o período febril, quando a carga viral se apresenta em níveis elevados. Paradoxalmente, os sintomas associados a dengue grave surgem quando o vírus está sendo rapidamente eliminado do hospedeiro devido à atuação das respostas imunes inata e adaptativa, sugerindo que a patogênese da dengue grave está intimamente relacionada a resposta imune do hospedeiro (WHITEHORN; SIMMONS, 2011).

O risco aumentado de dengue grave na vigência de infecções secundárias, observado principalmente na população de adultos e adolescentes, tem sido explicado pelo mecanismo de Antibody Dependent Enhancement (ADE) ou imuno-amplificação da infecção dependente de anticorpo (GUZMAN; ALVAREZ; HALSTEAD, 2013; HALSTEAD, 2014). Essa hipótese postula que anticorpos antidengue pré-existent – originados durante uma infecção primária pelo vírus – se ligam a partícula do DENV durante uma infecção subsequente com um sorotipo de dengue distinto. Os anticorpos antidengue originados na infecção primária não possuem a capacidade de neutralizar o vírus. Em vez disso, o complexo vírus-anticorpo formado liga-se a receptores para a porção Fc de IgG presentes nos monócitos circulantes (Figura 1). Assim, esses anticorpos ajudam o vírus a infectar os monócitos de forma mais eficiente. O resultado é um aumento global na replicação do vírus e, em consequência, um maior risco de dengue grave.

Figura 1 – Mecanismo de Antibody dependent enhancement (ADE)



FONTE: WHITEHEAD et al. (2007)

NOTA: Adaptado e traduzido pela autora.

Mecanismos da imunidade celular também têm sido associados à ocorrência de dengue grave durante infecções secundárias (HALSTEAD, 1989). A hipótese conhecida como “Pecado Antigênico Original” postula que, durante uma infecção primária, células T e B de memória com capacidade de gerar respostas imunes sorotipo-específicas e de reatividade cruzada são produzidas. Na vigência de uma infecção secundária por um sorotipo distinto, a expressão de epítomos virais nas células infectadas desencadeia a ativação de células T e B de memória de reatividade cruzada, o que resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias e no desencadeamento de uma resposta imune deletéria, com capacidade de induzir o extravasamento plasmático (ROTHMAN, 2011). A ativação de células T de memória com baixa afinidade para o sorotipo da infecção atual e alta afinidade para o sorotipo da infecção prévia tem sido reportada em diversos estudos, estando os níveis de ativação das células T correlacionados com a gravidade da doença (MONGKOLSAPAYA et al., 2006).

Um dos principais marcos da patogênese da dengue é a perda de integridade endotelial, como um resultado da resposta imune anormal contra o vírus. Alguns estudos clínicos têm demonstrado que níveis de citocinas e mediadores imunes tais como TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, MCP-1, IFN- γ e IFN- α estão significativamente aumentados nos indivíduos que apresentam os sintomas graves da doença. O papel das citocinas no aumento da permeabilidade vascular tem sido demonstrado principalmente em estudos utilizando modelos de murinos. Postula-se que a tempestade de citocinas produzida durante uma infecção secundária seria induzida pela ativação de elevado número de células T de reatividade cruzada e baixa avidéz através do fenômeno do pecado antigênico original. Essas células T de baixa avidéz apresentam degranulação sub-ótima, que resulta em alterada produção de citocinas, atividade citolítica e consequente ativação massiva do sistema imune (ROTHMAN, 2011).

As hipóteses que explicam a imunopatogênese da dengue grave – ADE, pecado antigênico original e produção exacerbada de citocinas – não são mutuamente exclusivas e, possivelmente, tanto a resposta de anticorpos como a resposta de células T, possuem um papel na progressão da dengue para os casos graves, especialmente em indivíduos que experimentam uma infecção secundária pelo DENV. No entanto, embora a proposição de que uma resposta aberrante de células T de reatividade cruzada explique o papel da imunidade celular na determinação da gravidade da doença em indivíduos expostos a uma infecção secundária pelo vírus, essa hipótese não explica as observações dos casos graves durante uma primo-infecção, especialmente na população de lactentes.

A ocorrência de dengue grave em lactentes que experimentam uma infecção primária, especialmente em crianças nascidas de mães com imunidade a dengue (ENDY et al., 2004; LAOPRASOPWATTANA et al., 2005; LIBRATY et al., 2009) tem sido explicada pelo mecanismo do ADE. Diversos estudos, conduzidos principalmente em populações asiáticas, têm confirmado essa hipótese e demonstrado uma associação entre o perfil epidemiológico da dengue grave na população infantil e ocorrência de ADE *in vitro* mediado por anticorpos materno-adquiridos (CHAU et al., 2008; CHAU et al., 2010; LIBRATY et al., 2009). Estudo conduzido no Vietnã com crianças saudáveis nascidas de mães imunes a dengue mostrou que amostras de plasma de crianças com seis meses de idade possuíam a capacidade de aumentar significativamente a infectividade do vírus dengue *in vitro* pelo mecanismo de ADE quando comparado com plasma de crianças coletado ao nascimento ou aos 12 meses de idade (CHAU et al., 2008). Igualmente, estudos recentes em crianças entre cinco e dez anos demonstram que a infecção pelo DENV de células dendríticas e macrófagos através mecanismo de ADE resulta em um aumento nos níveis de TNF- α e IL-6, levando a uma alteração na resposta de citocinas, e na inibição da indução de respostas de IFN- γ (CHAREONSIRISUTHIGUL et al., 2007).

Aliado à infecção celular via ADE mediada por anticorpos materno-transferidos, outros fatores intrínsecos desse grupo populacional podem contribuir para progressão da dengue para as formas graves da doença. O aumento da susceptibilidade de lactentes a diversas infecções virais tem sido atribuído à deficiência na secreção de IFN- γ e reduzida resposta de células T, resultando em replicação viral de forma irrestrita. Em lactentes, células dendríticas expressam baixos níveis de moléculas de reconhecimento de antígenos, reduzida habilidade de produção de IL-12 e consequente limitada ativação de moléculas das vias de sinalização celular (JAIN; CHATURVEDI, 2010). Adicionalmente, células T reg (regulatórias) encontram-se em níveis elevados em lactentes quando comparado a população de crianças e adulta. Essas células possuem a capacidade de bloquear a ativação de células T e inibir as respostas imunes antivirais, contribuindo para a persistência viral e rápida progressão da doença (CHATURVEDI et al., 2007).

Com relação à resposta imune humoral, a maior parte dos anticorpos encontrados em lactentes são de origem materna, havendo declínio nos níveis desses anticorpos a partir do nascimento. A imunidade humoral a vírus e outros patógenos em lactentes apresenta resposta de anticorpos de início tardio e menor duração, com produção de baixos níveis de anticorpos quando comparado ao indivíduo adulto. Diferenças na produção das subclasses de IgG entre adultos e lactentes também são observadas. Nos lactentes, as subclasses de IgG1 e IgG3 atingem níveis equivalentes aos da população adulta em torno do segundo ano de vida,

enquanto IgG4 atinge níveis semelhantes aos adultos em torno do sexto ano de vida. Para a subclasse IgG2, a produção parece ser ainda mais tardia, e os níveis nos lactentes se equiparam aos níveis dos adultos apenas a partir dos 12 anos de idade (BASHA; SUREDRAN; PICHICHERO, 2014). O quadro 4 apresenta uma síntese dos fatores imunes possivelmente envolvidos na imunopatogênese da dengue grave em lactentes, crianças e adultos.

Quadro 4 - Comparação de fatores imunes que contribuem para imunopatogênese da dengue grave em lactentes, crianças e adultos.

Características	Lactentes (1-11 meses)	Criança (1-14 anos)	Adultos (>15 anos)	Referências
Frequência de dengue grave	64%	55%	36%	HAMMOND et al. (2005)
Tipo de infecção	Infecção primária (~100%)	Infecção secundária (50-95%)	Infecção secundária (90%)	HAMMOND et al. (2005)
ADE (<i>Antibody dependent enhancement</i>)	IgG materno-transferida	IgG produzida infecção primária	IgG produzida infecção primária	HAMMOND et al. (2005)
Capacidade de produzir citocinas pelas células T	Baixa	Alta	Alta	HARTIGAN-O'CONNOR et al. (2007)
Proporção células CD4/ CD8	Alta	Baixa	Baixa	HARTIGAN-O'CONNOR et al. (2007)
Produção IFN- γ e TNF- α pelas células T de memória e naive	Baixa	Alta	Alta	HARTIGAN-O'CONNOR et al. (2007)
Número de células T regulatórias no sangue e tecidos	Alta	Baixa	Baixa	HARTIGAN-O'CONNOR et al. (2007)
Imunossupressão pelas células T regulatórias	Alta	Baixa	Baixa	HARTIGAN-O'CONNOR et al. (2007)
Resposta de células T antígeno específica	Baixa	Adequada	Adequada	ROWE et al. (2001)

FONTE: JAIN; CHATURVEDI (2010)

NOTA: Adaptado e traduzido pela autora.

2.4 Transferência placentária de imunoglobulinas G (IgG)

As imunoglobulinas (Ig) são moléculas glicoprotéicas sintetizadas e excretadas pelos plasmócitos, células plasmáticas originadas a partir de linfócitos B ativados, em resposta à estimulação antigênica. Cinco classes de imunoglobulinas - IgM, IgG, IgA, IgE e IgD – são

reconhecidas no soro humano e se diferenciam pelas suas propriedades biológicas, localização funcional e resposta aos diferentes antígenos (VIDARSSON; DEKKERS; RISPENS, 2014). A IgG é a imunoglobulina que se apresenta em níveis mais elevados no soro e a única que possui a capacidade de atravessar a barreira placentária, exercendo importante função na adaptação do neonato ao ambiente extra-uterino e proporcionando proteção contra agentes infecciosos nos primeiros meses de vida (CHUCRI et al., 2010).

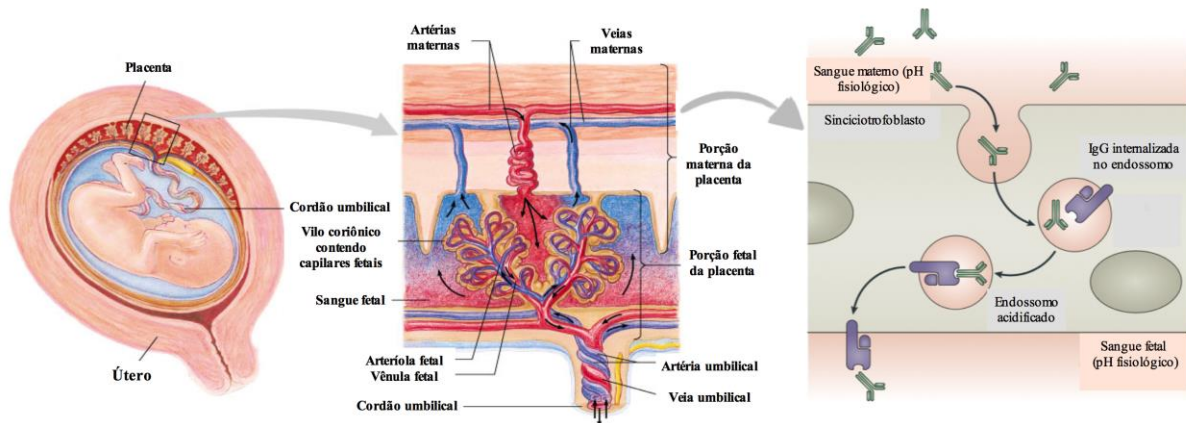
Para atingir a circulação fetal, a molécula de IgG materna precisa ultrapassar duas barreiras histológicas: o sinciciotrofoblasto e as células endoteliais dos capilares fetal. Diversas substâncias, incluindo nutrientes e solutos, são eficientemente transferidas de forma ativa ou passiva através da placenta, sendo esse mecanismo de transferência essencial para o crescimento e desenvolvimento do feto (PALMEIRA et al., 2012). Moléculas de baixo peso molecular (<500 Dáltons), tais como íons e aminoácidos, usualmente atravessam a barreira placentária através do processo de difusão. Por outro lado, moléculas com alto peso molecular são incapazes de cruzar os tecidos placentários, com exceção das moléculas de IgG, que possuem massa molecular de aproximadamente 160kDa (kiloDaltons) (PALMEIRA et al., 2012).

A transferência placentária de IgG ao feto é um processo ativo, seletivo e mediado por um receptor específico para a porção Fc de IgG, denominado receptor neonatal (FcRn). A molécula de FcRn possui em sua estrutura uma região de cadeia α (alfa) composta por uma glicoproteína integral de membrana, que se encontra covalentemente associada a uma região de β 2-microglobulina. Diferente dos demais receptores que possuem habilidade para se ligar a porção Fc de IgG, tais como Fc γ R, FcRn se liga às moléculas de IgG de maneira pH-dependente e apresenta alta afinidade a IgG em pH ácido (PALMEIRA et al., 2012; RATH et al., 2015; ROOPENIAN et al., 2007; STAPLETON et al., 2011).

O processo de transferência de IgG ao feto se inicia na face materna do sinciciotrofoblasto que, banhado pelo sangue da mãe, internaliza o soro contendo IgG nos endossomos. A acidificação gradual dos endossomos permite a interação entre as moléculas de IgG e o receptor FcRn presente no interior desse compartimento. O FcRn se liga com alta afinidade a porção Fc da IgG materna na presença do pH acidificado, o que permite a proteção das moléculas de IgG contra a ação de enzimas lisossomais. Em seguida, a vesícula endossomal se funde com a membrana na face fetal do sinciciotrofoblasto, onde o pH fisiológico promove a dissociação da molécula de IgG do receptor FcRn (Figura 2). A IgG acessa então o endotélio fetal e, posteriormente, a circulação fetal. O receptor, por sua vez,

pode ser reciclado para a membrana materna, onde irá executar novas rodadas de transcitose (PALMEIRA et al., 2012; ROOPENIAN et al., 2007).

Figura 2 – Transferência placentária de IgG mediada pelo receptor FcRn



FONTE: KANE; ACQUAH (2009); ROOPENIAN et al. (2007)

NOTA: Adaptado e traduzido pela autora.

O transporte de IgG da mãe ao conceito se inicia na 13^a semana gestacional e aumenta progressivamente durante a gestação. Um aumento significativo na concentração de IgG no feto pode ser observado entre a 17^a e 22^a semana gestacional e entre a 28^a e 32^a semana, quando os níveis de anticorpos no feto chegam a aproximadamente 10% e 50% da concentração materna (MALEK et al., 1996; PALMEIRA et al., 2012). Esses níveis continuam a aumentar durante o terceiro trimestre e nos recém-nascidos a termo os níveis de IgG podem exceder a concentração materna.

2.4.1 Transferência placentária e cinética de anticorpos dengue-específicos no primeiro ano de vida

A eficiente transferência placentária de IgG dengue-específica ao feto tem sido demonstrada por diversos estudos conduzidos em pares mãe-cordão, especialmente em populações asiáticas (ARGOLO et al., 2013; CHAU et al., 2008; CHAU et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 1994; KHAMIM et al., 2015; LEITE et al., 2014; PENGSA et al., 2006; SIMMONS et al., 2007; WATANAVEERADEJ et al., 2003). Igualmente, a cinética de declínio dos anticorpos dengue-específicos materno-transferidos e suas implicações na determinação da gravidade da dengue durante a infância tem sido explorada por estudos prospectivos conduzidos em lactentes na Ásia.

Em uma coorte prospectiva conduzida no Vietnã, Simmons et al. (2007) ao estudar a dinâmica dos anticorpos antidengue materno-transferidos durante o primeiro ano de vida, observou que, entre as mães imunes a dengue, 100% das amostras de cordão umbilical possuíam níveis detectáveis de IgG reativa ao vírus. Os níveis de IgG antidengue permaneceram detectáveis em 98% dos lactentes aos 6 meses de idade; 84%, aos 9 meses, e em 53%, aos 12 meses de vida (SIMONNS et al., 2007).

Nesse mesmo país, Chau et al. (2009), ao avaliar pares de mãe-cordão incluídos em uma coorte prospectiva acompanhada entre 2006-2007, demonstrou que níveis de IgG total e de IgG dengue-específica foram significativamente maiores no cordão umbilical do que nas amostras maternas. Igualmente, os títulos de anticorpos neutralizantes para todos os sorotipos do vírus encontravam-se mais elevados no cordão do que na mãe, o que sugere que o transporte ativo de IgG da mãe ao concepto se dá de forma independente da especificidade sorotipo-específica (CHAU et al., 2009). Curiosamente, durante o seguimento das crianças inseridas nesta coorte, foi identificado um padrão distinto de declínio dos anticorpos com capacidade de neutralizar o vírus, mensurados pelo teste de neutralização, quando comparado aos anticorpos com a capacidade de se ligar a molécula viral, detectados pelo ensaio imunoenzimático do tipo ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Aos 6 meses de idade, anticorpos neutralizantes sorotipo-específicos foram detectados em apenas 10% das amostras. Ao contrário, anticorpos que se ligam ao vírus foram detectados por um período de tempo mais prolongado, sendo mensurados por até 12 meses em cerca de 20% dos lactentes (CHAU et al., 2009).

