Carolina Argondizo Correia

Influência da vacinação com dTpa em gestantes no perfil da resposta imunológica
contra a *Bordetella pertussis* na criança

Dissertação apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicina Tropical

Orientador: Dr. Cyro Alves de Brito

São Paulo

2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de
São Paulo da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro,
CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pela autora

Correia, Carolina Argondizo

Influência da vacinação com dTpa em gestantes no perfil da resposta imunológica contra a *Bordetella pertussis* na criança / Carolina Argondizo Correia. – São Paulo, 2018.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientador: Cyro Alves de Brito

Descritores: 1. COQUELUCHE. 2. GESTANTES. 3. VACINAÇÃO. 4. IMUNOLOGIA CELULAR.

USP/IMTSP/BIB-05/2018.

Aos meus pais, meus heróis; em especial à minha mãe, que me ensinou, nas palavras de Alberto Caeiro, que "(...) eu sou do tamanho do que vejo, e não do tamanho da minha altura".

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus avós Neusa Nalin Argondizo, Orival Argondizo, Tereza Ferreira Correia e Júlio Fernandes Correia (*in memoriam*), pela coragem e pelo amor que superou dificuldades e atravessou cidades e oceanos para formar a nossa família.

Aos meus pais, Beatriz Argondizo Correia e Nelson Ferreira Correia, pela vida, pelo amor, pelo exemplo, pelo apoio incondicional em todos os momentos. Vocês são a minha força.

Ao meu irmão, João Pedro Argondizo Correia, pelo companheirismo, pelo interesse em saber como era estudar “tosse”, e por todas as conversas e risadas sobre qualquer coisa.

Ao meu namorado e parceiro Giancarlo de Mattos Cardillo, por dividir tudo comigo, me apoiando, aconselhando, distraindo ou fazendo o que fosse necessário para tudo dar certo no final.

Ao meu orientador e amigo Dr. Cyro Alves de Brito, pelo convite para participar do projeto, pela orientação, paciência, amizade e auxílio desde o início. Seu exemplo e apoio foram fundamentais não só para a elaboração deste trabalho, mas também para a minha formação como pessoa e como cientista.

À grande amiga Elaine Uchima Uehara, pela amizade e ajuda desde o começo, no laboratório, nas culturas, nos nossos CBAs incríveis. Agradeço também às queridas amigas Kelly Cristina Alves de Oliveira, Camila Yumi Yonamine, Tabata Lourenço Felício, Hyndyrah Negri Rodrigues Sodr, Ana Kelly Sousa Rodrigues e Alcione da Silva Allig pela amizade, companheirismo, conversas e risadas, deixando o laboratório bem mais leve e feliz.

À Dra. Paula Ordonhez Rigato pelos conselhos de vida e carreira e pela animação contagiante pela pesquisa.

À Dra Maria Notomi Sato, seu grupo de pesquisa e todos os funcionários do LIM-56 da FMUSP, pelo auxílio no desenrolar do projeto e pela infraestrutura para a realização dos experimentos.

À Dra. Lourdes Rehder de Andrade Vaz de Lima pelo apoio ao projeto e por disponibilizar as amostras do projeto de coqueluche.

Às equipes dos Hospitais-Maternidade Leonor Mendes de Barros e Interlagos que recrutaram os participantes e coletaram as amostras e os dados necessários para a realização do projeto.

Às mães e bebês voluntários no estudo; mesmo sem benefício direto proveniente do nosso estudo, as mães se preocuparam em doar amostras e informações suas e de seus filhos, tornando o nosso trabalho possível.

Ao Instituto Adolfo Lutz e os funcionários do Centro de Imunologia, pela disponibilidade dos laboratórios, equipamentos e infraestrutura.

Ao Instituto de Medicina Tropical, em especial à Dra. Thelma Suely Okay, pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock, meu orientador na iniciação científica, por me iniciar na carreira acadêmica e me ensinar a ser uma pessoa crítica e a perseguir os ideais da vida acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do auxílio à pesquisa (processo nº 2015/16157-1) e da bolsa de mestrado (processo nº 2015/19726-7) como apoios financeiros para a realização deste projeto.

Eu gostaria também de deixar registrado o meu agradecimento a todos os animais que participam involuntariamente do mundo científico. O conhecimento gerado por meio deles é a base de toda a ciência, portanto eles devem ser lembrados e sempre receber nossos agradecimentos.

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente deste trabalho, obrigada por fazerem parte desta etapa da minha vida!

*Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.*

Fernando Pessoa (1888-1935)

RESUMO

Correia CA. Influência da vacinação com dTpa em gestantes no perfil da resposta imunológica contra a *Bordetella pertussis* na criança (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2018.

A *Bordetella pertussis* é a bactéria causadora da coqueluche, doença infectocontagiosa que tem reemergido em diversos países apesar das altas coberturas vacinais. Como os indivíduos mais afetados são crianças menores de seis meses de idade, a vacinação de gestantes com uma dose de vacina adsorvida contra tétano, difteria e coqueluche (*B. pertussis* acelular – dTpa) foi proposta. O objetivo é promover a transferência de altos títulos de anticorpos maternos ao feto e recém-nascido, resultando na sua proteção até que o seu esquema vacinal esteja concluído. Esta estratégia é empregada em diversos países e no final de 2014 foi introduzida no Brasil. Entretanto, pouco se sabe sobre sua eficácia, efetividade e interação com a posterior vacinação da criança, que é realizada com a formulação de células inteiras (DTP), enquanto outros países substituíram-na pela formulação acelular (DTPa). Sabe-se que a vacinação materna induz anticorpos que ajudam a proteger recém-nascidos da infecção, mas podem, também, neutralizar a vacinação da criança, diminuindo a eficiência vacinal, além de promover a transferência de antígenos para o feto, induzindo desvio do perfil de resposta. Esses aspectos são particularmente importantes e devem ser investigados quando novos programas de vacinação materna são implantados. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta celular contra *B. pertussis* em parturientes e neonatos no dia do parto, e em lactentes após vacinação completa contra a coqueluche com DTP no primeiro ano de vida, comparando-se o grupo proveniente de mães que foram