Em Bangkok, Tailândia, de um total de 219 pares mãe-cordão incluídos em uma coorte prospectiva, 93,6% e 95% das amostras de mãe e cordão umbilical possuíam anticorpos para dengue. No primeiro ano de vida, a proporção de lactentes com níveis indetectáveis de anticorpos sorotipo específicos para os quatro sorotipos do vírus foi de 5,3%, 26,9%, 79,8%, 94,5% e 100% no terceiro, sexto, nono, décimo segundo e décimo oitavo mês de vida, respectivamente. Nesse estudo, embora a cinética de declínio dos anticorpos sorotipo específicos tenha se comportado de maneira similar, uma queda acentuada nos níveis de IgG antidengue foi observada entre o terceiro e o sexto mês de vida, seguido por uma queda mais gradual no segundo semestre. A média do títulos de anticorpos dengue-específicos foi de 6,8 no cordão umbilical e esses níveis declinaram para 4,7, 1,3, 0,2 no 3º, 6º e 9º mês de vida, respectivamente (PENGSAA et al., 2006).

Panhuis et al. (2011) utilizaram dados de uma coorte de neonatos acompanhada em Bangkok, Tailândia, para avaliar a heterogeneidade do declínio nos níveis de anticorpos

maternos transferidos durante o primeiro ano de vida. Esses autores demonstraram que os níveis de anticorpos neutralizantes para os quatro sorotipos do vírus declinam em duas fases distintas, havendo uma queda acentuada nos seus níveis entre o nascimento e o terceiro mês de vida e um declínio mais gradual em idades mais avançadas. Igualmente, os autores encontraram uma associação significativa entre os títulos de anticorpos detectados ao nascimento e as taxas de declínio desses anticorpos, e mostraram que altos níveis de anticorpos ao nascimento foram significativamente associados a taxas de declínio mais rápidas durante o primeiro ano de vida (PANHUIS et al., 2011).

Embora as subclasses de IgG1 e IgG4 antidengue tenham sido implicadas na patogênese da dengue grave em lactentes e adultos (KORAKA et al., 2001; THEIN et al., 1993), apenas um estudo explora a transferência placentária das subclasses de IgG ao concepto. Nesse estudo, Watanaveeradej et al. (2003), ao avaliar a transferência de IgG antidengue em 250 pares mãe-cordão verificou que os níveis das subclasses de IgG no soro materno variou entre 53,1mg/dL, para a subclasses IgG1, e 0,14 mg/dL, para a IgG3. Os autores não encontraram diferenças significativas na transferência das diferentes subclasses, exceção da subclasse IgG3. Para essa subclasse, maiores níveis foram encontrados na amostra materna quando comparada a amostra do cordão umbilical (0,14mg/dL versus 0,11mg/dL; $p < 0.001$).

No Brasil, três estudos avaliaram a transferência placentária de IgG dengue-específica em pares mãe-cordão. Estudo conduzido na década de 1990 na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, após a primeira epidemia de dengue no país pelo sorotipo DENV-1, avaliou a presença de anticorpos IgG antidengue no momento de admissão ao parto em 50 gestantes e confirmou a positividade antidengue em 10 (20%) dessas gestantes. A transferência placentária de IgG antidengue foi confirmada em todas as gestantes positivas (FIGUEIREDO; CARLUCCI; DUARTE, 1994). Estudo conduzido por Argolo et al. (2013), em Goiânia, em 505 pares de mãe-cordão durante uma epidemia de dengue ocorrida entre 2009 e 2010, encontrou uma prevalência de IgG antidengue de 53,9%. Entre os neonatos, a soropositividade de IgG antidengue foi de 55%, sendo a co-positividade dos pares mãe-cordão de 99,3% (Índice Kappa=0.96). Diferente do perfil observado na região central, o estudo conduzido nos pares mães-cordão da população inseridos nessa tese, encontrou uma prevalência de 95,1% de IgG dengue-específica entre as 405 amostras maternas testadas e verificou uma co-positividade de IgG nos pares mãe-cordão de 95,4% (LEITE et al., 2014).

Apesar dos elevados níveis de circulação do vírus da dengue no Brasil e da alta prevalência de IgG antidengue entre as gestantes brasileiras, particularmente na região

Nordeste, a cinética de declínio dos anticorpos antidengue materno-transferido durante os primeiros anos de vida nas crianças brasileiras ainda é desconhecida.

3 OBJETIVOS



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar o perfil de imunidade materna a dengue, a transferência placentária e cinética de anticorpos dengue específicos materno-transferidos e sua relação com a atividade ADE (Antibody dependent enhancement) em uma coorte de crianças no Nordeste do Brasil, seguidas no primeiro ano de vida, entre 2011 e 2014.

3.2 Objetivos específicos

- a) Estimar a prevalência sorotipo específica nas gestantes e comparar os títulos de anticorpos sorotipo específicos nos pares de amostras mãe-cordão;
- b) Determinar e comparar os títulos de anticorpos IgG dengue-específicos, das subclasses de IgG (IgG1 e IgG4) dengue-específicas e dos níveis de IgG total nos pares mãe-cordão;
- c) Investigar a relação entre níveis de IgG total maternos e imunidade materna prévia a dengue na transferência de IgG total e anticorpos antidengue ao neonato;
- d) Estimar a taxa de declínio dos anticorpos IgG dengue-específicos em uma subamostra dos lactentes da coorte acompanhadas durante o primeiro ano de vida;
- e) Estimar a taxa de declínio dos anticorpos neutralizantes sorotipo específicos em uma subamostra dos lactentes da coorte acompanhadas durante o primeiro ano de vida;
- f) Determinar a cinética de atividade ADE dos anticorpos antidengue materno transferidos em uma subamostra de crianças acompanhadas até o primeiro ano de vida.

4 MATERIAIS E MÉTODOS



4 MATERIAIS E MÉTODOS

Essa pesquisa é parte de um estudo de coorte de nascimento prospectivo conduzido entre março de 2011 e junho de 2014 em um hospital de referência na cidade do Recife. O estudo incluiu dois delineamentos: um estudo de corte seccional, para caracterização da imunidade antidengue sorotipo específica nas gestantes e da transferência placentária de anticorpos antidengue ao neonato; e um estudo longitudinal, prospectivo, para avaliar a cinética dos anticorpos antidengue materno-transferidos e sua relação com a atividade ADE mensurada *ex vivo* em uma subamostra das crianças incluídas na coorte, em diferentes faixas etárias.

4.1 Características da área de estudo

A coorte de nascimento foi estabelecida no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP). O IMIP é um centro de referência assistencial em diversas especialidades médicas, que atende a população usuária do Sistema Único de Saúde (SUS), além de ser centro de formação e treinamento de profissionais de saúde na Região Nordeste do país. A área de estudo compreende a cidade do Recife, Pernambuco, com uma população de 1.561,659 habitantes, composta de 94 bairros, distribuídos em seis regiões político-administrativas chamadas de Distritos Sanitários (DS) (IBGE, 2010). No município, um inquérito sorológico de base populacional constatou que cerca de 90% da população adulta apresentava marcadores de infecção prévia pelo vírus dengue, sugerindo elevados níveis de transmissão na cidade (BRAGA et al., 2010). O número de nascidos vivos foi de 21,796, em 2010 (BRASIL, 2013).

No estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil, e particularmente na cidade do Recife, os registros de ocorrência de dengue datam de 1987. Desde então, o estado tem experimentado graves epidemias da doença, com registros de circulação dos sorotipos DENV-1, 2, 3 e 4, seguindo a mesma dinâmica de introdução e circulação dos sorotipos observada no restante do país (CORDEIRO et al., 2007; MONTENEGRO et al., 2006). No ano de 2015, foram registrados 99,938 casos de dengue distribuídos em 185 municípios do Estado, o que representa um aumento de 549,7% em relação ao número de casos notificados no mesmo período no ano de 2014 (PERNAMBUCO, 2015). A cidade do Recife foi o município com maior número de registros da doença, totalizando um número de 22,545 casos notificados. Todos os sorotipos virais foram isolados no estado em 2015.

4.2 Recrutamento e critérios de inclusão e exclusão

O recrutamento das gestantes, que constituíram a linha de base desse estudo, foi realizado na maternidade e no setor de pré-natal do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), no período de março de 2011 a maio de 2012. Os critérios de inclusão foram: gestantes de baixo risco, residentes no Recife. Foram excluídas as gestantes de alto risco, não residentes na cidade do Recife ou que pretendiam se mudar no período de um ano e que não concordaram com o seguimento do recém-nascido.

4.3 Tamanho da amostra

O cálculo amostral para o estudo de coorte foi feito utilizando fórmula para cálculo de tamanho de amostra para estimativa de proporções e considerando uma taxa bruta anual de nascimento de 1,5% no Recife, uma incidência de dengue de 0,05 e margem de erro (ME) de 0,05, obtendo-se um $n=300$ gestantes. Considerando um percentual de 25% de perdas durante o recrutamento e o seguimento da coorte, foram recrutadas inicialmente >375 gestantes.

Para o estudo de imunidade antidengue sorotipo específica nas gestantes, transferência placentária de IgG dengue-específica e cinética de anticorpos materno-transferidos o cálculo do tamanho da amostra foi feito para se estimar uma diferença de proporções (prevalência de anticorpos) para o declínio dos anticorpos materno transferidos na ordem de 90 a 70% do 2º ao 6º mês de vida, com um valor de alfa de 5% e beta de 20%, obtendo-se um $n=72$ crianças em cada grupo. Considerando um percentual de 30% de perdas durante o seguimento da coorte, foram incluídos no estudo, no mínimo, 100 crianças em cada grupo.

Para o estudo da cinética de neutralização e atividade ADE, foi selecionada uma subamostra aleatória de espécimes de soro de crianças representativa dos seguintes períodos: ao nascimento (cordão umbilical), 2º, 4º, 6º, 8º, 10º, 12º meses, sendo 30 amostras de soro para cada ponto no tempo, o que totaliza um n de 210.

4.4 Coleta de dados

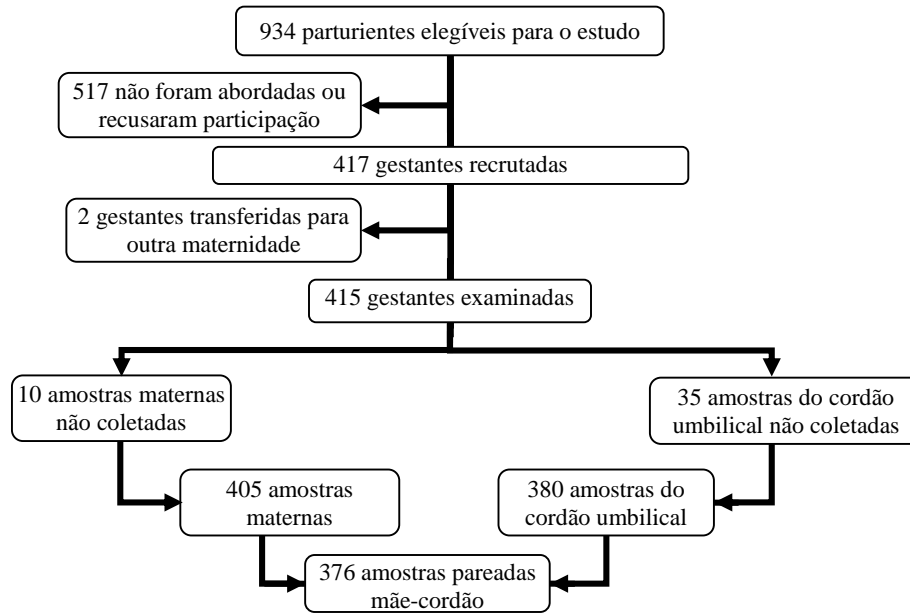
4.4.1 Linha de base da coorte

As gestantes foram contatadas durante o último trimestre da gestação, no momento da consulta no pré-natal, ou no momento da admissão para o parto na maternidade, para a obtenção do consentimento informado e a realização de entrevista para levantamento de dados pessoais e história reprodutiva. As gestantes contatadas no pré-natal e que aceitaram participar da pesquisa foram referenciadas à maternidade do IMIP para o parto.

No momento de admissão para o parto na maternidade, uma amostra de sangue venoso da mãe foi obtida em tubos de coleta de sangue a vácuo, com gel separador ativador de coágulo, para obtenção do soro. Igualmente, uma amostra de sangue do cordão umbilical foi coletada, por gotejamento, imediatamente após o parto. Os tubos contendo as amostras foram etiquetados com o nome do paciente, data e hora da coleta, acondicionados a uma temperatura de 4°C e, posteriormente, transportados ao laboratório, onde foi submetido à centrifugação a 3,000 rpm por 5 minutos para separação do soro. As amostras de soro obtidas foram aliquotadas em criotubos, rotuladas e acondicionadas em freezer a -70°C.

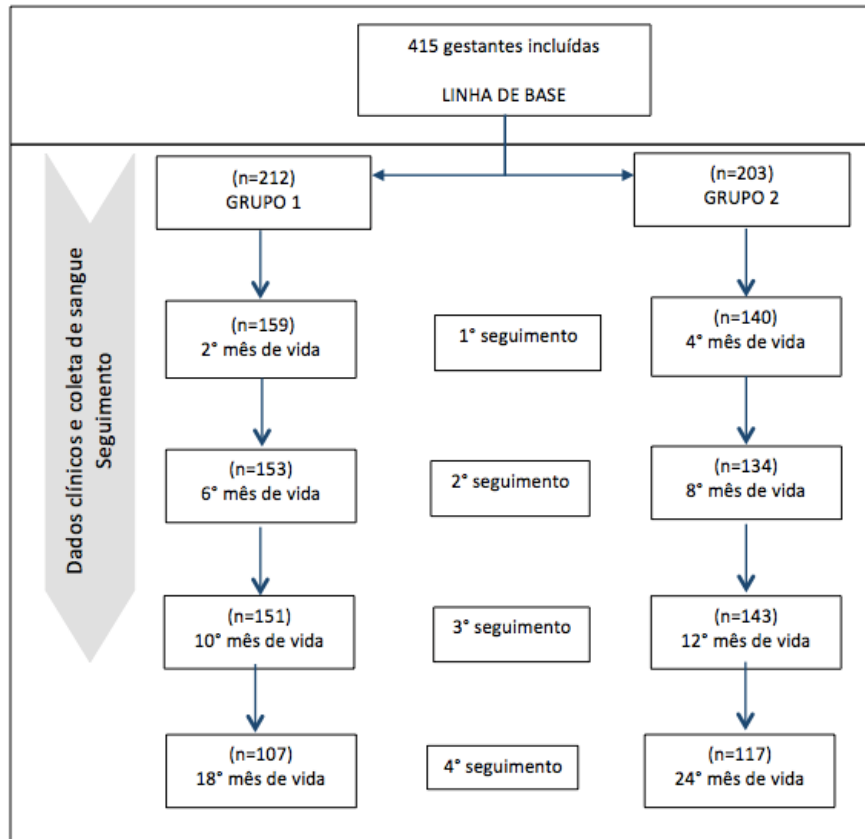
Após o parto, dados maternos sobre sintomas clínicos, episódio de dengue recente e/ou recordatório de episódios febris recentes foram obtidos mediante entrevista. Dados clínicos do neonato tais como peso ao nascer, Apgar e sexo, também foram coletados mediante consulta ao prontuário da criança.

Um total de 934 gestantes de baixo risco foi admitido para o parto no IMIP durante o período de recrutamento da linha de base da coorte (Março/ 2011 a Maio/ 2012). A figura 3 apresenta o fluxograma do recrutamento das gestantes durante o estudo. Das 934 gestantes que atendiam aos critérios de inclusão, 417 foram recrutadas. Duas gestantes foram transferidas e realizaram o parto em outras maternidades, totalizando um n de 415 parturientes examinadas e incluídas no estudo. Entre essas, 405 amostras de sangue materno e 380 amostras de sangue do cordão umbilical foram coletadas (Figura 3). No total, 376 amostras de sangue pareadas mãe-cordão foram recrutados e inseridos nessa pesquisa.

Figura 3 - Fluxograma de recrutamento das participantes do estudo.

4.4.2 Seguimento da coorte de crianças

As crianças da coorte foram acompanhadas durante os primeiros 24 meses de vida, a contar a partir da data de nascimento. As crianças foram divididas em dois grupos de forma aleatória e avaliadas em momentos programados: no 2º, 6º, 10º e 18º mês de vida, para as crianças inseridas no Grupo 1; e no 4º, 8º, 12º e 24º mês, no Grupo 2 (Figura 4). Durante as avaliações programadas, foram coletados dados clínicos da criança (interrogatório sintomatológico, calendário vacinal e dados antropométricos), com ênfase na história de quadros febris agudos ocorridos no período entre as avaliações. Além disso, em cada avaliação foi realizada a coleta de uma amostra de sangue venoso, de cerca de 2mL, para a realização dos testes sorológicos. No total, 415 gestantes foram recrutadas para a pesquisa e tiveram suas crianças acompanhadas. No grupo 1, um n de 212 crianças foram acompanhadas, enquanto no grupo 2 foram avaliadas um n de 203 crianças.

Figura 4 – Fluxograma do seguimento da coorte.

FONTE: BRAGA et al. (2016)

NOTA: Adaptado e traduzido pela autora.

4.4.3 População de estudo

A determinação da imunidade materna ao DENV e a transferência placentária de anticorpos IgG total e dengue-específicos ao neonato foram investigados nas 376 amostras pareadas mãe-cordão recrutados durante a linha de base da coorte.

A avaliação da cinética dos anticorpos antidengue materno transferidos foi conduzida em uma subamostra das crianças incluídas na coorte, em diferentes faixas etárias. Foram incluídas crianças nascidas de mães que possuam imunidade monotípica para o DENV-3, mensurada durante o parto. Foram excluídas as amostras de crianças que possuam evidências sorológicas de infecção recente pelo vírus dengue, mensuradas por detecção de IgM e/ou RT-PCR.

4.5 Descrição dos principais procedimentos laboratoriais

Os testes laboratoriais para determinação da imunidade sorotipo específica ao DENV nas amostras inseridas no estudo foram realizados no Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE), do CPqAM. Os ensaios para detecção de IgG e subclasses de IgG (IgG1 e IgG4) dengue-específicos, a quantificação dos níveis de IgG total e os ensaios de ADE foram conduzidos no Center for Vaccine Research, na Universidade de Pittsburgh, Estados Unidos da América (EUA). O quadro 5 apresenta uma síntese das medidas de laboratório mensuradas no estudo.

Quadro 5 - Descrição das medidas laboratoriais mensuradas no estudo.

Tipo de anticorpo	Ensaio laboratorial	Descrição
IgG DENV-específico	Ensaio imoenzimático <i>in house</i> do tipo ELISA	<ul style="list-style-type: none"> - Anticorpos da classe IgG que possuem a capacidade de se ligar a diferentes antígenos expostos na superfície da partícula viral (E, prM/M); - Não diferencia anticorpos que possuem ou não a habilidade de neutralizar o vírus; - Não distingue quanto a especificidade sorotipo-específica; - Não distingue quanto a subclasse de IgG específica.
Subclasse de IgG (IgG1 e IgG4) DENV-específico	Ensaio imoenzimático <i>in house</i> do tipo ELISA	<ul style="list-style-type: none"> - Anticorpos da classe IgG que possuem a capacidade de se ligar a diferentes antígenos expostos na superfície da partícula viral (E, prM/M); - Diferencia quanto a subclasse de IgG específica (IgG1 ou IgG4). - Não diferencia anticorpos que possuem ou não a habilidade de neutralizar o vírus; - Não distingue quanto a especificidade sorotipo-específica;
IgG total	Ensaio imoenzimático <i>in house</i> do tipo ELISA, quantitativo	<ul style="list-style-type: none"> - Anticorpos da classe IgG totais; - Não diferencia anticorpos antígeno-específicos.
Anticorpos neutralizantes dengue-específicos	Teste de neutralização por redução do número de placas (PRNT)	<ul style="list-style-type: none"> - Anticorpos que possuem a habilidade de neutralizar a infecção viral, em sua maioria direcionados a proteína E da partícula viral; - Diferencia quanto ao sorotipo de DENV (DENV1-4); - Não distingue quanto a subclasse de IgG específica (IgG1 ou IgG4).

NOTA: Elaborado pela autora.

4.5.1 Detecção de IgG e subclasses de IgG1 e IgG4 dengue-específicos

As amostras de soro foram testadas para detecção e determinação dos títulos de anticorpos IgG e das subclasses de IgG1 e IgG4 dengue-específicas através de ELISA do tipo sanduíche, com procedimento *in house*. Em síntese, placas de poliestireno de 96 poços (Corning, New York) foram sensibilizadas com 50µL de anticorpo monoclonal 4G2 (anti-envelope *Flavivirus*-específico), diluído a uma concentração de 1µg/ml em tampão carbonato/bicarbonato (0.2M, pH 9.4), e incubadas overnight a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (Tampão fosfato salino [PBS] contendo 0.1% Tween-20; pH 7.4) e bloqueadas com 5% NFDM (Non-fat dry milk) (BIORAD, USA) por 1h a 37°C. Após lavagem, um pool de antígeno para DENV (sorotipos 1-4, preparados em células de inseto C6/36; cada sorotipo foi adicionado a níveis equivalentes de antígeno) diluído em 1% NFDM/PBS foi adicionado a cada poço e as placas foram incubadas por 2h a 37°C. As placas foram novamente lavadas e amostras de soro diluídas serialmente (Diluições iniciando em 1:1,000 para IgG total e IgG1 dengue-específicos; e em 1:50 para IgG4 antidengue) foram adicionadas e as placas incubadas overnight a 4°C. Soros de indivíduos imune e não-imune a DENV foram incluídos como controles positivo e negativo, respectivamente. Após lavagem, as placas foram incubadas por 1h a 37°C com os seguintes anticorpos anti-IgG humano conjugado a peroxidase (HRP), diluído em 1% NFDM/PBS: anti-IgG humano conjugado-HRP (Jackson ImmunoResearch, PA, USA) diluído a 1:96,000, para detecção de IgG dengue-específico; anti-IgG1 humano conjugado-HRP a 1:4,000, para detecção IgG1 antidengue; anti-IgG4 humano conjugado-HRP a 1:4,000, para detecção IgG4 antidengue (ambos da Invitrogen, USA). Após última lavagem, 50µL do substrato TMB (tetrametilbenzidina) (Thermo Scientific, USA) foi adicionado. A reação foi parada pela adição de 25µL de solução para interrupção (Ácido fosfórico) e a absorbância foi lida a um comprimento de onda de 450 nm, usando leitor de placas de ELISA.

4.5.2 Quantificação dos níveis de IgG total

Os níveis de IgG total nos pares de amostras mãe-cordão foram determinadas por meio de ensaio imunoenzimático, com procedimento “*in house*”. Em síntese, microplacas de poliestireno de 96 poços (Corning, New York) foram sensibilizadas com 50µL de anticorpo monoclonal purificado anti-IgG humano (todas as subclasses) (Invitrogen, USA) diluído em tampão carbonato/bicarbonato (0.2M, pH 9,4) a uma concentração de 2,5µg/ml. Após

lavagem com tampão de lavagem (Tampão fosfato salino [PBS] contendo 0.1% Tween-20; pH 7.4), as placas foram bloqueadas com 5% de albumina do soro bovino (BSA) (Sigma, USA) em PBS, por 1 hora a 37°C. As placas foram novamente lavadas e 50µl das amostras de soro e de uma solução IgG humana purificada de concentração conhecida (Sigma, USA), ambos diluídos em tampão de diluição (1% BSA/ PBS), foram adicionados a placa, em duplicata. Amostras de soro foram adicionadas a uma diluição de 1:100.000. Uma curva de concentração com 10 pontos foi estabelecida com a IgG humana purificada, com limite de detecção de 0.976 - 500ng/mL. Após incubação por 2 h a 37°C e três lavagens adicionais, 50µl de anti-IgG humana conjugada a peroxidase (Jackson ImmunoResearch, PA, USA) diluída a 1:48.000 em tampão de diluição foi adicionado a cada poço e as placas foram incubadas por 1h a 37°C. Após última lavagem, 50µL do substrato TMB (tetrametilbenzidina) (Thermo Scientific, USA) foi adicionado. A reação foi parada pela adição de 25µL de solução para interrupção (Ácido fosfórico) e a absorbância foi lida a um comprimento de onda de 450 nm. A concentração de IgG total foi estimada interpolando os valores obtidos em cada amostra na curva padrão gerada com a IgG humana purificada de concentração conhecida. Uma amostra de soro normal (Soro humano do tipo AB; MP, USA) foi incluído em cada placa e usado como controle interno para o teste. Os resultados obtidos em cada amostra de soro foram validados se a concentração do soro normal, mensurado em cada experimento independente, estivesse dentro do coeficiente de variação de 20% (7.4-11.2mg/ml).

4.5.3 Determinação da imunidade sorotipo-específica ao DENV

O perfil imune sorotipo-específico das amostras de soro dos pares mãe-cordão e das crianças inseridas no estudo foi determinado através do teste de neutralização por redução do número de placas (PRNT).

4.5.3.1 *Manutenção da Cultura Celular*

Foram utilizadas células da linhagem Vero (Rim de macaco verde africano), propagadas em garrafas de cultivo de células (T75) a cada 3-4 dias, utilizando-se o meio de cultura MEM (Minimal Essential Medium) (GIBCO), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO) e antibióticos penicilina/estreptomicina a 1% (Invitrogen). As garrafas de células foram mantidas em estufa à 37°C, com atmosfera 5% de dióxido de

carbono (CO₂). As células Vero foram mantidas durante todo o experimento e utilizadas para o crescimento de vírus e preparação das placas para o teste de neutralização.

Para a preparação das placas, a contagem das células Vero foi efetuada em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante vital Trypan blue (SIGMA). Em seguida, suspensões de células Vero a uma densidade de 300.000 células/mL foram distribuídas em placas de 24 poços (NUNC), no volume de 0,5 mL por poço. As placas foram mantidas em estufa à 37°C, a uma atmosfera 5% de CO₂ durante 48 horas até a realização do teste PRNT.

4.5.3.2 Preparação dos Estoques dos Vírus: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4

As amostras de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 pertencem à coleção de vírus do LaViTE e correspondem a amostras de vírus isolados nas epidemias ocorridas no estado de Pernambuco, doadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN-PE). Os isolados utilizados foram: DENV-1 (PE/97-42735), DENV-2 (PE/95-3808), DENV-3 (PE/02-95016) e DENV-4 (PE/10-0081). Amostras de cada sorotipo foram inoculadas em células Vero, crescidas em garrafas T75, mantidas em meio MEM (GIBCO), suplementado com 2% de soro fetal bovino (GIBCO) e 1% penicilina/estreptomicina, e incubadas a 37°C em 5% CO₂, a uma multiplicidade de infecção (moi) de 0.1, por 5-6 dias a 37°C in 5% CO₂. As suspensões de células contendo os vírus foram submetidas ao congelamento e descongelamento e, em seguida, centrifugadas a 2,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes contendo as partículas virais foram coletados, distribuídos em criotubos em alíquotas de 0,5 mL e estocadas à -80°C. Cada suspensão viral foi titulada por ensaio de placa, utilizando células da linhagem VERO, para determinar a diluição adequada para o teste, devendo conter entre 30 e 100 unidades formadoras de placa (UFP).

4.5.3.3 Soroneutralização por redução do número de placas (PRNT)

Inicialmente, as amostras de soro dos foram inativadas por 30 minutos em banho-maria a 56°C. Em seguida, foi realizada a diluição do soro (1:20, 1:80, 1:320 e 1:1280) em MEM utilizando-se microplacas de 96 poços (NUNC), no volume final de 120µl, sendo uma placa para cada sorotipo viral. Após a diluição, 120µl da suspensão viral de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, previamente titulados, com uma concentração de aproximadamente 30 UFP/mL foram adicionados nas placas correspondentes a cada um dos sorotipos.

Após, incubação a 37°C, em 5% de atmosfera de CO₂ por 1 hora, o meio das placas de 24 poços contendo as células Vero foi descartado e 50µL de cada diluição da mistura vírus-soro foi inoculado, em duplicata. As placas foram novamente incubadas a 37°C em 5% CO₂ por 1 hora, para permitir a adsorção do vírus. Após este período, as células foram cobertas com 500µL de meio semi-sólido (MEM 10X concentrado, 10% de SFB, 10% de carboximetilcelulose a 3%, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de Fungizon). Em seguida, as placas foram incubadas por 6-7 dias, à 37°C, em 5% de CO₂. Após incubação, o meio semi-sólido foi descartado das placas de 24 poços e uma solução de formalina a 3,5M foi adicionada (2mL por poço, incubadas por 1 hora) para fixação das células e inativação das partículas virais. Após, descarte da formalina, as células foram coradas com solução (1:50) de cristal violeta (0,5mL/poço). Por fim, as placas foram lavadas em água corrente e, após secagem, as placas formadas foram contadas manualmente.

4.5.3.4 Critérios de positividade e determinação dos títulos de anticorpos

Amostras de soro que apresentaram redução de 50% ou mais no número de placas virais (PRNT50), na menor diluição de soro utilizada (1:20), em comparação com as amostras dos vírus inoculadas sozinhos, foram consideradas positivas. Amostras que não apresentaram redução de, no mínimo, 50% das placas virais na menor diluição de soro utilizada (1:20) foram consideradas negativas.

O percentual de neutralização foi calculado utilizando a fórmula proposta por Vazquez et al. (2003), apresentada a seguir:

$$\% \text{Redução} = [1 - (\text{P amostra} / \text{P vírus controle})] \times 100, \text{ onde P significa contagem de placas.}$$

Para as amostras positivas, os títulos de anticorpos neutralizantes foram calculados, para cada sorotipo, utilizando regressão não-linear e os valores transformados para a escala logarítmica (log₁₀).

4.5.3.5 Validação dos resultados

Para garantir a acurácia e reduzir as variações intra e inter teste, todos os procedimentos laboratoriais referentes ao teste de PRNT foram desenvolvidos pelo mesmo técnico laboratorial. O teste foi executado seguindo um protocolo padronizado e conduzido de

maneira cega e independente, sem que o técnico tivesse conhecimento da caracterização sorológica prévia ou de informações como idade e sexo do indivíduo.

Controles positivos (vírus inoculado na ausência de soro) e negativos (soro de indivíduos sabidamente negativos, com caracterização sorológica previamente determinada) foram incubados para cada um dos vírus. Poços com células não-infectadas também foram utilizados como controle. Os critérios utilizados para validar o resultado do teste foram: integridade da monocamada de células não-infectadas, pouca ou nenhuma redução na contagem de placas dos soros negativos e apropriadas contagem de placas do controle positivo (30-100 placas). Adicionalmente, foram utilizadas cepas virais isoladas de epidemias ocorridas no Estado de Pernambuco para garantir uma melhor caracterização do perfil epidemiológico da área.

4.5.4 Determinação dos níveis de anticorpos mediadores de amplificação da infecção (Enhancing activity – EA)

Os ensaios para detecção de anticorpos mediadores de EA *ex vivo* foram conduzidos seguindo protocolo descrito por Guy et al. (2004), com algumas modificações.

4.5.4.1 Manutenção da cultura de células da linhagem K562

Para a realização dos ensaios de EA, foram utilizadas células derivadas de linhagem monocítica eritro-leucêmica humana K562 (ATCC), cultivadas em meio de manutenção de cultura [RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% penicilina/ estreptomicina, 1% de L-glutamina, 1% de aminoácidos não-essenciais, 1% triptose, 1% sódio piruvato e 0.5% de β -mercaptoetanol] em garrafas T75, mantidas em estufa à 37°C, com atmosfera 5% de dióxido de carbono (CO₂). Para reduzir as variações intra- e inter-teste, todos os ensaios de atividade EA foram realizados utilizando células na mesma passagem celular. Para tanto, as células foram cultivadas em número suficiente e alíquotas contendo um pool celular foram preparadas e estocadas a uma concentração de 0.5×10^6 células/ tubo, em atmosfera de nitrogênio líquido.

4.5.4.2 Ensaio de EA

As células da linhagem K562 foram descongeladas e cultivadas em meio de manutenção a uma concentração de 0.2×10^6 células/ mL, em garrafas de cultura T25, a 37°C e 5% de CO_2 . Após três dias, células foram amplificadas em frascos T75 a uma concentração de 0.2×10^6 células/ mL. Em seguida, as células foram cultivadas (37°C e 5% CO_2) por 4 dias para garantir que a linhagem celular estivesse na fase estacionária de crescimento no dia da realização do experimento. No quarto dia de cultura, um pool de células foi preparado em tubos Falcon 50mL e a suspensão centrifugada por 5 minutos a 1.200rpm. Após duas rodadas de lavagens com meio de manutenção, a solução contendo as células foi ajustada para uma concentração de 0.5×10^6 células/ mL, após contagem utilizando Trypan Blue. A solução contendo as células foi distribuída em tubos de 5mL estéreis (1mL/ tubo), seguido de centrifugação por 5 minutos a 1.200rpm. Após descarte do sobrenadante, as células estavam prontas para infecção.