vacinadas durante a gestação com as que não receberam a dose de reforço. As células mononucleares do sangue periférico e de cordão umbilical dos participantes foram isoladas e estimuladas com antígeno bacteriano ou antígeno policlonal em cultura. Após o tempo estipulado, verificou-se o perfil de expressão gênica por qPCR nas células e a concentração de citocinas de interesse em sobrenadante, por meio de citometria de fluxo. Os dados obtidos mostram que a vacina na gestação induz resposta celular favorável à proteção contra infecção em gestantes, com produção de citocinas de perfil Th1 após estímulo antigênico, enquanto que nos neonatos poucas citocinas estavam acima dos limites de detecção. Quando se comparou a resposta de lactentes nascidos de mães vacinadas ou não durante a gestação, não foi encontrada diferença significativa nos níveis de citocinas produzidos, sugerindo que os anticorpos maternos presentes durante o desenvolvimento fetal e os primeiros meses de vida das crianças não interferiu no processo de reconhecimento e geração de resposta específica. Apesar do número amostral limitado, este trabalho mostra um panorama da interação da vacinação materna com a resposta celular à vacinação da criança no seu primeiro ano de vida, mostrando que a princípio a dose de reforço com dTpa durante a gestação é capaz de gerar resposta celular protetora nas gestantes, prevenindo-as de transmitir a doença a seus filhos, e a resposta humoral produzida não interfere na geração de resposta celular de seus filhos após o seu próprio esquema de imunização.

Descritores: Coqueluche. Gestantes. Vacinação. Imunologia celular.

ABSTRACT

Correia CA. Influence of pregnant women's Tdap vaccination in the child's immunological response profile against *Bordetella pertussis* (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2018.

Bordetella pertussis is the bacterial agent of whooping cough, an infectious and contagious re-emerging disease despite high vaccine coverage. As the most affected are children younger than six months of age, a dose of tetanus/diphtheria/pertussis vaccine (acellular pertussis – Tdap) in pregnancy was proposed. It is aimed to promote the transfer of high maternal antibodies' titres to the foetus and newborns, resulting in their protection until their own vaccination scheme is completed. This strategy is present in several countries, and it was implemented in Brazil by the end of 2014. However, little is known about its efficacy, effectiveness and interaction with the subsequent child's vaccination, which comprehends the whole-cell formulation (DTP), while other countries replaced it for the acellular version (DTaP). Maternal vaccination induces antibodies that would protect newborns from infection, but they can also neutralize the effect of the child vaccination, reducing the vaccine efficiency. Besides, it can promote the transfer of antigens to the foetus, which can induce deviation in the response pattern. These aspects are particularly important and should be investigated when new maternal vaccination programs are implemented. Therefore, the aim of this project was to evaluate the cellular response against *B. pertussis* in women at labour and their neonates, as in young children after complete pertussis vaccination by the first year of life, comparing groups from vaccinated and non-vaccinated women during pregnancy. Peripheral blood and cord blood mononuclear cells were isolated and stimulated with bacterial or polyclonal antigen in

culture. After the stipulated time the gene expression profile and cytokine concentration were evaluated by qPCR and flow cytometry. Data from the present study show that pregnancy vaccination inducing favourable cellular response for protection against infection in pregnant women, with Th1 cytokines' production upon antigenic stimulus, while in newborns few cytokines were detected above the detection limit. When comparing children's response, born either from vaccinated or unvaccinated mothers, cytokine levels were not significantly different, suggesting that maternal antibodies present during foetal development and first months of life do not interfere with recognition and cellular response generation to vaccination. Despite limited sample size, this work shows a broader view of interaction between maternal and child vaccination, showing that the Tdap boost dose during pregnancy may be able to generate protective response in women, preventing them to transmit the disease to children, and the induced humoral response may not interfere in generating cellular response in children after their own vaccination.

Descriptors: Whooping cough. Pregnant women. Vaccination. Cellular immunology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT	Toxina adenilato ciclase
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CBA	<i>Cytometric bead array</i>
CBMC	Células mononucleares de cordão umbilical
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CR	Receptor do sistema complemento
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DC	Célula dendrítica
DTP	Vacina contra difteria, tétano e pertussis celular
DTPa	Vacina contra difteria, tétano e pertussis acelular infantil
dTpa	Vacina contra difteria, tétano e pertussis acelular do adulto
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FcR	Receptor de Fc
FcRn	Receptor de Fc neonatal
FHA	Hemaglutinina filamentosa
FIM	Fímbria
Hib	<i>Haemophilus influenzae B</i>
IFN- γ	interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LOS	Lipooligossacarídeo

LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MNV	Mãe não vacinada com dTpa na gestação
MS/GM	Ministério da Saúde/Gabinete do Ministro
MV	Mãe vacinada com dTpa na gestação
n	Número amostral
NK	Célula <i>natural-killer</i>
NO	Óxido nítrico
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NV	Lactentes filhos de mães não vacinadas com dTpa na gestação
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PHA	Fitoemaglutinina
PRN	Pertactina
PT	Toxina pertússica
qPCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real (quantitativa)
RCF	Força centrífuga relativa
RNA	Ácido ribonucleico
RNV	Recém-nascidos filhos de mães vacinadas com dTpa na gestação
RNNV	Recém-nascidos filhos de mães não vacinadas com dTpa na gestação
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute

TCT	Citotoxina traqueal
Th	Célula T <i>helper</i>
TLR	Receptor do tipo <i>toll</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Célula T reguladora
V	Lactentes filhos de mães vacinadas com dTpa na gestação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Interação da <i>Bordetella pertussis</i> com o epitélio ciliado do trato respiratório humano.....	21
Figura 2 -	Desenho esquemático da <i>Bordetella pertussis</i> e seus fatores de virulência.....	22
Figura 3 -	Distribuição dos casos de coqueluche no Brasil, por faixa etária, segundo o ano de ocorrência.....	28
Figura 4 -	Calendário Nacional de Vacinação básico no início da vida.....	34
Figura 5 -	Cinética do recrutamento de células para os pulmões e resposta imune subsequente da infecção por <i>B. pertussis</i> em modelo murino.....	36
Figura 6 -	Mecanismos da infecção natural e imunidade induzida por vacinas pela <i>Bordetella pertussis</i> em modelo murino.....	39
Figura 7 -	Ondas de ontogenia celular nas primeiras fases da vida.....	42
Figura 8 -	Mecanismos de regulação da imunidade perinatal.....	43
Figura 9 -	Resposta celular de parturientes vacinadas com dTpa frente à PHA.....	63
Figura 10 -	PBMC de parturientes vacinadas com dTpa apresentam potencial contra patógenos intracelulares.....	64
Figura 11 -	PT induz produção de citocinas de perfil Th1 em parturientes vacinadas.....	66
Figura 12 -	Baixa produção de resposta celular em PBMC de neonatos frente à PHA.....	67
Figura 13 -	Expressão relativa de genes relacionados à resposta Th1, Th2 e Th17 em neonatos.....	68
Figura 14 -	Baixa produção de citocinas por neonatos após estímulo antigênico.....	70
Figura 15 -	Correlação da produção de citocinas entre mães e neonatos.....	71
Figura 16 -	Expressão relativa de genes relacionados à resposta Th1, Th2 e Th17 em lactentes.....	72

Figura 17 - Aumento basal da expressão de <i>GATA3</i> e <i>IFNG</i> em lactentes filhos de mães vacinadas.....	73
Figura 18 - A produção de citocinas por lactentes filhos de mães vacinadas ou não na gestação não apresenta diferenças quantitativas.....	75
Figura 19 - Correlação da produção de citocinas nos lactentes.....	77
Figura 20 - Efeitos bivalentes dos anticorpos maternos.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos amostrais do estudo.....	55
Tabela 2 - Informações dos participantes do estudo.....	56
Tabela 3 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados no estudo.....	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 <i>Bordetella pertussis</i>	20
1.2 Fatores de virulência.....	22
1.3 Patogênese da coqueluche	25
1.4 Epidemiologia.....	27
1.5 Considerações sobre o ressurgimento da coqueluche	29
1.6 Vacinação	31
1.7 Resposta imune associada à infecção por <i>B. pertussis</i>	34
1.8 Resposta imune associada à vacinação.....	38
1.9 Imunidade neonatal.....	41
1.10 Novas estratégias de vacinação	46
1.11 Vacinação materna	48
1.12 Justificativa	50
2 OBJETIVOS.....	52
2.1 Objetivo geral	52
2.2 Objetivos específicos	52
3 METODOLOGIA	53
3.1 Casuística	53
3.2 Critérios de exclusão.....	54
3.3 Grupos de estudo e coleta das amostras biológicas	54
3.4 Separação do plasma	57
3.5 Obtenção das células mononucleares	57
3.6 Cultivo celular.....	57
3.7 Reação semi-quantitativa de cadeia de polimerase em tempo real (qPCR)	58
3.8 Dosagem de citocinas.....	59
3.8.1 BD TM Cytometric Bead Array (CBA)	59
3.8.2 LEGENDplex TM	60
3.9 Análise dos resultados.....	61
4 RESULTADOS	62
4.1 Perfil de resposta de PBMC de parturientes.....	62
4.2 Perfil de resposta de CMCB de neonatos	67

4.3 Resposta materna X resposta neonatal.....	71
4.4 Perfil de resposta de PBMC de lactentes.....	71
5 DISCUSSÃO.....	79
6 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	91
APÊNDICES	104
ANEXOS.....	109

1 INTRODUÇÃO

A wonderful fact to reflect upon, that every human creature is constituted to be that profound secret and mystery to every other.

Charles Dickens (1812-1870)

A *Bordetella pertussis* é o principal agente causador da doença conhecida atualmente como coqueluche. Embora seja considerada uma doença recente, existem relatos de crises de tosse violentas acometendo crianças pequenas desde meados de 1190¹. Chamada de *kinkehost*, tosse comprida, tosse convulsa, tosse dos 100 dias, pertussis, *chin-cough*, *quintesse de l'enfant*, latido de cachorro ou simplesmente “a tosse”, nos séculos XVI e XVII diversos médicos europeus descreveram acessos de tosse em crianças que podiam levar a óbito, mas a falta de uniformidade na nomenclatura tornava difícil a identificação da doença¹.