As amostras de soro das crianças foram inativadas (30 minutos a 56°C) e misturadas à suspensão contendo DENV-2 (protótipo 16681; concentrado por ultracentrifugação), a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0.02, de modo a atingir uma diluição final de 1:10. Controle positivo (soro de indivíduo monotípico para DENV3) e negativo (Soro humano do tipo AB; MP, USA: negativo para dengue por ELISA e PRNT) também foram incluídos. A mistura vírus-soro foi então incubada por 10 minutos a 37°C . Após incubação, a mistura vírus/soro foi inoculada em cultura de células K562, a uma concentração de 1×10^6 células/mL, e novamente incubada por 2 horas (37°C). Em seguida, as células foram cultivadas em meio de crescimento. Após dois dias, o percentual de células infectadas foi determinado por citometria de fluxo, através de marcação intracitoplasmática de proteínas de DENV. Para tanto, as células foram lavadas com tampão FACS (PBS, pH 7.4, contendo 2% soro bovino fetal e 0.1% azida sódica). Em seguida, as células foram fixadas com o kit BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization (BD Biosciences) e, posteriormente, submetidas a marcação por 30 minutos à temperatura ambiente com o anticorpo monoclonal 2H2 (IgG2a de camundongo reativo contra a proteína prM de todos os sorotipos de dengue). As células foram então coradas com anticorpo anti-IgG2a de camundongo conjugado com Alexa fluor 488, por 20 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagem com tampão FACS, foi realizada a leitura no citômetro de fluxo LSR II (BD Biosciences) utilizando o programa FACS Diva (BD Biosciences). Os dados foram analisados com o programa Flowjo versão 8.8.7 (Tree Star, Inc). A atividade ADE foi determinada pela comparação entre o percentual de células

infectadas mensurado na mistura vírus-soro da criança e aquele mensurado na mistura vírus-soro de indivíduo não-imune.

4.6 Definição e categorização das variáveis

O quadro 6 apresenta a definição e categorização das variáveis analisadas no estudo.

Quadro 6 - Definição e categorização das variáveis do estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIZAÇÃO
<i>IgG DENV</i>	Anticorpos IgG dengue-específicos	1. Positivo/ 2. Negativo
<i>IgG DENV titer</i>	Título de anticorpos IgG dengue-específicos (em escala logarítmica)	Variável contínua
<i>IgG1 DENV</i>	Anticorpos da subclasse IgG1 dengue-específicos	1. Positivo/ 2. Negativo
<i>IgG1 DENV titer</i>	Título de anticorpos da subclasse IgG1 dengue-específicos (em escala logarítmica)	Variável contínua
<i>IgG4 DENV</i>	Anticorpos da subclasse IgG4 dengue-específicos	1. Positivo/ 2. Negativo
<i>IgG4 DENV titer</i>	Título de anticorpos da subclasse IgG4 dengue-específicos (em escala logarítmica)	Variável contínua
<i>DENV 1</i>	Anticorpos neutralizantes para o sorotipo DENV 1.	1. Positivo/ 2. Negativo
<i>DENV 2</i>	Anticorpos neutralizantes para o sorotipo DENV 2.	1. Positivo/ 2. Negativo
<i>DENV 3</i>	Anticorpos neutralizantes para o sorotipo DENV 3.	1. Positivo/ 2. Negativo
<i>DENV 4</i>	Anticorpos neutralizantes para o sorotipo DENV 4.	1. Positivo/ 2. Negativo
<i>DV-1titer</i>	Título de anticorpos neutralizantes (em escala logarítmica) para DENV-1.	Variável contínua
<i>DV-2titer</i>	Título de anticorpos neutralizantes (em escala logarítmica) para DENV-2.	Variável contínua
<i>DV-3titer</i>	Título de anticorpos neutralizantes (em escala logarítmica) para DENV-3.	Variável contínua
<i>DV-4titer</i>	Título de anticorpos neutralizantes (em escala logarítmica) para DENV-4.	Variável contínua
<i>Resposta imune</i>	Presença de anticorpos neutralizantes para um ou mais sorotipos virais.	1. Monotípica/ 2. Multitípica
<i>ADEI</i>	Percentual de células infectadas	Variável contínua
<i>IgG total</i>	Quantificação dos níveis de IgG total (mg/mL), expressos em escala logarítmica	Variável contínua
<i>Idade materna</i>	Idade em anos	Variável contínua
<i>Fumo</i>	Relato da gestante de hábito de fumo durante a gravidez atual	1. Sim/ 2. Não
<i>Infec_gest</i>	Ocorrência de eventos infecciosos durante a gestação	1. Sim/ 2. Não

	atual, registrado mediante consulta ao prontuário da gestante por enfermeiras treinadas	Caso sim, descrever
<i>Cort_imuno</i>	Relato pela gestante de uso de imunossupressores ou corticosteroides durante a gestação atual	1. Sim/ 2. Não
<i>Alt_placenta</i>	Presença de alterações placentárias, registrada por enfermeiras imediatamente após o parto	1. Sim/ 2. Não Caso sim, descrever
<i>Peso_neo</i>	Peso do neonato ao nascimento (em gramas)	Variável contínua
<i>Sexo_neo</i>	Sexo do neonato	1. Feminino/ 2. Masculino
<i>Dengue_rec</i>	Presença de marcadores de infecção recente pelo DENV na gestação atual (IgM e/ou RT-PCR)	1. Sim/ 2. Não

NOTA: Elaborado pela autora.

4.7 Análise dos dados

As principais características dos pares mãe-cordão foram descritas. A prevalência de anticorpos IgG antidengue, subclasses de IgG1 e 4 dengue-específica e anticorpos anti-dengue sorotipo específicos nas gestantes e seus conceptos foi determinada. Os títulos dos anticorpos IgG e subclasses IgG1 e IgG4 dengue-específicos e dos anticorpos DENV sorotipo-específico foram estimados através de regressão não-linear e os valores obtidos transformados para escala logarítmica (log10). Títulos de anticorpos maternos e do cordão foram comparados usando teste não-paramétrico para amostras pareadas de Wilcoxon, para os dados com distribuição não-normal. Teste T para amostras pareadas foi utilizado para as distribuições Gaussianas. A eficiência de transferência placentária dos anticorpos foi mensurada como uma razão e calculada usando a seguinte fórmula: Taxa de transferência (TR) = (valor mensurado na amostra cordão/ valor mensurado na amostra materna)*100. A associação entre os níveis maternos e no cordão foram analisados através do coeficiente de correlação de Pearson e Regressão Linear. A análise do declínio dos níveis de anticorpos materno-transferidos foi realizada utilizando teste de Kaplan-Meier. O nível de significância foi fixado em $p \leq 0.05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R programme para Windows (versão R 3.2.1) e o programa GraphPad Prism para Macintosh OS X (versão 6.0e).

4.8 Considerações éticas

As gestantes e parturientes foram esclarecidas sobre os objetivos da pesquisa e convidadas a assinarem um Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), autorizando a sua

participação na pesquisa e a coleta de material biológico. Os resultados dos principais testes laboratoriais realizados foram fornecidos de forma confidencial e entregues aos participantes pessoalmente por um dos membros da equipe de pesquisadores. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ (CEP/CPqAM/FIOCRUZ- 59/10; CAAE-0061.0.095.000-10) (Anexo A). A pesquisa também recebeu aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) (n. 2744, 26 de Dezembro 2010).

5 RESULTADOS



5 RESULTADOS

5.1 Características da população de estudo

Um total de 376 pares de amostra mãe-cordão foi obtido durante o recrutamento da linha de base da coorte e tiveram o perfil de transferência placentária de anticorpos maternos antidengue determinados.

As principais características da população de estudo encontram-se sumarizadas na Tabela 1. A maior parte das gestantes recrutadas era jovem, com idade média de $23,75 \pm 6,23$ anos. Um percentual de 90% das mães não relatou hábitos de fumo durante a gravidez. A ocorrência de eventos infecciosos durante a gestação atual foi registrada em 42,2% das mães e incluíram infecções do trato urinário ($n=136$), hepatite ($n=1$) e sífilis ($n=5$). A presença de alterações na membrana placentária foi observada em 4,5% das mães (Tabela 1).

A distribuição da imunidade antidengue sorotipo específica nas gestantes é apresentada na Tabela 1. A maior parte das mães apresentava imunidade monotípica para o sorotipo DENV-3 (53,7%) ou multítípica para a combinação DENV-3 e DENV-4 (30,6%). Cerca de 10% das gestantes foi negativa para a presença de anticorpos neutralizantes sorotipo específicos. Com relação às características dos neonatos, verificou-se maior frequência de lactentes do sexo feminino (51,9%). A maior parte dos lactentes apresentou peso normal ao nascer, com média de $3,301 \pm 370,07$ gramas (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais características da população de estudo

Características	n= 376
Materna	
Idade (anos), média ± DP	23,75± 6,23
Relato de hábitos de fumo durante a gravidez ¹ , n (%)	35 (10,0)
Ocorrência de eventos infecciosos durante a gravidez ² , n (%)	159 (42,2)
Uso de imunossupressores ou corticosteróides durante a gravidez, n (%)	17 (4,5)
Presença de alterações placentárias, n (%)	17 (4,5)
Imunidade prévia a DENV ³ , n (%)	
Monotípica	
DENV3	202 (53,7)
Multitípica	
DENV3/ DENV4	115 (30,6)
Outras combinações de sorotipos	20 (5,3)
Neonato	
Peso ao nascer (gramas), média ± DP	3,301± 370,07
Sexo feminino, n (%)	195 (51,9)

FONTE: Elaborado pela autora

NOTA: ¹ 27 informações faltantes

² Ocorrência de eventos infecciosos durante a gravidez foi registrada por enfermeiras treinadas

³ Imunidade prévia a DENV foi determinada por PRNT

5.2 Transferência placentária de anticorpos dengue-específicos

O percentual de amostras maternas e do cordão umbilical com níveis detectáveis de IgG dengue-específica, subclasses de IgG1 e IgG4 e anticorpos sorotipo específicos (DENV1-4) são apresentados na Tabela 2. Cerca de 100% das gestantes incluídas no estudo apresentavam anticorpos IgG dengue-específicos e os níveis desses anticorpos foram significativamente mais elevados nas amostras do cordão umbilical (4,99±0,63) do que nas correspondentes amostras maternas (4,82±0,61) [Taxa de Transferência (TR) = 103,8%; p<0,05].

Com relação à transferência placentária de anticorpos neutralizantes sorotipo específicos, pode-se observar uma correlação positiva entre os níveis de anticorpos maternos e do cordão umbilical para os sorotipos DENV-3 (r=0,8479, p<0,0001) e DENV-4 (r=0,7986, p<0,0001). Igualmente, os títulos de anticorpos foram mais elevados nas amostras dos neonatos do que nas correspondentes amostras maternas para os sorotipos DENV-3 (TR = 108,2%; p<0,05) e DENV-4 (TR= 110,3%; p<0,05). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de anticorpos para os sorotipos DENV-1 (TR= 103,6%; p=0,539) e DENV-2 (TR= 92,7%; p=0,234) nos pares mãe-cordão analisados (Tabela 2).

A análise da transferência placentária das subclasses de IgG dengue-específicas foi focada nas subclasses IgG1 e IgG4, devido a sua provável relação com a imunopatogênese da dengue grave e em virtude de sua maior eficiência de transferência materno-fetal quando comparada as demais subclasses. Pode-se observar que mais de 90% das mães IgG positivas apresentaram níveis detectáveis da subclasse IgG1 dengue-específica e que essa subclasse foi eficientemente transferida ao neonato (TR = 103,3, $p < 0,05$; Tabela 2). A subclasse IgG4 foi detectada em cerca de 65% das amostras maternas. No entanto, níveis de IgG4 foram significativamente menores nas amostras dos neonatos quando comparado as amostras maternas (TR=97%; $p < 0,05$), sugerindo que esta subclasse não foi transferida de forma eficiente quando comparada a subclasse IgG1 (Tabela 2).

Tabela 2 - Transferência placentária de anticorpos IgG dengue-específicos, anticorpos neutralizantes sorotipo-específicos (DENV1-4) e subclasses de IgG1 e IgG4 dengue-específicos em 376 pares mãe-cordão.

Ensaio laboratorial	Mães (n=376)		Cordão umbilical (n=376)		Transferência placentária (%) ¹ , média	Valor de <i>p</i>
	Amostras com níveis detectáveis, n (%)	Título de anticorpos (log10), média ± DP	Amostras com níveis detectáveis, n (%)	Título de anticorpos (log10), média ± DP		
IgG DENV-específica	373 (99,2)	4,82±0,61	372 (98,9)	4,99±0,63	103,8	<0,05 ³
Imunidade a DENV ²						
DENV-1	17 (4,5)	1,47±0,24	22 (5,8)	1,48±0,16	103,6	0,539 ³
DENV-2	10 (2,6)	1,51±0,31	9 (2,4)	1,37±0,10	92,7	0,234 ³
DENV-3	333 (88,5)	2,47±0,66	340 (90,4)	2,63±0,69	108,2	<0,05 ³
DENV-4	127 (33,7)	1,56±0,44	151 (40,1)	1,70±0,46	110,3	<0,05 ³
Subclasses de IgG DENV-específica						
IgG1	353 (94,6)	4,31±0,64	354 (95,6)	4,40±0,64	103,3	<0,05 ⁴
IgG4	241 (64,2)	2,56±0,51	213 (56,9)	2,53±0,53	97,0	<0,05 ³

FONTE: Elaborado pela autora.

NOTA: ¹Taxa de transferência placentária = (valor na amostra do cordão umbilical/valor na amostra materna) x 100. Cálculo de TR inclui apenas os pares positivos.

²Imunidade a dengue foi determinada por PRNT

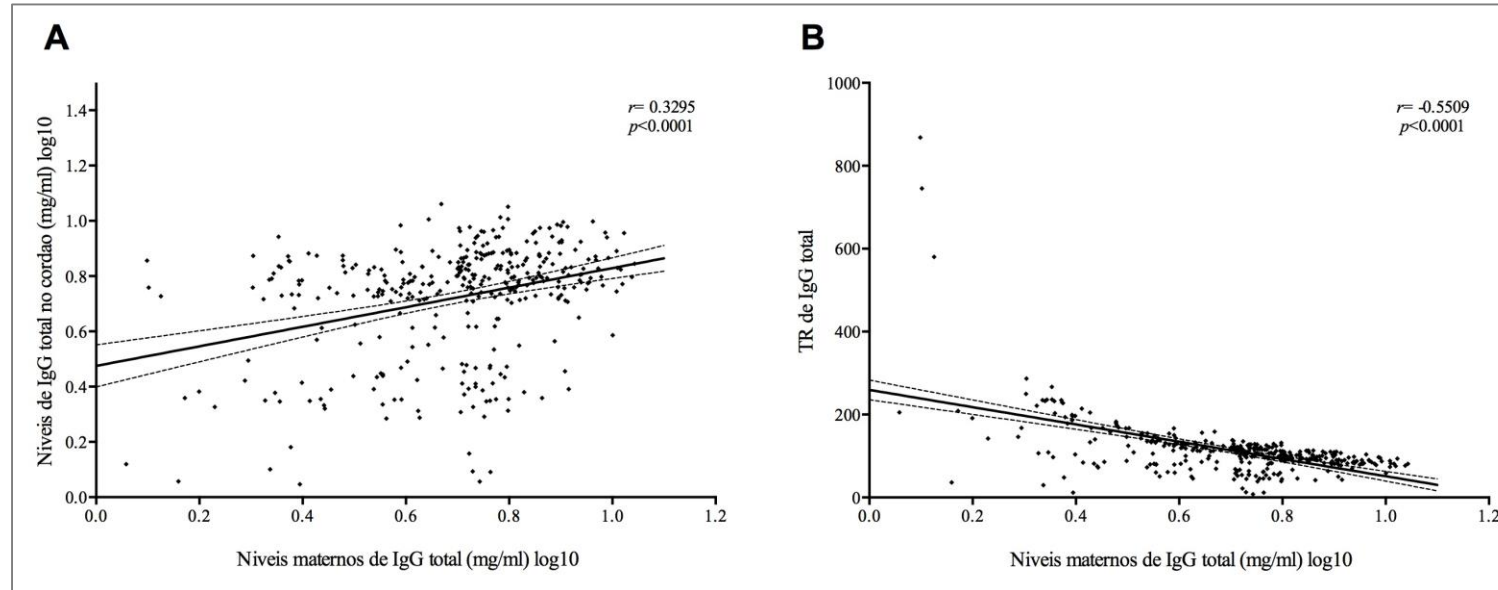
³Teste não-paramétrico de Wilcoxon (amostras pareadas)

⁴Teste t para amostras pareadas

5.3 Transferência placentária de IgG total e influência dos níveis de IgG total maternos na transferência placentária de anticorpos dengue-específicos

Os níveis de IgG total foram quantificados nas amostras maternas e do cordão umbilical. Observou-se uma correlação positiva entre níveis de IgG total nas amostras maternas e do cordão umbilical ($r=0,3295$, $p<0,0001$; Gráfico 1A). Em seguida, a influência dos níveis de IgG total maternos na transferência placentária de anticorpos ao neonato foi analisada. Pode-se observar que altos níveis de IgG total maternos estiveram significativamente associados a uma redução na taxa de transferência desses anticorpos ao neonato ($r= -0,5509$; $p<0,0001$; Gráfico 1B). Em seguida, foi analisada a correlação entre níveis de IgG total materna e a transferência placentária de anticorpos dengue-específicos (Gráfico 2). Os níveis de IgG total maternos foram negativamente correlacionados com a taxa de transferência de anticorpos neutralizantes para o sorotipo DENV-3 ($r= -0,1262$, $p=0,021$) e a subclasse IgG4 dengue-específica ($r= -0,1359$, $p=0,0562$). Níveis de IgG total materna não estiveram associadas à transferência de IgG DENV-específica ($r= -0,01157$, $p=0,8298$) e de subclasse de IgG1 dengue-específica ($r= -0,05482$, $p=0,3498$).