A primeira grande epidemia de coqueluche foi descrita por Guillaume de Baillou, em 1578 em Paris², mas foi no século XVIII, se não antes, que a doença foi vista como contagiosa e quem apresentasse seus sintomas uma vez não teria a doença novamente, segundo o médico sueco Nils Rosen von Rosenstein¹.

Hoje sabe-se que a coqueluche é uma doença infecciosa aguda do trato respiratório inferior, causada principalmente, e em forma mais grave, pela bactéria *B. pertussis*. Ela é caracterizada por acessos paroxísticos típicos de tosse^{3,4} e é uma doença cosmopolita e endêmica em todo o mundo, apresentando epidemias cíclicas, com maior frequência durante as estações do verão e do outono³.

1.1 *Bordetella pertussis*

A *B. pertussis* foi identificada pela primeira vez em 1900 pelo imunologista Jules Bordet, mas o seu isolamento ocorreu somente seis anos depois com o auxílio do bacteriologista Octave Gengou no Instituto Pasteur de Bruxelas⁵. Logo foi descrita como um cocobacilo Gram negativo aeróbio estrito, não esporulado, capsulado, imóvel e provido de fímbrias⁶.

O gênero *Bordetella* pertence à família *Alcaligenaceae* e consiste em pelo menos oito espécies associadas a hospedeiros animais: *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. petrii* e *B. ansorpii*. As espécies *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* são patógenos clássicos de mamíferos e, apesar de a primeira ser o principal agente causal da coqueluche em humanos, 14% dos casos tem a *B. parapertussis* como responsável, gerando quadros mais leves da doença⁷.

O único hospedeiro da *B. pertussis* é o ser humano, e sua transmissão entre indivíduos se dá por meio de aerossóis gerados por pacientes infectados. Quando inalada, adere às células ciliadas e aos fagócitos do epitélio respiratório, pelos quais possui tropismo, e inicia a produção de toxinas patogênicas (Figura 1), para impedir a rápida eliminação pelo hospedeiro e favorecer sua disseminação para o trato respiratório inferior⁸. Em seguida, ela tanto pode ser fagocitada por macrófagos e se replicar intracelularmente⁹ quanto evadir de mecanismos de proteção como células ciliadas, células produtoras de muco, competição com microbiota local, sequestro de íons de ferro e imunidade inata¹⁰, estimulando diferentes braços da resposta imune. O mecanismo imunológico de resposta à infecção ainda não está completamente elucidado e é continuamente estudado^{11–14}.

A ocorrência da doença é limitada ao sistema respiratório e sua forma sistêmica é rara. Mesmo com a eliminação do patógeno pelo hospedeiro ou por meio de

antibióticos, os sintomas podem permanecer por vários meses, porém sem forma crônica¹⁵.

Figura 1 - Interação da *Bordetella pertussis* com o epitélio ciliado do trato respiratório humano. As toxinas pertússica (PTX) e adenilato ciclase (ACT) são tóxicas para as células do hospedeiro, principalmente macrófagos. A parada do movimento ciliar é induzida pela citotoxina traqueal (TCT) e pode induzir episódios de tosse intensa, para a remoção do muco acumulado. A toxina dermonecrótica (DNT) causa inflamação e necrose. Outras proteínas funcionam como moléculas de adesão, como a pertactina (PRN), hemaglutinina filamentosa (FHA), fímbrias (FIM), fator A de colonização traqueal (Tcf), proteína resistente à morte (BrkA), autotransportador Vag8, e outros autotransportadores (Bats). A *B. pertussis* contém lipooligossacarídeo (LOS) na sua membrana externa, e os sistemas de secreção tipo I, III e IV são utilizados pela bactéria para transferir moléculas bacterianas para a célula do hospedeiro¹⁶.

A infecção por *B. pertussis* é de desenvolvimento e resolução lentos, devido à produção bacteriana de diversos fatores imunomoduladores que tentam controlar a resposta imune do hospedeiro, seja pela diferenciação de células T reguladoras (Tregs), evasão da resposta imune ou indução de secreção de citocinas imunossupressoras por células da imunidade inata. O número e a natureza dos fatores de virulência requeridos para essas estratégias são o resultado da coevolução entre bactéria e hospedeiro¹⁴.

1.2 Fatores de virulência

Os principais fatores de virulência da *B. pertussis* que contribuem para a geração do quadro clínico da coqueluche são as toxinas e os fatores de adesão (Figura 2).

Figura 2 - Desenho esquemático da *Bordetella pertussis* e seus fatores de virulência. ACT: toxina adenilato ciclase; FHA: hemaglutinina filamentosa; LPS: lipopolissacarídeo; PRN: pertactina; PT: toxina pertússica; TCF: fator de colonização traqueal; TTSS: sistema de secreção tipo III⁸.

A citotoxina traqueal (TCT, *tracheal cytotoxin*) é um dissacarídeo-tetrapeptídeo derivado de peptideoglicano que se liga a receptores tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*), ativa mecanismos de imunidade inata e promove a morte de células epiteliais respiratórias *in vitro* por mecanismo que envolve interleucina (IL) 1 e óxido nítrico (NO)^{14,15}.

A toxina adenilato ciclase (ACT, *adenylate cyclase toxin*) possui diversos papéis na invasão. Ao ligar-se no receptor de complemento 3 (CR3, *complement receptor 3*) em células como macrófagos, a ACT induz apoptose e parada do ciclo celular, e também inibe fagocitose, quimiotaxia e geração de superóxidos. Quando ligada à calmodulina, catalisa a formação de níveis suprafisiológicos de monofosfato de adenosina cíclico, inibindo a função antibacteriana de macrófagos e suprimindo a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-12p70 e fator de necrose tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*) α ^{8,14}.

A endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) da *B. pertussis* não possui o antígeno O como outras bactérias Gram-negativas, sendo então mais corretamente conhecido como lipooligossacarídeo (LOS). Ainda assim, também é pirogênico, mitogênico e tóxico. Por possuir estrutura atípica, o LOS não é reconhecido pelas proteínas surfactantes do hospedeiro, o que prolonga a sobrevivência do patógeno¹⁰. É o principal antígeno responsável pela reatogenicidade da vacina anti-pertussis de células inteiras, mas sua remoção total diminui a eficácia vacinal¹⁴.

A hemaglutinina filamentosa (FHA, *filamentous hemagglutinin*) é o principal agente de adesão da bactéria na superfície mucosa do trato respiratório, e possui função imunossupressora durante a infecção⁸.

A pertactina (PRN) é uma proteína auto-transportadora que permite a aderência da *B. pertussis* nos monócitos e células epiteliais⁸, e é alvo de anticorpos neutralizantes¹⁴.

As fímbrias (FIM) são apêndices presentes na superfície da bactéria que funcionam como adesinas e possuem vários aglutinógenos que são a base para a sorotipagem do gênero *Bordetella*. São estruturas que agem como alvos antigênicos para anticorpos e linfócitos T, possuem característica imunomoduladora e são introduzidas em algumas formulações vacinais^{8,9,15}.

A toxina pertússica (PT, *pertussis toxin*) recebeu esse nome por se acreditar ser a molécula causadora da coqueluche; porém, ao ser administrada isoladamente, não é capaz de desencadear a doença clínica¹⁵. Ela é o único antígeno específico da *B. pertussis*, sendo o principal fator de virulência secretado e considerado o principal antígeno que leva à geração de resposta protetora¹⁷. Está presente em todas as formulações vacinais existentes até o momento¹⁴. Ela consiste em um monômero A com atividade de adenosina difosfato ribosiltransferase e um oligômero B que se liga na superfície de glicoproteínas em diversas células do hospedeiro. Logo após a infecção, a PT facilita a adesão mediada por FHA da bactéria nos macrófagos imitando as selectinas e assim aumentando a expressão de CR3¹⁴. Suas subunidades contribuem para efeitos imunomoduladores sistêmicos, que suprimem ou promovem a resposta imune do hospedeiro. Por meio de modificações covalentes de moléculas-chave das cascatas de sinalização das células humanas¹⁵, a PT inibe a fagocitose, apresentação e processamento de antígenos e deslocamento para os linfonodos das células apresentadoras de antígenos⁸, além de inibir a quimiotaxia de macrófagos, linfócitos e neutrófilos para o local da infecção, induzir linfocitose, alterar a secreção de insulina, aumentar a sensibilidade à histamina e inibir a produção de anticorpos¹⁰.

Além dos citados acima, a *B. pertussis* possui diversos outros fatores e mecanismos de virulência e de imunomodulação, afetando tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa, abordados em diversas publicações^{7,9,10,14,16}.

1.3 Patogênese da coqueluche

Quando inalada, a bactéria pode ficar em incubação, em média, entre cinco e dez dias, e a progressão da doença estende-se por volta de três semanas, podendo durar até seis semanas em casos raros. O período de transmissibilidade estende-se de cinco dias da exposição até três semanas após o início das crises paroxísticas. Em lactentes – aqui considerados crianças de 29 dias a dois anos de idade exclusiva¹⁸ – menores de seis meses de idade esse período pode prolongar-se por quatro a seis semanas após o início da tosse⁶.

Seu quadro clínico clássico é dividido em três fases, conhecidas como catarral, paroxística e convalescença. A fase catarral tem duração de uma a duas semanas e possui sinais de infecção inespecífica do trato respiratório superior, como coriza acentuada, espirros, febre e tosse ocasional, que se agrava após uma ou duas semanas, dando início à fase paroxística. Esta é a fase na qual geralmente o diagnóstico de coqueluche é feito, pois o paciente começa a apresentar a tosse típica da doença, com duração de duas a seis semanas. Os acessos de tosse são constantes e incontroláveis, mais frequentes à noite, podendo chegar a 30 crises em 24 horas. Os chamados paroxismos são inspirações forçadas, súbitas e prolongadas logo após à tosse - cinco a dez tossidas rápidas e curtas - que podem produzir o som de “guincho” característico, resultado da inalação do ar contra a glote estreitada. As crises podem ser desencadeadas por bocejos, espirros, alimentação ou exercícios físicos. Entre uma crise e outra o paciente possui aparência saudável. Porém, no exame físico, pode-se observar petéquias na cabeça e pescoço ou hemorragias conjuntivais produzidas pelo esforço ao tossir, além de roncos e sibilos na ausculta³. Durante os acessos, o paciente não consegue inspirar, apresenta protrusão da língua, congestão facial, cianose, apneia e vômitos. Os esforços respiratórios durante as crises também podem causar saliência dos olhos, salivação, lacrimejamento,

ingurgitamento das jugulares, hematomas nos espaços meníngeos, prolapso retal, pneumotórax, entre diversos outros sintomas³.

Nas duas primeiras semanas, a frequência e a intensidade dos episódios aumentam, e depois diminuem progressivamente⁶. A gravidade depende da idade e condição física do paciente. A complicação mais frequente é a pneumonia, causada pela própria *B. pertussis* ou por infecção secundária, que gera sintomas como febre e taquipneia. Esse quadro é responsável por mais de 90% das mortes por coqueluche em crianças menores de três anos³.