Gráfico 1 - Níveis de IgG total em 376 pares mãe-cordão.



FONTE: Elaborado pela autora

LEGENDA: A, Correlação entre níveis de IgG total nas amostras maternas e do cordão umbilical;

B, Correlação entre níveis de IgG total maternos e taxa de transferência placentária de IgG total ao neonato.

5.4 Influência da imunidade materna prévia a dengue na transferência placentária de anticorpos dengue-específicos ao neonato

Os dados da análise da associação entre a imunidade materna prévia à dengue e a transferência placentária de anticorpos dengue-específicos ao neonato são apresentados na Tabela 3. As taxas de transferência placentária de anticorpos IgG dengue-específicos ($p=0,0271$) e de anticorpos neutralizantes para o sorotipo DENV-3 ($p=0,044$) foram significativamente menores em mães imunes a mais de um sorotipo viral (multitípica) quando comparado às mães expostas a apenas um sorotipo do DENV (monotípica). Um padrão similar foi observado para transferência das subclasses de IgG1 e IgG4 dengue-específicas, embora sem associação estatisticamente significativa (Tabela 3).

Tabela 3 - Transferência placentária de anticorpos dengue-específicos e sua relação com perfil imune materno ao vírus dengue.

Sorologia	Taxa de transferência ¹ , mediana (range)		Valor de p ³
	Monotípica ²	Multitípica ²	
IgG DENV-especifica	103,9 (68,4 – 141,9)	101,7 (75,3 – 137,7)	0,02
Anticorpos neutralizantes para o DENV-3	106,8 (39,5 – 192,5)	104,3 (72,1 – 146,5)	0,04
Subclasses de IgG dengue-específicas			
IgG1	103,5 (76,0 – 175,4)	103,1 (73,8 – 137,3)	0,36
IgG4	98,0 (56,9 – 161,0)	95,1 (60,0 – 127,6)	0,16

FONTE: Elaborado pela autora.

NOTA: ¹Taxa de transferência placentária = (valor na amostra do cordão umbilical/valor na amostra materna) x 100

²Imunidade a dengue foi determinada por PRNT: Monotípica, imune a apenas um sorotipo do DENV; Multitípica, imune a dois ou mais sorotipos do DENV.

³Teste não-paramétrico de Mann-Whitney

5.5 Fatores potencialmente associados à redução na transferência placentária de anticorpos dengue-específicos ao neonato

A associação entre fatores potencialmente envolvidos na redução da transferência placentária de anticorpos dengue-específicos ao neonato foi analisada (Tabela 4). A ocorrência de infecção por dengue na gestação atual (TR= 99,72; $p= 0,0297$) e baixo peso neonatal ao nascer (TR= 94,21; $p= 0,0134$) foram significativamente associados a uma redução na transferência placentária de anticorpos dengue-específicos da subclasse IgG1 (Tabela 4). A idade materna,

presença de alterações na membrana placentária, relato de hábitos de fumo e ocorrência de eventos infecciosos durante a gravidez atual não estiveram associados à redução nas taxas de transferência placentária de IgG dengue-específico e das subclasses de IgG1 e IgG4 (Tabela 4).

Tabela 4 - Fatores potencialmente envolvidos na redução da transferência placentária de anticorpos dengue-específicos ao neonato.

Características	Taxa de Transferência Placentária ¹						
	<i>n</i>	IgG DENV-específica		IgG1 DENV-específica		IgG4 DENV- específica	
		Média	Valor de <i>p</i>	Média	Valor de <i>p</i>	Média	Valor de <i>p</i>
Idade materna, anos		104,19	0,3694	102,09	0,5337	98,50	0,3143
≤20	141	103,65		104,16		96,30	
>20	235						
Relato de hábitos de fumo durante a gravidez							
Não	314	103,73	0,1901	103,31	0,9129	96,98	0,8667
Sim	35	105,45		104,67		96,25	
Ocorrência de eventos infecciosos durante a gravidez ²							
Não	217	104,23	0,4397	104,57	0,1299	97,12	0,4322
Sim	159	103,33		101,83		96,88	
Alterações placentária ²							
Não	359	104,02	0,0719	103,40	0,2533	97,09	0,5372
Sim	17	100,25		103,21		95,78	
Infecção recente por dengue ³							
Não	335	103,91	0,1610	103,88	0,0297	97,42	0,3596
Sim	41	103,30		99,72		93,16	
Peso neonatal ao nascer, gramas							
<2.500	5	104,14	0,9377	94,21	0,0134	127,19	0,0978
≥2.500	371	103,85		103,52		96,87	

FONTE: Elaborado pela autora.

NOTA: ¹Taxa de transferência placentária = (valor na amostra do cordão umbilical/valor na amostra materna) x 100

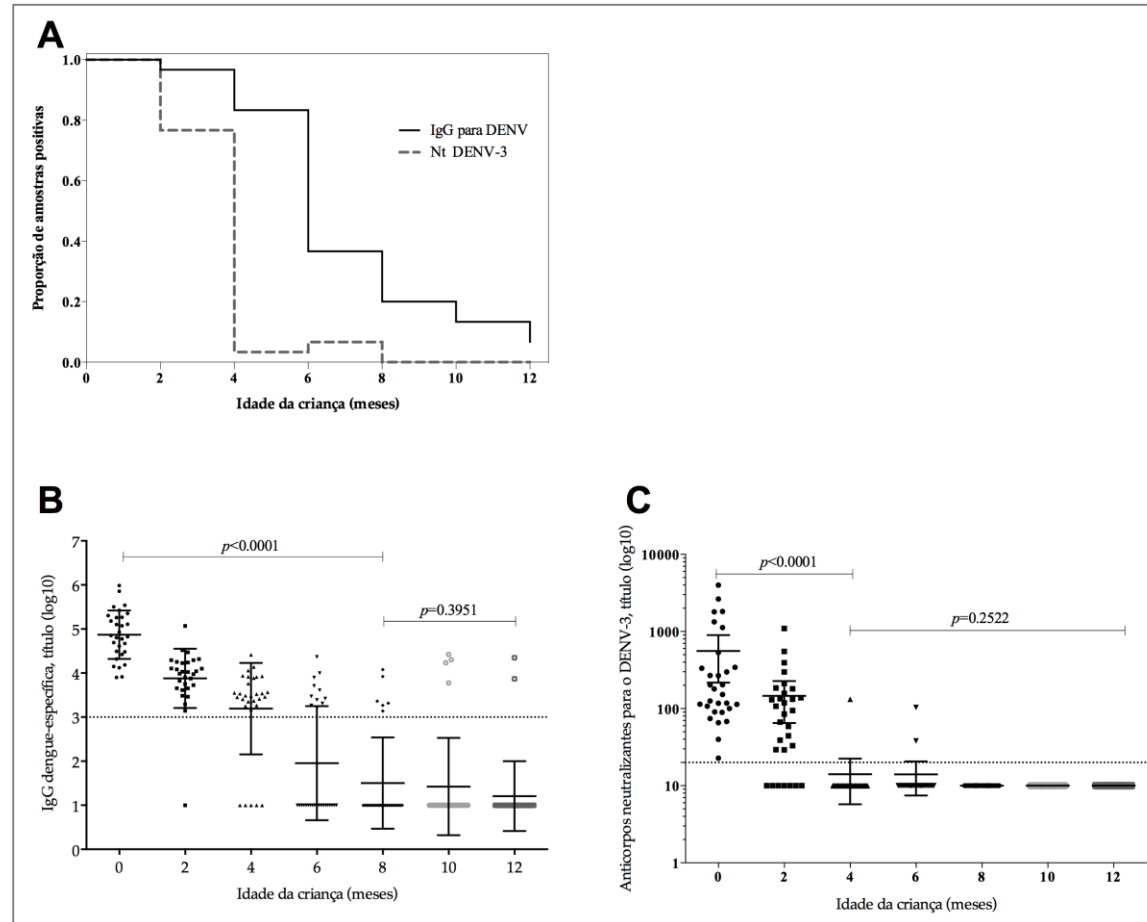
² Ocorrência de eventos infecciosos durante a gravidez e alterações na membrana placentária foram registradas por enfermeiras treinadas

³ Infecção recente por dengue foi determinada pela presença de marcadores de infecção recente (IgM) nas amostras maternas.

5.6 Cinética de anticorpos IgG dengue-específicos materno-transferidos ao neonato

Para caracterizar a cinética de declínio dos anticorpos antidengue materno-transferidos, foi selecionada uma sub amostra aleatória e independente das amostras de soro da coorte, coletadas no nascimento (cordão umbilical), no 2º, 4º, 6º, 8º, 10º e 12º mês de vida, cujas mães apresentavam imunidade monotípica ao DENV-3 no momento do parto e sem evidências laboratoriais (IgM/ RT-PCR) de infecções pelo vírus DENV dengue no período de acompanhamento da coorte de dengue. A presença de IgG dengue-específica foi detectada em 100% das amostras de soro do cordão umbilical e se tornou indetectável em 63,4%, 80% e 94% das crianças no 6º, 8º e 12º mês de vida, respectivamente (Gráfico 2A). Em contraste, os níveis de anticorpos neutralizantes para o DENV-3 foram detectadas em apenas cerca de 7% das crianças no 6º mês de vida, e foram indetectáveis em todas as amostras aos 8 meses de vida (Gráfico 2A). Uma correlação negativa foi observada entre idade e níveis de IgG dengue-específica ($r=-0,777$; $p<0,0001$) e de anticorpos neutralizantes para o sorotipo DENV-3 ($r=-0,734$; $p<0,0001$). Os títulos de anticorpos dengue-específicos foram maiores ao nascimento ($4,87\pm 0,54$) e declinaram significativamente para $3,84\pm 0,82$, $1,32\pm 1,77$ e $0,27\pm 1,04$ no 2º, 6º e 12º mês de vida, respectivamente ($p<0,001$; Gráfico 2B). Os títulos de anticorpos neutralizantes para o DENV-3 foram significativamente reduzidos de $2,35 \pm 0,55$, no momento do nascimento, para $1,82 \pm 0,58$ e $1,03 \pm 0,20$ no 2º e 4º mês de vida, respectivamente ($p<0,001$; Gráfico 2C).

Gráfico 2 - Cinética de declínio dos anticorpos antidengue no primeiro ano de vida.



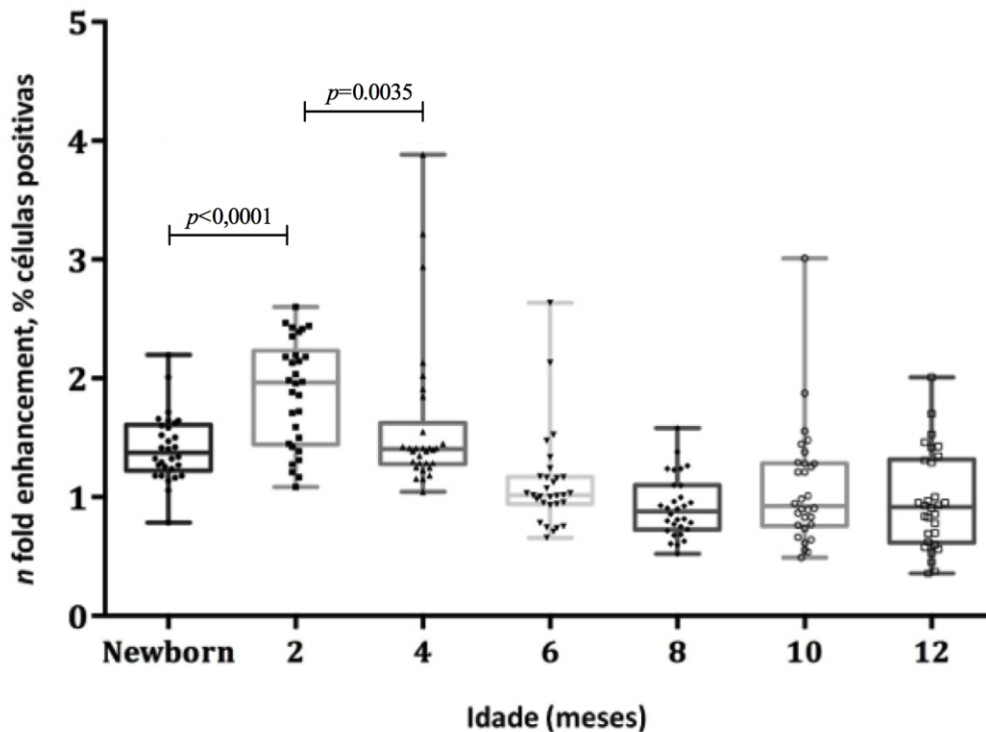
FONTE: Elaborado pela autora.

LEGENDA: A, Proporção de amostras positivas para IgG dengue-específica e anticorpos neutralizantes (Nt) para DENV-3 de acordo com a idade;
 B, Título de anticorpos para IgG dengue-específica (log10) em de acordo com a idade, em meses;
 C, Título de anticorpos para anticorpos neutralizantes (Nt) para DENV-3 de acordo com a idade, em meses.

5.7 Cinética de anticorpos antidengue materno-transferidos mediadores de imunoamplificação da infecção (ADE) viral

A cinética de anticorpos antidengue materno-transferidos com a capacidade de mediar imunoamplificação (ADE) da infecção por DENV *in vitro* foi analisada em amostras de crianças nascidas de mães com imunidade ao DENV-3. Foram utilizadas amostras de soro minimamente diluídas (1:10) para melhor refletir as condições *in vivo*. Pode-se observar que a atividade ADE aumentou significativamente no 2º mês de vida quando comparado ao nascimento ($p < 0,0001$), seguida por um rápido declínio no 4º mês de vida ($p = 0,0035$). Níveis de atividade ADE não foram detectados nas amostras de crianças com 6 meses de idade ou mais (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Cinética de anticorpos antidengue materno transferidos mediadores de atividade ADE da infecção por DENV-2 em amostras de crianças nascidas de mães imunes a DENV-3.



FONTE: Elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO



6 DISCUSSÃO

Essa tese analisou o papel dos níveis de anticorpos maternos e da imunidade materna prévia à dengue na transferência eficiente de anticorpos antidengue ao concepto e na cinética de declínio dos anticorpos materno-transferidos em uma coorte de crianças estabelecida na cidade do Recife, uma área de alta endemicidade de dengue na Região Nordeste.

Nossos dados mostram que as gestantes incluídas no estudo possuíam, em sua maioria, imunidade monotípica ao sorotipo DENV-3 e que esse perfil imune materno esteve associado à eficiente transferência placentária de anticorpos dengue-específicos ao neonato. Igualmente, nossos dados demonstraram que níveis sub-neutralizantes de anticorpos antidengue materno-transferidos, com a habilidade de mediar ADE, foram atingidos mais precocemente (2-4 meses) na nossa população de estudo, quando comparados aos estudos conduzidos em lactentes de países asiáticos. Nossos achados possivelmente possuem implicações para a imunopatogênese da dengue e, conseqüentemente, para o perfil epidemiológico da dengue em crianças durante os primeiros meses de vida, no contexto brasileiro, onde tem se observado menor incidência de dengue grave quando comparado ao observado em países Asiáticos (HALSTEAD et al., 2002; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015; TEIXEIRA et al., 2013). Assim, os resultados deste estudo fornecem informações relevantes para a avaliação da suscetibilidade e dinâmica de transmissão da dengue nos primeiros anos de vida no cenário epidemiológico brasileiro.

As respostas de anticorpos possuem um papel dual durante a infecção por DENV, podendo mediar mecanismos efetores imunopatogênicos e de proteção (WAHALA et al., 2011). Essa função ambígua torna-se ainda mais evidente em lactentes nascidos de mães imunes a dengue. Inicialmente, a transferência placentária de anticorpos antidengue parece exercer papel protetor a infecção pelo DENV durante os primeiros meses de vida da criança. No entanto, esses mesmos anticorpos podem potencializar a infecção por DENV através do mecanismo de ADE quando seus títulos declinam para níveis sub-neutralizantes, o que favorece o surgimento das manifestações graves da doença (HALSTEAD et al., 2002; KLIKS et al., 1988; SIMMONS et al., 2007). Os mecanismos envolvidos na transferência placentária de anticorpos dengue-específicos ao neonato permanecem parcialmente compreendidos.