Em certos indivíduos, a doença pode se manifestar de forma atípica. Há crianças cujos sintomas não envolvem tosse com paroxismos e os guinchos estão ausentes; no entanto, é comum haver crises de apneia que podem resultar em hipóxia significativa. Adolescentes e adultos em geral possuem quadro mais brando, com tosse persistente devido à traqueobronquite, mas com paroxismos, guincho e leucocitose ausentes, dificultando o diagnóstico¹⁹.

O desaparecimento dos sintomas ocorre na fase de convalescença, mas episódios de tosse comum podem persistir por até três meses⁶.

Em casos raros pode verificar-se complicações neurológicas como convulsões, hemiplegia, ataxia, afasia, cegueira, surdez e evolução ao coma. Em um terço dos casos pode haver sequelas permanentes no sistema nervoso central, podendo resultar em óbito do paciente. O óbito é mais frequente em lactentes, nos quais as manifestações são geralmente mais graves³.

Sendo uma doença de notificação compulsória, de acordo com o disposto na lei nº 6.259/1975²⁰ e na portaria MS/GM nº 1.271/2014²¹, a confirmação etiológica tem importância fundamental para a sua vigilância.

É válido ressaltar que podem ocorrer dificuldades no diagnóstico devido à inespecificidade do quadro clínico na fase catarral ou nas formas atípicas da doença³. Testes sorológicos são utilizados, porém são limitados ao diagnóstico das fases mais

tardias²², ainda que em alguns casos elevadas concentrações de imunoglobulina (Ig) G em soro de pacientes podem indicar infecção recente²³. O isolamento e detecção da bactéria em cultura ou a identificação de sequências genômicas via reação em cadeia de polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*) são preconizadas pelo Ministério da Saúde e são aplicáveis apenas ao diagnóstico da fase aguda⁶.

A antibioticoterapia é efetiva em eliminar a bactéria, mas não altera o curso clínico da doença se administrada após duas ou três semanas do início dos sintomas²⁴. Contudo, sendo a coqueluche altamente contagiosa e sua taxa de ataque podendo chegar a 90% entre contatos não imunizados, com maior transmissibilidade durante a fase catarral, recomenda-se o tratamento com azitromicina ou claritromicina o mais cedo possível⁶. O tratamento também pode ser administrado nas fases mais tardias da doença, com o objetivo de tornar o paciente não infectante em menos tempo do que na evolução natural da doença²⁴.

1.4 Epidemiologia

Em 2003, era estimado que ocorressem cerca de 50 milhões de casos de coqueluche por ano, com 300.000 mortes em todo o mundo, sendo a maioria de crianças menores de cinco anos de idade²⁵. Já em 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reportou 90.000 óbitos, 95% em países em desenvolvimento, e foram confirmados 140.000 casos em 2016, queda atribuída à alta cobertura vacinal²⁶.

No Brasil, no início dos anos 80 havia mais de 40 mil notificações, com incidência de 30 casos por 100.000 habitantes. A introdução da vacinação nos anos 70 e o aumento de cobertura nos anos subsequentes contribuíram para a queda progressiva no número de casos, até estes não excederem 2.000 notificações nos anos 2000, com incidência de menos de 1 caso por 100.000 habitantes²⁷. Nesta época, a letalidade média foi de 1,7%²⁸.

Entre os anos 2010 e 2014, contudo, foi visto um aumento expressivo no número de casos, com confirmação de 22.426 indivíduos acometidos. Verificou-se que a maioria ocorreu nos meses de verão e primavera, sem localização geográfica preferencial²⁸. O grupo mais acometido foi o de crianças menores de um ano de idade (Figura 3). Em 2014, dos 4.000 casos confirmados em crianças pequenas, 87,5% foi atribuído a crianças menores de seis meses de idade^{28,29}.

Figura 3 - Distribuição dos casos de coqueluche no Brasil, por faixa etária, segundo o ano de ocorrência²⁸.

Entre 2012 e 2014, ocorreram 304 óbitos, com a maioria sendo na região Sudeste do país, em especial no estado de São Paulo. 98,7% dos óbitos concentrou-se nos menores de um ano de idade, e destes 97,2% ocorreu nos menores de dois meses de idade, período no qual as crianças ainda não receberam a primeira dose da vacina²⁸.

Apenas em 2013, 109 mortes relacionadas à doença foram relatadas, número sete vezes maior do que a média anual entre 2001 e 2010³⁰.

Em 2011 e 2012, o aumento do número de casos de coqueluche também foi reportado em países como Argentina, Chile, Canadá, Estados Unidos da América (EUA), Reino Unido e outros^{31,32}.

A incidência de coqueluche nos EUA era menor que 1 por 100.000 habitantes em 1973. No final da década de 1980, a incidência começou a subir gradualmente, alcançando mais de 42.000 casos em 2012, com incidência maior que 9 por 100.000 habitantes³³.

Na Austrália, a cada três ou quatro anos ocorrem epidemias cíclicas da doença, porém entre 2008 e 2012 houve a pior epidemia desde que o registro da coqueluche foi iniciado no país, afetando crianças menores de seis meses de idade e de cinco a nove anos, sugerindo queda na imunidade. Entre 2006 e 2012, 42% dos casos e 91% dos óbitos foram em menores de seis meses³⁴.