Nossos achados mostraram que uma parcela substancial das gestantes inseridas em nossa coorte apresentava imunidade antidengue – quase 100% - e que sua maioria possuía imunidade

monotípica pelo DENV-3 (53,7%) ou a combinação de DENV-3/DENV-4 (30,6%). Embora a presença de mães imunes aos sorotipos DENV-1 e DENV-2 tenha sido detectada, esse grupo representou apenas cerca de 5% dessa população de estudo. Esses achados possivelmente refletem o cenário de circulação dos diferentes sorotipos do DENV no Brasil nos últimos 15 anos. No Brasil, e na cidade do Recife, o sorotipo DENV-3 circulou de forma dominante entre 2002 e 2006, enquanto que a circulação do sorotipo DENV-4 foi predominante após a sua introdução no ano de 2010 (CASTANHA et al., 2013; CORDEIRO et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2013). Ressalta-se que o perfil epidemiológico sorotipo específico observado na população de gestantes do nosso estudo é distinto do perfil observado em estudos de coorte de nascimento conduzidos em países Asiáticos, onde os quatro sorotipos do DENV circulam de forma simultânea por mais de cinco décadas e a maior parte das gestantes apresenta imunidade aos quatro sorotipos do vírus no momento do parto (CHAU et al., 2009; KHAMIM et al., 2015; PENGSA et al., 2006; SIMMONS et al., 2007).

A eficiente transferência placentária de IgG dengue-específica materna ao concepto encontrada na população do nosso estudo, todas residentes na cidade do Recife, confirma os achados de diferentes estudos em pares mães-concepto conduzidos em países Asiáticos e no Brasil (ARGOLO et al., 2013; CHAU et al., 2009; KHAMIM et al., 2015; PENGSA et al., 2006; SIMMONS et al., 2007). Esses achados refletem o transporte ativo de IgG através da placenta, um mecanismo imunológico bem-caracterizado mediado por receptores FcRn (ROOPENIAN et al., 2007). Igualmente, a eficiente transferência placentária de anticorpos neutralizantes para os sorotipos DENV-3 e DENV-4 foi confirmada. Devido ao reduzido percentual de gestantes imunes aos sorotipos DENV-1 e DENV-2 no nosso estudo, não foi possível comparar o perfil de transferência placentária entre os quatro sorotipos do DENV.

As quatro subclasses de IgG (IgG1-4) podem ser detectadas em indivíduos imunes à dengue (KORAKA et al., 2001; THEIN et al., 1993). Essas quatro subclasses de IgG dengue-específicas possuem a habilidade de atravessar a membrana placentária (WATANAVEERADEJ et al., 2003). No entanto, embora as subclasses IgG2 e IgG3 sejam encontradas em indivíduos imunes ao DENV, o seu papel na mediação da patogênese e/ou proteção à dengue permanece não esclarecido. Ao contrário, as subclasses IgG1 e IgG4 têm sido associadas à imunopatogênese da dengue grave (KORAKA et al., 2001). Estudos demonstram que os níveis das subclasses IgG1 e IgG4 encontram-se significativamente elevados em indivíduos que apresentam as manifestações

graves da doença quando comparado aqueles que apresentam quadros mais leves (KORAKA et al., 2001; THEIN et al., 1993). Adicionalmente, as subclasses IgG1 e a IgG4 possuem habilidade de atravessar a barreira placentária de forma mais eficiente quando comparado as demais subclasses devido a sua maior afinidade de ligação ao receptor FcRn (ROOPENIAN et al., 2007; STAPLETON et al., 2011). Por essa razão, essa pesquisa focou na transferência das subclasses IgG1 e IgG4 dengue-específicas. Corroborando com os resultados de um estudo conduzido em pares mãe-cordão na Tailândia (WATANAVEERADEJ et al., 2003), nossos resultados demonstraram que a subclasse IgG1 DENV-específica foi transferida mais eficientemente ao neonato do que a subclasse IgG4. Possivelmente, a abundância relativa de IgG1 dengue-específica em relação às demais subclasses e sua maior afinidade ao receptor FcRn, quando comparado à subclasse IgG4, influenciaram a maior eficiência de transferência placentária dessas subclasses observada nesse estudo.

No nosso estudo, observou-se que os níveis maternos de IgG total influenciaram negativamente a transferência de anticorpos ao concepto, ou seja, quanto maior o nível de IgG total materno, menor a eficiência de transferência de anticorpos neutralizantes para o sorotipo DENV-3 e da subclasse IgG4 DENV-específica. Vale salientar que esse mecanismo não é exclusivo de anticorpos associados à DENV. Diversos estudos têm demonstrado que a transferência placentária de anticorpos específicos para diferentes vírus - incluindo sarampo, herpes simples e varicela-zoster - também são influenciados pelos níveis de IgG total maternos (DE MORAES-PINTO et al., 1996; GONÇALVES et al., 1999; HARTTER et al., 2000). Esse efeito torna-se ainda mais evidente em mães que possuem hiperglobulinemia (DE MORAES-PINTO et al., 1996; OKOKO et al., 2001). A reduzida eficiência de transferência placentária na presença de altos níveis de IgG total maternos é explicada pela saturação dos receptores FcRn, presentes em um número limitado na membrana placentária (ROOPENIAN et al., 2007). Curiosamente, elevados níveis de IgG total materno não influenciaram a transferência da subclasse de IgG1 DENV-específica ao concepto. Possivelmente, a maior afinidade dessa subclasse aos receptores FcRn influenciaram o processo de competição entre as subclasses, favorecendo a transferência placentária de IgG1 quando comparada ao IgG4.

Nossos achados mostram que a presença de imunidade materna à dengue exerceu um papel na transferência de IgG DENV-específica e de anticorpos neutralizantes para o DENV-3 da mãe ao concepto. A transferência placentária desses anticorpos foi significativamente reduzida

em mães que apresentavam múltiplas exposições prévias aos sorotipos do DENV (perfil multitépico) quando comparadas à mães que apresentaram infecção prévia por apenas um sorotipo do vírus (perfil monotípico). Considerando que mães expostas a vários sorotipos de dengue apresentam maiores níveis de anticorpos antidengue quando comparadas a mães com histórico de exposição monotípica, é provável que o mecanismo de competição pela interação com receptores FcRn pode ter ocasionado a redução da transferência de IgG dengue-específico observada em mães expostas a múltiplos sorotipos de DENV.

A análise do declínio dos anticorpos dengue-específicos materno-transferidos durante o primeiro ano de vida demonstrou que níveis de anticorpos neutralizantes para o DENV-3 declinaram mais rapidamente quando comparados aos níveis de IgG DENV-específica durante o primeiro ano. Esses dados estão de acordo com o observado em um estudo de coorte prospectivo em crianças do Vietnã (CHAU et al., 2009), que mostrou redução mais acentuada dos níveis de anticorpos neutralizantes quando comparado aos níveis de anticorpos que se ligam a partícula viral. Essas diferenças no declínio dos anticorpos neutralizantes (mensurados pelo PRNT) e dos anticorpos que se ligam ao vírus (IgG DENV-específica, mensurado via ELISA) provavelmente refletem a habilidade do ensaio de ELISA em detectar a ligação de IgG à diferentes antígenos do DENV (por exemplo, prM/M) expostos na superfície nos poços das placas de ELISA sensibilizadas com o vírus, enquanto anticorpos neutralizantes são principalmente direcionados para a proteína E (CHAU et al., 2009; WHITEHORN et al., 2011). Diferente do ensaio de soroneutralização, no qual são mensurados anticorpos com a capacidade de neutralizar o vírus e inibir sua infecção nas células, o ensaio de ELISA detecta tanto anticorpos com a capacidade de mediar neutralização como anticorpos capazes de se ligar a partícula viral, mas não neutralizar sua infectividade.

Em relação à análise da cinética dos anticorpos materno-adquiridos, o estudo revelou que a perda de anticorpos neutralizantes para o DENV-3 na nossa coorte de crianças ocorreu mais precocemente (>90%, no 4º mês de vida) quando comparada a diferentes coortes asiáticas, nas quais, na maioria das vezes, os níveis de anticorpos neutralizantes tornaram-se indetectáveis em aproximadamente 80-90% das crianças no 9º mês de vida (CHAU et al., 2009; PANHUIS et al., 2011; PENGSA et al., 2006).

A análise da cinética de uma coorte de crianças em Bangkok, Tailândia, demonstrou que a presença de elevados níveis de anticorpos antidengue materno-adquiridos ao nascimento esteve

associada ao mais rápido declínio desses anticorpos durante o primeiro ano de vida (PANHUIS et al., 2011). Com base nessas evidências, e considerando que a transferência transplacentária de anticorpos antidengue aos conceptos é maior entre as mães com imunidade monotípica ao DENV, é razoável supor que as diferenças na cinética de declínio dos anticorpos antidengue maternos observadas entre as crianças asiáticas e as crianças de nosso estudo possam estar relacionadas ao perfil imune materno a dengue. Nas mães Asiáticas, que são em sua maioria imunes aos quatro sorotipos do DENV e possuem níveis de anticorpos antidengue mais elevados dos que as mães do nosso estudo (CHAU et al., 2009; KHAMIM et al., 2015; PENGSAI et al., 2006; SIMMONS et al., 2007), a transferência transplacentária de anticorpos antidengue é possivelmente menor quando comparadas às mães do nosso local de estudo. Adicionalmente, é importante salientar que os receptores FcRn são as moléculas responsáveis pela reciclagem e manutenção da IgG na circulação sanguínea (ROOPENIAN et al., 2007). Assim, possivelmente, a presença de altos níveis de IgG maternos ao nascimento favorece uma maior competição para ligação de IgG ao FcRn o que pode ter influenciando o rápido declínio de anticorpos antidengue observados na presença de altos níveis de IgG ao nascimento.

Diferentemente do observado no Brasil, a dengue grave constitui uma das principais causas de morbidade e mortalidade em lactentes Asiáticos com menos de 1 ano de vida, nascidos a partir de mães imunes à dengue (HALSTEAD et al., 2002; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015; TEIXEIRA et al., 2013). Nessa região, o declínio dos anticorpos antidengue materno-transferidos a níveis subneutralizantes tem sido implicada como um fator de risco para a ocorrência de dengue grave em lactentes que experimentam uma infecção primária pelo DENV devido ao mecanismo de ADE (HALSTEAD et al., 2002; KLIKS et al., 1988; SIMMONS et al., 2007). O estudo do ADE em amostras provenientes de crianças com imunidade antidengue materno-transferidas, mas sem evidências de infecção recente pelo vírus, fornece as condições ideais para o estudo do papel dos anticorpos na determinação da dengue grave, em virtude da ausência de memória imunológica de células T e B, que exercem um papel na resposta imune nas infecções secundárias (HALSTEAD, 2003).

Consistente com a redução acentuada dos anticorpos neutralizantes no primeiro ano de vida, nossos dados mostram que o pico de atividade ADE mediada por anticorpos antidengue materno-transferidos ocorreu mais cedo (~2-4 meses) nas crianças incluídas no nosso estudo. Possivelmente, essa curta janela imunológica de detecção da presença de anticorpos mediadores

de ADE observada no nosso estudo reduz o período de tempo no qual o lactente estaria vulnerável ao desenvolvimento de dengue grave se exposto à uma infecção primária pelo vírus. Essa suposição é de certo modo confirmada por dados do acompanhamento clínico das crianças dessa coorte, que mostraram que nenhum nos 49 casos de dengue laboratorialmente confirmados evoluiu para dengue grave (dados não publicados). Em contraste, estudos conduzidos em crianças asiáticas mostram que cerca de 50% das crianças infectadas pelo vírus evoluem para dengue grave (CAPEDING et al., 2010; CHAU et al., 2010; SIMMONS et al., 2007). Adicionalmente, lactentes nessa idade (2-4 meses) encontram-se normalmente envoltos em roupas/ cobertores, o que reduziria sua exposição à picada de mosquitos transmissores da doença (CHAU et al., 2009), o que possivelmente explica a reduzida incidência de dengue observada entre as crianças incluídas nesse estudo. Igualmente, outros fatores possivelmente envolvidos na mediação da dengue grave, incluindo a virulência dos sorotipos circulantes e/ou background genético da população devem ser considerados.

Essa tese analisou o perfil materno de imunidade a dengue sorotipo específica, a transferência placentária e a cinética de declínio dos anticorpos antidengue materno-transferidos em uma coorte de nascimento conduzida na cidade do Recife, uma área hiperendêmica do Nordeste brasileiro. Uma das limitações do estudo consiste na seleção de uma amostra de conveniência da população de gestantes, recrutadas em uma grande maternidade pública da cidade, o que dificulta a extrapolação dos dados para a população geral do Recife ou de outras regiões com diferentes cenários epidemiológicos de circulação dos sorotipos do DENV. Além disso, as dificuldades inerentes à execução dos ensaios laboratoriais, especialmente da técnica de soroneutralização, impossibilitaram a estimativa do declínio dos anticorpos antidengue materno transferidos em todas as crianças inseridas na coorte, tendo essa análise sido conduzida em uma subamostra dos lactentes.

Nosso estudo verificou um alto percentual de mulheres em idade reprodutiva imunes a dengue, o que sugere a intensidade de exposição e potencial de transmissão desses vírus na cidade, especialmente dos sorotipos DENV-3 e DENV-4. Apesar da intensa exposição da população a esses sorotipos, o elevado percentual de susceptíveis aos sorotipos DENV-1 e DENV-2 alerta para a necessidade de instituição de medidas mais efetivas de controle vetorial e de vigilância epidemiológica.

A transferência placentária de níveis mais elevados de anticorpos antidengue ao concepto e o conseqüente declínio mais acentuado dos níveis de anticorpos materno-transferidos observados entre os lactentes inseridos no nosso estudo possivelmente constitui uma das causas que explicam as diferenças no perfil clínico-epidemiológico da dengue entre as crianças brasileiras e asiáticas. Ressalta-se, todavia, que a manutenção da intensa transmissão e circulação viral na área podem resultar em mudanças no perfil imune da população, com conseqüente acúmulo de gestantes com perfil imune multítípico a dengue na área. Essas mudanças no perfil imune materno possivelmente serão refletidas na transferência placentária e no declínio dos anticorpos antidengue materno-transferidos, fazendo com que o cenário epidemiológico se assemelhe ao padrão atualmente observado nos países asiáticos. Dessa forma, mais estudos que investiguem a imunidade sorotipo específico na população de gestantes e a incidência de dengue nos primeiros anos de vida são necessários.

Finalmente, conclui-se que os resultados dessa tese trazem conhecimentos relevantes para a definição da idade ideal para implementação de esquemas vacinais antidengue em populações residentes em áreas de alta exposição ao vírus, como a cidade do Recife. Considerando o atual cenário epidemiológico na população de gestantes e a influência do perfil imune materno na transferência placentária e na cinética dos anticorpos antidengue materno-transferidos em crianças nos primeiros meses de vida, observados nesse estudo, conclui-se que o início precoce de esquema de vacinação antidengue, possivelmente a partir do segundo ano de vida, pode ser recomendável.

7 CONCLUSÕES



7 CONCLUSÕES

Essa tese demonstrou que a maior parte das gestantes da nossa área de estudo possui imunidade ao sorotipo DENV-3 e que esse perfil imune materno foi associado com a transferência placentária de maiores níveis de anticorpos antidengue ao lactente. Adicionalmente, níveis subneutralizantes de anticorpos com a capacidade de mediar ADE foram atingidos mais precocemente nos lactentes inseridos no estudo. Esses achados possuem importantes implicações para a imunopatogênese da dengue no primeiro ano de vida em lactentes brasileiros e possivelmente explica a reduzida incidência de casos graves de dengue observada entre os lactentes brasileiros quando comparado as taxas observadas entre os lactentes asiáticos.

Os dados gerados na tese também contribuem para determinar o perfil de susceptibilidade e a dinâmica de transmissão da dengue nos primeiros anos de vida no atual cenário epidemiológico brasileiro. Por fim, as amostras maternas e das crianças coletadas contribuem para a formação de um biobanco sorologicamente caracterizado e estabelecido antes da introdução da era vacinal para dengue.

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, C. F. et al. Dengue during pregnancy: a study of thirteen cases. **American Journal of infectious diseases**, Chicago, v.5, n.4, p.288-293, 2009.
- ARGOLO, A. F. et al. Prevalence and incidence of dengue virus and antibody placental transfer during late pregnancy in central Brazil. **BMC Infectious Diseases**, Londres, v.13, n.1, p.1-7, 2013.
- BARROSO, R.L. et al. Repercusión del dengue serotipo 3 sobre el embarazo y producto de la concepción. **Revista Cubana de Ginecología y Obstetricia**, Havana, v.36, n.2, p.42-50, 2010.
- BASHA, S.; SURENDRAN, N.; PICHICHERO, M. Immune responses in neonates. **Expert Review of Clinical Immunology**, Londres, v.10, n.9, p.1171-1184, 2014.
- BHATT S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, Londres, v.1, p.496-504, 2013.
- BOONAK, K. et al. Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of Dengue virus infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 8, p. 3939-3951, 2008.
- BRAGA, C. et al. Prospective birth cohort in a hyperendemic dengue area in Northeast Brazil: methods and preliminary results. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.32, n.1, 2016.
- BRAGA, C. et al. Seroprevalence and risk factors for dengue infection in socio-economically distinct areas of Recife, Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 113, p. 234–240, 2010.
- CAPEDING, R.Z. et al. The incidence, characteristics, and presentation of dengue virus infections during infancy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.82, n.2, p.330-336, 2010.
- CASTANHA, P. M. S. et al. Force of infection of dengue serotypes in a population-based study in the northeast of Brazil. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.141, n.5, p.1080-1088, 2012.
- CHAREONSIRISUTHIGUL, T.; KALAYANAROOJ, S.; UBOL, S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. **Journal of General Virology**, Londres, v. 88, p. 365-375, 2007.
- CHATURVEDI, U. C. et al. Dengue vaccines: problems and prospects. **Indian Journal of Medicine Research**, Nova Deli, v. 121, n. 5, p. 639-652, 2005.

- CHATURVEDI, U. C. et al. Dengue virus-specific suppressor T cells: current perspectives. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdã, v.50, n.3, p.285-299, 2007.
- CHAU, T. N. et al. Dengue in Vietnamese infants- results of infection- enhancement assays correlate with age-related disease epidemiology, and cellular immune responses correlate with disease severity. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v.198, n.4, p.516-524, 2008.
- CHAU, T. N. et al. Dengue virus infections and maternal antibody decay in a prospective birth cohort study of Vietnamese infants. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 200, n.12, p.1893-1900, 2009.
- CHAU, T. N. et al. Clinical and Virological Features of Dengue in Vietnamese Infants. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v.4, n.4, p.1-7, 2010.
- CHITRA, T.V.; PANICKER, S. Maternal and fetal outcome of dengue fever in pregnancy. **Journal of Vector Borne Diseases**, Nova Deli, v.48, n.4, p.210-213, 2011.
- CHUCRI, T. M. et al. A review if immune transfer by the placenta. **Journal of Reproductive Immunology**, Limerick, v. 87, p. 14-20, 2010.
- COFFEY, L. L. et al. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. **Microbes and Infection**, Paris, n.11, p. 143-156, 2009.
- CORDEIRO, M. T. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco, 1995-2006. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasilia, v.40, n.6, p.605-611, 2007.
- CORDEIRO, M. T. et al. Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.77, n.6, p.1128-1134, 2007.
- CUMBERLAND, P. et al. Maternal HIV Infection and Placental Malaria Reduce Transplacental Antibody Transfer and Tetanus Antibody Levels in Newborns in Kenya. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.196, n.4, p.550-557, 2007.
- DEJNIRATTISAI, W. et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. **Science**, Washington, v. 328, n. 745, p. 745-748, 2010.
- ELLING, R. et al. Dengue fever in children: where are we now?. **The Pediatric Infectious Diseases Journal**, Baltimore, v.32, n.9, p.1020-1022, 2013.
- ENDY, T. P. et al. Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.189, n.6, p.990-1000, 2004.
- FIGUEIREDO, L. T. M.; CARLUCCI, R. H.; DUARTE, G. Estudo prospectivo com

lactentes cujas mães tiveram dengue durante a gravidez. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 36, n. 5, p.417-421, 1994.

FONSECA, G. F. Dengue no Brasil: tendências, vigilância e as epidemias de 2008. 2009. 79 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

FRIEDMAN, E. E. et al. Symptomatic dengue infection during pregnancy and infant outcomes: a retrospective cohort study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v.8, n.10, p.1-8, 2014.

GIBBONS, R.V. et al. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.77, n.5, p.910-913, 2007.

GONÇALVES, G. et al. Transplacental transfer of measles and total IgG. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.122, n.2, p.273-279, 1999.

GREEN, A. M. et al. Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdã, v.426, n.6, p.1148-1160, 2014.

GUY, B. et al. Evaluation by flow cytometry of antibody-dependent enhancement (ADE) of dengue infection by sera from Thai children immunized with a live-attenuated tetravalent dengue vaccine. **Vaccine**, Amsterdã, v.22, n.27-28, p.3563-3574, 2004.

GUZMAN, M. G.; ALVAREZ, M.; HALSTEAD, S. B. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/ dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. **Archives of Virology**, Nova York, v.158, n.7, p.1445-1459, 2013.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **The Lancet**, Londres, v.385, n.9966, p.453-465, 2015.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 88, p. S7–16, 2010.

HALSTEAD S. B. Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. **Microbiology Spectrum**, Washington, v.2, n.6, p.1-18, 2014.

HALSTEAD S. B.; YAMARAT, C.; SCANLON, J. E. The Thai hemorrhagic fever epidemic of 1962. A preliminary report. **Journal of the Medical Association of Thailand**, Bangkok, v.46, p.449-466, 1963.

HALSTEAD, S. B. Dengue Hemorrhagic Fever in Infants: Research Opportunities Ignored. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.8, n.12, p.1474-1479, 2002.

HALSTEAD, S. B. Dengue. **The Lancet**, Londres, v. 370, p.1644-1652, 2007.

- HALSTEAD, S. B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. **Advances in virus research**, Nova York, v. 60, p. 421-467, 2003.
- HALSTEAD, S. B. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v.11, p.830-839, 1989.
- HALSTEAD, S.B. et al. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. I. Experience with classification of dengue viruses. **Yale Journal of Biology and Medicine**, New Haven, v.42, n.5, p.261-275, 1970.
- HALSTEAD, S. B.; BUESCHER, E.L. Hemorrhagic disease in rodents infected with virus associated with Thai hemorrhagic fever. **Science**, Nova York, v.134, n.3477, p.475-476, 1961.
- HALSTEAD, S. B.; CHOW, J.S.; MARCHETTE, N.J. Immunologic enhancement of dengue virus replication. **Nature: New Biology**, Londres, v.243, n.122, p.24-26, 1973.
- HALSTEAD, S. B.; O'ROURKE, E.J. Antibody enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. **Nature**, Londres, v.265, p.739-741, 1977.
- HAMMON, S.N. et al. Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.73, n.6, p.1063-1070, 2005.
- HARTIGAN-O'CONNOR, D. J.; ABEL, K.; MCCUNE, J.M. Suppression of SIV-specific CD41 T cells by infant but not adult macaque regulatory T cells: implications for SIV disease progression. **The Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v.204, n.11, p.2679-2692, 2007.
- HARTTER, H. K. et al. Placental transfer and decay of maternally acquired antimeasles antibodies in Nigerian children. **Pediatric Infectious Diseases Journal**, Baltimore, v.19, n.7, p.635-641, 2000.
- IBGE. Censo demográfico 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/>>. Acesso em: 17 Mar. 2012.
- ISMAIL, N. A. et al. Dengue in pregnancy. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v.37, n.4, p.681-683, 2006.
- JAIN, A.; CHATURVEDI, U.C. Dengue in infants: an overview. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdã, v.59, n.2, p.119-130, 2010.
- KABILAN, L. et al. Dengue disease spectrum among infants in the 2001 dengue epidemic in Chennai, Tamil Nadu, India. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.8, p.3919-3921, 2003.
- KALAYANAROOJ, S.; NIMMANNITYA, S. Clinical presentations of dengue hemorrhagic fever in infants compared to children. **Journal of the Medical Association**

of Thailand, Bangkok, v.86, p.673-680, 2003.

KAO, C. L. et al. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taipei, v.38, n.1, p.5-16, 2005.

KHAMIM K. et al. Neutralizing Dengue Antibody in Pregnant Thai Women and Cord Blood. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v.9, n.2, p.1-10, 2015.

KLIKS, S. C. et al. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. **American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 38, n. 2, p. 411-419, 1988.

KORAKA, P. et al. Kinetics of dengue virus-specific serum immunoglobulin classes and subclasses correlate with clinical outcome of infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.12, p. 4332-4338, 2001.

KUNO, G. et al. Phylogeny of the genus Flavivirus. **Journal of Virology**, Washington, v.72, n.1, p.73-83, 1998.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.62, p.71-92. 2008.

LAOPRASOPWATTANA, K. et al. Dengue Virus (DV) enhancing antibody activity in preillness plasma does not predict subsequent disease severity or viremia in secondary DV infection. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v.192, n.3, p.510-9. 2005.

LEITE, R. C. et al. Dengue infection in pregnancy and transplacental transfer of anti-dengue antibodies in Northeast, Brazil. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdã, v.60, n.1, p.16-21, 2014.

LIBRATY, D. H., et al. A prospective nested case-control study of Dengue in infants: rethinking and refining the antibody-dependent enhancement dengue hemorrhagic fever model. **PLoS Medicine**, São Francisco, v.6, n.10, p.171. 2009.

MALEK, A. et al. Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, Nova York, v.36, n.5, p.248-255, 1996.

MARTINEZ, E. et al. Dengue fever and hemorrhagic dengue in infants with a primary infection. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Havana, v.45, n.2, p.97-101, 1993.

MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. **Immunological reviews**, Copenhagen, v. 225, p. 300-313, 2008.

MATHIESEN, L. et al. Maternofetal transplacental transport of recombinant IgG antibodies lacking effector functions. **Blood**, Nova York, v.122, n.7, p.1174-1181, 2013.

MOI, M. L. et al. Dengue virus infection-enhancing activity of undiluted sera obtained from patients with secondary dengue virus infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v.107, n.1, p.51-58, 2013.

MONGKOLSAPAYA, J. et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal?. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.176, n.6, p.3821-3829, 2006.

MONTENEGRO, D. et al. Aspectos clínicos e epidemiológicos da epidemia de dengue no Recife, PE, em 2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.39, n.1, p.9-13, 2006.

MORAES-PINTO, M. I. et al. Placental transfer and maternally acquired neonatal IgG immunity in human immunodeficiency virus infection. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v.173, n.5, p.1077-1084, 1996.

MURPHY, B.; WHITEHEAD, S. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 29, p. 587-619, 2011.

NAVARRO-SANCHEZ, E.; DESPRES, P; CEDILLO-BARRON, L. Innate immune responses to dengue virus. **Archives of Medical Research**, Nova York, v.36, n.5, p.425-435, 2005.

NG, J. K.W. et al. First experimental in vivo model of enhanced dengue disease severity through maternally acquired heterotypic dengue antibodies. **PLoS Pathogens**, São Francisco, v.10, n.4, p.1-15, 2014.

OKOKO, J. B. et al. The influence of placental malaria infection and maternal hypergammaglobulinemia on transplacental transfer of antibodies and IgG subclasses in a rural West African population. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v.184, n.5, p.627-632, 2001.

OKOKO, J. B. et al. The influence of prematurity and low birthweight on transplacental antibody transfer in a rural West African population. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.6, n.7, p.529-534, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue and severe dengue**. Geneva, 2016. (Fact sheet, n. 117). Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 03 Abr. 2016.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. **Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country**. (Epidemiological Week 46). Disponível em <<http://www.paho.org/>>. Acesso em: 11 Abr. 2016

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. **Dengue Regional Information: Number of cases, 2011**. Disponível em: <<http://new.paho.org/hq/index.php/>>. Acesso em: 17 Mar. 2013.

PAIXAO, E. S. et al. Dengue during pregnancy and adverse fetal outcomes: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, Nova York, 2016. Disponível em:< [http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(16\)00088-8](http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(16)00088-8)>. Acesso em: 10 Mar. 2016.

PALMEIRA, P. et al. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. **Clinical and Developmental Immunology**, Abingdon, v.2012, p.1-13, 2012.

PANHUIS, W. G. et al. Decay and persistence of maternal dengue antibodies among infants in Bangkok. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 85, n. 2, p. 355-362, 2011.

PEELING, R. W. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature reviews. Microbiology**, Londres, v.8, n.12, p.30-37, 2010.

PENGSAK, K. et al. Maternally transferred neutralising dengue antibodies in Thai infants: a pilot study. **Annals of Tropical Paediatrics**, Londres, v.23, n.3, p.159-165, 2003.

PENGSAK, K., et al. Dengue virus infections in the first 2 years of life and the kinetics of transplacentally transferred dengue neutralizing antibodies in Thai children. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v.194, n.11, p.1570-1576, 2006.

PERRET, C. et al. Dengue infection during pregnancy and transplacental antibody transfer in Thai mothers. **The Journal of Infections**, Londres, v.51, n.4, p.287-293, 2005.

POLI, L. et al. Materno-fetal dengue. Apropos of 5 cases observed during the epidemic in Tahiti. **Bulletin de la Société de pathologie exotique**, Paris, v.84, p.513-521, 1991.

RATH, T. et al. Regulation of immune responses by the neonatal Fc receptor and its therapeutic implications. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v.5, n.664, p.1-8, 2015.

RESTREPO, B. N. et al. Dengue y embarazo en Antioquia, Colombia. **Revista Facultad Nacional de Salud Pública**, Medellín, v.22, n.1, p.7-14, 2004.

RICO-HESSE, R. Dengue virus virulence and transmission determinants. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 338, p. 45-55, 2010.

RODENHUIS-ZYBERT, I.; WILSCHUT J.; SMIT J. Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v.67, n.16, p.2773-2786, 2010.

ROOPENIAN, D. C.; AKILESH, S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v.7, n.9, p.715-725, 2007.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v.11, n.8, p.532-543, 2011.

- ROWE, J. et al. Heterogeneity in diphtheriatetanus–acellular pertussis vaccine–specific cellular immunity during infancy: relationship to variations in the kinetics of postnatal maturation of systemic Th1 function. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v.184, n.1, p.80-88, 2001.
- SAN MARTIN, J. L. et al. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.82, n.1, p.128-135, 2010.
- SCOTT, S. et al. The Influence of HIV-1 Exposure and Infection on Levels of Passively Acquired Antibodies to Measles Virus in Zambian Infants. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.45, n.11, p.1417-1424, 2007.
- SHRESTA, S. et al. Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. **Journal of Virology**, Washington, v.80, n.20, p.10208-10217, 2006.
- SIMMONS, C. P. et al. Maternal antibody and viral factors in the pathogenesis of dengue virus in infants. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v.196, n.3, p.416-24, 2007.
- SIQUEIRA, J. B. et al. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil, 1981–2002. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.11, n.1, p.48-53, 2005.
- SOUNDRAVALLY, R. et al. Fulminant hepatic failure in an infant with severe dengue infection. **Indian Journal of Pediatrics**, Nova Deli, v.77, n.4, p.435-437, 2010.
- SRISAKUL, C. et al. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.32, n.2, p.411-419, 1988.
- STAPLETON, N. M. et al. Competition for FcRn-mediated transport gives rise to short half-life of human IgG3 and offers therapeutic potential. **Nature Communications**, Londres, v.2, 2011.
- TAN, P. C. et al. Dengue infection in pregnancy: prevalence, vertical transmission, and pregnancy outcome. **Obstetrics and Gynecology**, Nova York, v.111, n.5, p.1111-1117, 2008.
- TEIXEIRA, M. G. et al. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Brazil (2000-2010): A Systematic Literature Search and Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v.7, n.12, p.1-13, 2013.
- TEIXEIRA, M. G. et al. Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.14, n.10, p.1663, 2008.
- TEMPORAO, J. G. et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 17, p. 938-940, 2011.
- THEIN, S. et al. Changes in levels of anti-dengue IgG subclasses in patients with disease

of varying severity. **Journal of Medical Virology**, Nova York, v. 40, n. 2, p. 102-106, 1993.

THOMAS, S. J.; ENDY, T. P. Critical issues in dengue vaccine development. **Current Opinion in infectious diseases**, Hagerstown, v. 24, p. 442-450, 2011.

VALDES, K. et al. Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.7, n.5, p.856-857, 2000.

VAZQUEZ, S. et al. Evaluation of immunoglobulin M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay Panbio kits for diagnostic dengue infections. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdã, v.39, p.94-198, 2007.

VERHAGEN, L. M.; DE GROOT, R. Dengue in children. **The Journal of Infection**, Londres, v.69, p.77-86, 2014.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v.5, n.220, p.1-17, 2014.

WADUGE, R. et al. Dengue infections during pregnancy: a case series from Sri Lanka and review of the literature. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdã, v.37, n.1, p.27-33, 2006.

WAHALA, M. P.; SILVA, A. M. The human antibody response to dengue vírus infection. **Viruses**, Basel, v. 3, n. 12, p. 2374-2395, 2011.

WATANAVEERADEJ, V. et al. Transplacentally transferred maternal-infant antibodies to dengue virus. **American Journal and Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.69, n.2, p.123-128, 2003.

WHITEHEAD, S. S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature reviews. Microbiology**, Londres, v.5, n.7, p.518-528, 2007.

WHITEHORN, J.; SIMMONS, C.P. The pathogenesis of dengue. **Vaccine**, Amsterdã, v.29, n.42, p.7721-7228, 2011.