No Reino Unido, antes da introdução da imunização de rotina nos anos 1950, grandes epidemias ocorriam a cada três-cinco anos, afetando 150.000 pessoas com 300 óbitos por ano. De 2002 a 2011, a situação estava estável com média de 800 casos por ano, sendo 300 de crianças menores de um ano, com quatro óbitos na Inglaterra e no País de Gales. Porém, desde a metade de 2011, houve um aumento considerável dos casos, chegando a quase 5.000, a maior parte em crianças menores de três meses de idade, das quais nove morreram até o final de 2011³⁵. Em 2012, houve o pico com 9.367 casos, e a partir de então, houve diminuição de 51% entre 2012-2013 e 27% entre 2013-2014³⁶. Na segunda metade de 2015, o número de casos já chegava aos 958; em 2016 foram 1.448, no mesmo período³⁷.

1.5 Considerações sobre o ressurgimento da coqueluche

O recente aumento da incidência em diversos países do mundo, independentemente do nível de desenvolvimento, pode estar relacionado à melhora

no diagnóstico da doença e nos sistemas de vigilância epidemiológica, bem como na redução da eficácia das vacinas³⁸, assunto abordado no próximo item.

Alguns estudos sugerem a presença de alterações genéticas nas cepas circulantes, frente às diferentes formulações vacinais disponíveis^{39–41}. Segundo Plotkin⁴², mudanças no genoma bacteriano para escape da resposta imune podem ser relacionadas a mudanças nos alelos de antígenos, produção de maiores níveis de PT devido ao alelo ptx-P3, e o surgimento de cepas PRN-negativas, como tem sido visto na Europa⁴³ e nos EUA⁴⁴ nos últimos anos.

Há cepas com essas mutações em circulação no Brasil, mas aparentemente elas não são responsáveis pelo aumento do número de casos no país, pois estes se concentram em crianças que ainda não foram totalmente vacinadas⁴⁵.

Além de crianças não vacinadas, a coqueluche passou a acometer adolescentes e adultos na era vacinal, ocasionando ciclos de surtos sazonais nessas faixas etárias⁴⁶. Como a doença nestes dois grupos manifesta-se de forma branda e inespecífica na maioria das vezes, ela é subnotificada nessas faixas etárias e isso faz com que esses grupos perpetuem a circulação da *B. pertussis* na comunidade e sejam fontes de infecção para crianças não vacinadas³⁹.

No Brasil, a PCR foi implementada como ferramenta de diagnóstico em 2009, mais recentemente do que em outros países⁴⁷. Ela gera resultado rápido e mais sensível²³, e pode ter contribuído para um aumento repentino no número de casos, considerando que a sorologia, embora largamente utilizada no país, não é a técnica mais adequada para diagnóstico de crianças menores de um ano de idade²². Os lactentes são mais suscetíveis às infecções, mas possuem menor produção de anticorpos no início da vida⁴⁸, sendo que os títulos detectados neste grupo são provenientes de IgGs maternas circulantes⁴⁹.

Ainda assim, apesar do aumento de casos visto nos anos seguintes à implementação da PCR²⁹, eles continuaram aumentando ano após ano, com a incidência nacional alcançando 37 casos/100.000 habitantes em 2014⁵⁰.

1.6 Vacinação

Antes da ampla disponibilização de vacinas a partir da década de 1950, a coqueluche era uma das doenças infantis mais comuns no mundo todo⁵¹.

Com o isolamento do agente etiológico, Bordet e Gengou elaboraram em 1912 um protótipo de vacina baseada em bactérias mortas⁵² e outros grupos começaram a testá-la, até que em 1915 uma suspensão de bactérias inativadas por formaldeído foi licenciada⁵³. Porém, foi somente na década de 30, com o trabalho das pesquisadoras Pearl Kendrick e Grace Eldering, que se obteve os primeiros dados de um estudo clínico de grande escala e posterior padronização e disseminação da vacina⁵⁴.

Na década de 40, pesquisadores americanos combinaram a vacina de células mortas com os toxoides diftérico e tetânico, produzindo a vacina combinada difteria/tétano/pertussis (DTP). A vacina foi rapidamente recomendada e na década de 50 a vacinação com DTP tornou-se rotina nos EUA⁵².

Nas décadas de 50 e 60 houve expressiva redução da incidência e mortalidade por coqueluche. A introdução da vacinação está associada à queda de mais de 95% da incidência de coqueluche, comparando-se números de 2014 com a incidência da doença na primeira metade do século XX⁵⁵, alcançando eficácia de 80% em países com ampla cobertura vacinal⁵¹.

No Brasil, a DTP foi introduzida em 1977, e desde 1990 a incidência da doença caiu de 10,6/100.000 habitantes para 0,32/100.000 habitantes⁵⁶.

Devido à presença de endotoxinas e outras toxinas ativas na célula bacteriana, houve aparecimento de reações adversas após vacinação com DTP, como reações locais e febre, além de convulsões e encefalopatias². Em 1975, duas crianças japonesas morreram logo após o recebimento de uma dose da vacina. Apesar de ter sido provado que não houve relação entre a vacinação e os óbitos, o Japão suspendeu temporariamente o seu uso e depois alterou o esquema vacinal, e em outros países houve queda na sua cobertura, o que levou à ocorrência de grandes epidemias de coqueluche⁵⁷.

O aparecimento de reações adversas levou pesquisadores japoneses a desenvolver uma vacina acelular, baseada em dois dos principais antígenos da *B. pertussis*, PT e FHA, que fosse menos reatogênica que a vacina de células inteiras. A nova formulação foi licenciada em 1981 e desde então outras formulações semelhantes, algumas com acréscimo de outros antígenos, foram licenciadas em outros países^{57,58}.