WILSON, M. E; CHEN, L. H. Dengue: update on epidemiology. **Current Infectious Disease Reports**, Filadélfia, v.17, n.1, p.1-8, 2015.

WITAYATHAWORNWONG, P. DHF in infants, late infants and older children: a comparative study. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v.36, n.4, p.896-900, 2005.

APÊNDICES



APÊNDICE A – Questionário da gestante

**INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROFESSOR FERNANDO FIGUEIRA - IMIP
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES - CPqAM**

Pesquisa: Imunidade materna e incidência da infecção pelo vírus dengue e Cinética de anticorpos antídengue em neonatos

QUESTIONÁRIO DA GESTANTE

Nº do registro da gestante (IMIP) (fixar a etiqueta do IMIP)		Nº registro da amostra de sangue da mãe (FIXAR ETIQUETA DA MÃE)	
Colar etiqueta do registro		Colar etiqueta	
1. No registro na pesquisa	2. Local do recrutamento:	3. Data do recrutamento:	4. Data provável do parto
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	1. Ambulatório IMIP 2. PSF 3. Maternidade IMIP	____/____/____	____/____/____
CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA E SOCIOECONÔMICA MATERNA			
5. Quantos anos você completou no seu último aniversário?		6. Qual a data do seu nascimento?	
____ anos <input type="text"/> <input type="text"/>		____/____/____	
Endereço:			
Logradouro: _____ N° _____			
Bairro: _____		Codigo bairro <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	Localidade: _____
Telefone 1: _____		Obs Tel 1	
Telefone 2: _____		Obs Tel 2	
Telefone 3: _____		Obs Tel 3	
Como posso chegar a sua casa? _____			
Possui parente ou amigo mais próximo que moram no Recife ? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> Grau de parentesco: _____			
Endereço do contato:			
Logradouro: _____			N° _____
Bairro: _____		Localidade: _____	
Telefone 1: _____		Obs Tel 1	
Telefone 2: _____		Obs Tel 2	
Telefone 3: _____		Obs Tel 3	
Como posso chegar a casa dele? _____			
7. Qual a sua cor/raça ?	8. Qual a sua situação conjugal ?	9. Qual foi o curso mais elevado que você concluiu?	
1. Parda 2. Negra <input type="checkbox"/> 3. Branca 4. Indígena 5. Oriental (amarela) 6. Ignorado	1. Solteira 2. União estável (mora junto) <input type="checkbox"/> 3. Casada no civil 4. Separada/divorciada 5. Viúva 6. Ignorado	1. Alfabetização 2. 1ª a 4ª série do 1º grau 3. 5ª a 8ª do 1º grau 4. Ensino Médio 5. Supletivo ensino fundamental 6. Superior 7. Não concluiu nenhum curso <input type="checkbox"/>	
10. Número de anos de estudo	11. Qual o seu rendimento no mês passado?	12. Qual foi a renda da sua família no mês passado?	
____ <input type="text"/> <input type="text"/>	R\$ _____ <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	R\$ _____	
	0. Não tem 8. Não sabe informar	0. Não tem 8. Não sabe informar	
DADOS DA GESTAÇÃO ATUAL			

13. Qual a data (dia/mês/ano) da última menstruação? ____/____/____		14. Idade gestacional: _____ semanas		15. Alguma vez tomou vacina para febre amarela ? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>	
16. Observação do cartão vacinal contra febre amarela 1. Não apresentou o cartão 2. Apresentou cartão e há registro da vacina <input type="checkbox"/> 3. Apresentou cartão, mas não consta essa vacina <input type="checkbox"/>			17. Data da dose da vacina contra febre amarela (anotação cartão de vacina) ____/____/____		
DADOS DO PARTO E DO RN (PREENCHER APÓS O PARTO)					
18. Data do parto ____/____/____		19. Hora do parto ____:____		20. Tipo de parto: 1. Normal <input type="checkbox"/> 2. Cesário <input type="checkbox"/> 3. Outro <input type="checkbox"/>	
21. Alterações da placenta (avaliação macroscópica): 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>			22. Tipo de alteração: Descrever o tipo de alteração encontrado _____		
23. Peso ao nascer (g) _____ g	24. Sexo 1. Feminino <input type="checkbox"/> 2. Masculino <input type="checkbox"/>	25. Idade gestacional _____ semanas <input type="text"/> <input type="text"/>	26. Apgar no 1º min _____ <input type="checkbox"/>	27. Apgar no 5º min _____ <input type="checkbox"/>	
DADOS DA GESTANTE (PREENCHER APÓS O PARTO)					
28. A senhora fuma? 1. Sim (siga para a questão 24) 2. Não (siga para a questão 26) 3. Fumou, mas parou (siga para a questão 25) 8. Não informou <input type="checkbox"/>		29. Nos últimos 30 dias, nos dias que fumou, quantos cigarros aproximadamente você fumou? 1. Eu não fumei nos últimos 30 dias 2. < 1 cigarro por dia 3. 1 cigarro por dia <input type="checkbox"/> 4. 2 a 5 cigarros por dia 5. 6 a 10 cigarros por dia 6. 11 a 20 cigarros por dia 7. + de 20 cigarros por dia		30. Há quanto tempo você parou de fumar? 1. Menos de 1 mês 2. 1-3 meses 3. 4 - 11 meses <input type="checkbox"/> 4. 1 ano 5. 2 anos 6. 3 anos ou mais	
31. Intercorrências infecciosas durante a gestação atual (1 – Sim 2 – Não)					
<input type="checkbox"/> ITU	<input type="checkbox"/> Sífilis	<input type="checkbox"/> HIV	<input type="checkbox"/> Hepatite	<input type="checkbox"/> Rubéola	<input type="checkbox"/> Outras DST
32. Tomou corticoides ou imunossupressores durante a gestação ? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/>			33. Teve dengue na gravidez atual ? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/>		
33. Caso sim, há quanto tempo atrás ? ___ Dias <input type="text"/> <input type="text"/> ___ meses <input type="text"/> <input type="text"/>			34. Teve febre alguma vez durante a gravidez atual ? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/>		
35. Se sim, há quanto tempo atrás ? ___ Dias <input type="text"/> <input type="text"/> ___ meses <input type="text"/> <input type="text"/>			36. Teve ou está tendo febre nos últimos 30 dias ? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/>		
37. Teve ou está tendo febre nos últimos 7 dias ? (SE SIM, coletar sangue para NS1) 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/>				38. Resultado do NS1: 1. Positivo 2. Negativo <input type="checkbox"/>	
39. Se tem ou teve febre nos último sete dias, sentiu ou vem sentindo algum(s) desses sintomas? (1 – Sim 2 – Não 8 – Não sabe)					
___ Dor de cabeça <input type="checkbox"/>	___ Dor no corpo <input type="checkbox"/>	___ Dor nos olhos <input type="checkbox"/>	___ Moleza <input type="checkbox"/>	___ Manchas róseas no corpo <input type="checkbox"/>	
___ Dor nas juntas <input type="checkbox"/>	___ Coceira <input type="checkbox"/>	___ Dor na barriga <input type="checkbox"/>	___ Náuseas (estômago embrulhado/vontade de vomitar) <input type="checkbox"/>		
___ Diarreia <input type="checkbox"/>	___ Dor nas pernas <input type="checkbox"/>				
40. Sorologia materna FIXAR AQUI A ETIQUETA DA AMOSTRA DE SANGUE DO CORDÃO <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 5px auto;">Colar etiqueta</div>			41. Coleta de sangue da mãe 1. Realizada <input type="checkbox"/> 2. Não realizada <input type="checkbox"/> 3. Material insuficiente		42. Coleta de sangue do cordão 1. Realizada <input type="checkbox"/> 2. Não realizada <input type="checkbox"/> 3. Material insuficiente
Nome entrevistador (ambulatório)					
Nome entrevistador (maternidade)					
Responsável pela coleta do cordão					
Responsável pela coleta do sangue materno					

APÊNDICE B – Questionário de seguimento do lactente

INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA - IMIP
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES - CPqAM

Pesquisa: Imunidade materna e incidência da infecção pelo vírus dengue e Cinética de anticorpos antidengue em lactentes

QUESTIONÁRIO DE SEGUIMENTO DO LACTENTE

N° registro da criança pesquisa <div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; margin: 5px auto;"></div>	N° registro da mãe na pesquisa <div style="border: 1px solid black; width: 60px; height: 20px; margin: 5px auto;"></div>	N° prontuário criança no IMIP <div style="border: 1px solid black; width: 150px; height: 40px; margin: 5px auto; border-radius: 10px; text-align: center; padding: 5px;"> Colar etiqueta </div>
DADOS DE IDENTIFICAÇÃO		
Nome da criança: <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black; margin: 5px 0;"/>		

Endereço (caso tenha havido mudança de endereço do responsável):		
Logradouro: _____	N° _____	
Bairro: _____	Localidade: _____	
Telefones 1:	Obs Tel 1	
Telefone 2:	Obs Tel 2	
Telefone 3:	Obs Tel 3	

Número da avaliação	1ª				2ª				3ª			
Data da avaliação	_ / _ / _				_ / _ / _				_ / _ / _			
Idade		meses		dias		meses		dias		meses		dias
1. O endereço é o mesmo ?	1. Sim				1. Sim				1. Sim			
	2. Não	<input type="checkbox"/>			2. Não	<input type="checkbox"/>			2. Não	<input type="checkbox"/>		
2. O telefone é o mesmo ?	1. Sim				1. Sim				1. Sim			
	2. Não	<input type="checkbox"/>			2. Não	<input type="checkbox"/>			2. Não	<input type="checkbox"/>		
INTERROGATÓRIO SINTOMATOLÓGICO												
3. Febre (no dia consulta)		1. Sim		2. Não		1. Sim		2. Não		1. Sim		2. Não
4. Diarréia *		1. Sim		2. Não		1. Sim		2. Não		1. Sim		2. Não
*Número de evacuações/dia												
5. Fezes com sangue		1. Sim		2. Não		1. Sim		2. Não		1. Sim		2. Não
6. Exantema**		1. Sim		2. Não		1. Sim		2. Não		1. Sim		2. Não
**Descrever												
7. Tosse		1. Sim		2. Não		1. Sim		2. Não		1. Sim		2. Não
8. Coriza		1. Sim		2. Não		1. Sim		2. Não		1. Sim		2. Não
9. Cansaço/dispnéia		1. Sim		2. Não		1. Sim		2. Não		1. Sim		2. Não
10. Edema de extremidades		1. Sim		2. Não		1. Sim		2. Não		1. Sim		2. Não
13. Outros***		1. Sim		2. Não		1. Sim		2. Não		1. Sim		2. Não
***Descrever												

Número da avaliação	1ª		2ª		3ª			
Status vacinal								
	No de doses	Data última dose	No de doses	Data última dose	No de doses	Data última dose		
14. BCG			-	-	-	-		
15. Hepatite B								
16. Tetraivalente								
17. Pólio oral								
18. Pólio IM								
19. Rotavírus								
20. Pneumococos								
21. Meningococo								
22. A criança teve febre nos últimos 30 dias ?(se respondeu não, siga para questão 24)	<input type="checkbox"/>	1. Sim	<input type="checkbox"/>	2. Não	<input type="checkbox"/>	1. Sim	<input type="checkbox"/>	2. Não
23. Quanto tempo durou a febre ?	99. Não se aplica __Dias <input type="text"/> <input type="text"/> __Horas <input type="text"/> <input type="text"/>		99. Não se aplica __Dias <input type="text"/> <input type="text"/> __Horas <input type="text"/> <input type="text"/>		99. Não se aplica __Dias <input type="text"/> <input type="text"/> __horas <input type="text"/> <input type="text"/>			
24. Alguma vez teve febre desde que nasceu ou desde a última avaliação?	<input type="checkbox"/>	1. Sim	<input type="checkbox"/>	2. Não	<input type="checkbox"/>	1. Sim	<input type="checkbox"/>	2. Não
25. Quando tempo durou a febre?	99. Não se aplica __Dias <input type="text"/> <input type="text"/> __Horas <input type="text"/> <input type="text"/>		99. Não se aplica __Dias <input type="text"/> <input type="text"/> __Horas <input type="text"/> <input type="text"/>		99. Não se aplica __Dias <input type="text"/> <input type="text"/> __Horas <input type="text"/> <input type="text"/>			
26. Teve febre pela última vez há quanto tempo? Se respondeu sim à questão 24)	__Dias <input type="text"/> <input type="text"/> __Meses <input type="text"/> <input type="text"/> __Horas <input type="text"/> <input type="text"/>		__Dias <input type="text"/> <input type="text"/> __Meses <input type="text"/> <input type="text"/> __Horas <input type="text"/> <input type="text"/>		__Dias <input type="text"/> <input type="text"/> __Meses <input type="text"/> <input type="text"/> __Horas <input type="text"/> <input type="text"/>			
27. Desde a última avaliação, alguém da casa teve dengue?	<input type="checkbox"/>	1. Sim	<input type="checkbox"/>	2. Não	<input type="checkbox"/>	1. Sim	<input type="checkbox"/>	2. Não
ALIMENTAÇÃO								
28. Está mamando no peito ? Se respondeu não, siga para a questão 31.	<input type="checkbox"/>	1. Sim*	<input type="checkbox"/>	2. Não**	<input type="checkbox"/>	1. Sim	<input type="checkbox"/>	2. Não

PERGUNTAS PARA AS QUE MAMAM								
29. *Vem tomando leite ou outra comida que não é leite de peito ?	<input type="checkbox"/>	1. Sim	<input type="checkbox"/>	2. Não	<input type="checkbox"/>	1. Sim	<input type="checkbox"/>	2. Não
30. *Com que idade começou a tomar leite/outra comida	__Dias <input type="text"/> <input type="text"/> __Meses <input type="text"/> <input type="text"/>		__Dias <input type="text"/> <input type="text"/> __Meses <input type="text"/> <input type="text"/>		__Dias <input type="text"/> <input type="text"/> __Meses <input type="text"/> <input type="text"/>			
PERGUNTAS PARA AS QUE NÃO MAMAM								
31.**A criança mamou alguma vez ?	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não				
32. Com que idade parou de mamar no peito ?	__Dias <input type="text"/> <input type="text"/> __Meses <input type="text"/> <input type="text"/>		__Dias <input type="text"/> <input type="text"/> __Meses <input type="text"/> <input type="text"/>		__Dias <input type="text"/> <input type="text"/> __Meses <input type="text"/> <input type="text"/>			

Número da avaliação	1ª				2ª				3ª			
EXAME FÍSICO												
33. Temperatura (°C)												
34. Peso (em g)												
35. Comprimento (cm)												
36. FC (bpm)												
37. FR (ipm)												
38. PA (mm Hg)												
TESTES ESPECÍFICOS PARA DENGUE												
Coleta de sangue	<input type="checkbox"/>	1. Sim	<input type="checkbox"/>	2. Não	<input type="checkbox"/>	1. Sim	<input type="checkbox"/>	2. Não	<input type="checkbox"/>	1. Sim	<input type="checkbox"/>	2. Não
Data	_ / _ / _				_ / _ / _				_ / _ / _			
Resultado IgG	1. Negativo <input type="checkbox"/> 2. Positivo <input type="checkbox"/> 3. Indeterminado				1. Negativo <input type="checkbox"/> 2. Positivo <input type="checkbox"/> 3. Indeterminado				1. Negativo <input type="checkbox"/> 2. Positivo <input type="checkbox"/> 3. Indeterminado			
Resultado Ig M	1. Negativo <input type="checkbox"/> 2. Positivo <input type="checkbox"/> 3. Indeterminado 4. NSA				1. Negativo <input type="checkbox"/> 2. Positivo <input type="checkbox"/> 3. Indeterminado 4. NSA				1. Negativo <input type="checkbox"/> 3. Indeterminado 4. NSA			
PRNT realizada ?	<input type="checkbox"/>	1. Sim	<input type="checkbox"/>	2. Não	<input type="checkbox"/>	1. Sim	<input type="checkbox"/>	2. Não	<input type="checkbox"/>	1. Sim	<input type="checkbox"/>	2. Não
Data	_ / _ / _				_ / _ / _				_ / _ / _			
Sorotipos (PRNT)												
DENV -1	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não
DENV -2	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não
DENV -3	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não
DENV -4	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>	Não
Titulação PRNT												
DENV -1												
DENV -2												
DENV -3												
DENV -4												

ANEXOS



ANEXO A – Parecer do comitê de Ética



Título do Projeto: “Incidência da infecção pelo vírus dengue, Imunidade Materna e Cinética de anticorpos antidengue em crianças no primeiro ano de vida”.

Pesquisador responsável: Maria Cynthia Braga.

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 06/08/2010

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 59/10

Registro no CAAE: 0061.0.095.000-10

PARECER Nº 63/2010

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 03 de novembro de 2013. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 03 de novembro de 2010.



Giselle Campos Gouveia
Farmacêutica
Coordenadora
Mat. SIAPE 0463376
CPqAm / FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 03/11/2011.

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.870-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br