As vacinas acelulares são constituídas de antígenos purificados da bactéria, selecionados de acordo com sua capacidade de gerar resposta imune protetora. Atualmente, as formulações podem conter de um a cinco antígenos, entre PT, FHA, PRN e FIM 2 e 3. Elas também podem variar na concentração de antígenos, no clone bacteriano utilizado, nos métodos de purificação e detoxificação, adjuvantes e conservantes utilizados⁵¹.

As vacinas adsorvidas acelulares são apresentadas em duas formulações: DTPa, para vacinação de crianças, ou dTpa, para vacinação de adultos, respectivamente com maior ou menor quantidade de toxoide diftérico e de antígenos da *B. pertussis* presentes⁵⁹. Para a imunização de indivíduos maiores de sete anos de idade é sempre recomendada a utilização de dTpa, pois as reações adversas à DTP tendem a aumentar com a idade e o número de aplicações⁵¹.

Muito países, principalmente do hemisfério norte, substituíram a DTP por formulações acelulares em seu calendário vacinal, porém países como Brasil e Argentina não o fizeram, muito em parte por conta do custo elevado da vacina acelular⁵¹.

A OMS recomenda a administração de três doses de vacina no primeiro ano de vida, começando a partir da sexta semana, e com as outras duas doses administradas com intervalos de quatro a oito semanas cada, até os seis meses de idade. Ela afirma que ambas as vacinas acelular e celular são seguras e eficazes na prevenção da doença no primeiro ano de vida⁵¹. Contudo, ela recomenda que países de baixo e médio desenvolvimento que possuem a DTP em seus calendários não a substituam pela vacina acelular para a vacinação de crianças, pois a DTP possui baixo custo e alta efetividade, sem grandes eventos adversos correlacionados⁶⁰.

Dados de modelos matemáticos⁶¹ e experimentos com primatas não-humanos⁶² mostram que a vacina acelular é capaz de prevenir sintomas graves mas não impede a colonização bacteriana, ou seja, os animais são capazes de transmitir a bactéria para contatos não-imunizados. Isso pode ser uma possível explicação para a permanência do patógeno em populações vacinadas majoritariamente com a vacina acelular.

Além disso, sabe-se que, ao passo que a imunidade decorrente da infecção natural não é duradoura, podendo haver decaimento entre quatro e 20 anos após infecção⁶³, a imunidade induzida pela vacinação também não é. Após vacinação com DTP na infância estima-se que a imunidade tenha duração de quatro a 12 anos, enquanto que após imunização com a formulação acelular esse período é ainda menor, mesmo após doses de reforço posteriores^{60,63-65}.

Consequentemente, a OMS alerta para a possibilidade de re-emergência da coqueluche em países que utilizam apenas o esquema DTPa/dTpa. Ela sugere o uso de doses de reforço aos dois anos de idade, na gestação e em pessoas que tenham

contato com crianças pequenas, para evitar a ocorrência de coqueluche grave nesse grupo de risco⁶⁶.

O Ministério da Saúde do Brasil recomenda o esquema de vacinação de crianças aos dois, quatro e seis meses de idade com a vacina pentavalente, formulação que contém a DTP combinada com *Haemophilus influenzae* B (Hib) e hepatite B recombinante, além de uma dose de reforço de DTP aos 15 meses e outra aos quatro anos (Figura 4). No sistema público, a vacinação acelar só é recomendada para crianças maiores de sete anos de idade, ou crianças com alguma condição de risco de desenvolver reações à vacina de células inteiras⁶. O Ministério da Saúde não incluiu a vacina acelar no calendário infantil pois, além da menor duração da imunidade, a DTP é produzida no Brasil, tem menor custo e não diminui a imunogenicidade da vacina Hib quando combinada com ela⁶⁷.

Grupo Alvo	Idade	BCG	Hepatite B	Penta/DTP	VIP/VOP	Pneumocócia 10V (conjugada)	Rotavírus Humano	Meningocócica C (conjugada)	Tríplice viral
Crianças	Ao nascer	Dose única	Dose ao nascer						
	2 meses			1ª dose	1ª dose (com VIP)	1ª dose	1ª dose		
	3 meses							1ª dose	
	4 meses			2ª dose	2ª dose (com VIP)	2ª dose	2ª dose		
	5 meses							2ª dose	
	6 meses			3ª dose	3ª dose (com VIP)				
	9 meses								
	12 meses					Reforço		Reforço	1ª dose
	15 meses			1º reforço (com DTP)	1º reforço (com VOP)				
	4 anos			2º reforço (reforço com DTP)	2º reforço (com VOP)				

Figura 4 - Calendário Nacional de Vacinação básico no início da vida. Em vermelho, destaque para esquema de vacinação cntra a coqueluche Adaptado de Brasil⁶⁸. BCG: Bacilo Calmette-Guérin; DTP: Difteria/tétanto/coqueluche celular; VIP: Vacina inativada poliomielite; VOP: Vacina oral poliomielite.

1.7 Resposta imune associada à infecção por *B. pertussis*

Macrófagos e células dendríticas (DCs, *dendritic cells*) imaturas residentes e infiltradas são as primeiras células do sistema imune inato a detectar e responder à

infecção por *B. pertussis* (Figura 5). Estudos em camundongos mostram que a infecção é seguida de infiltrado inflamatório nos pulmões, com recrutamento de DCs, macrófagos, neutrófilos e linfócitos, principalmente CD4⁺. IgG e IgA também são detectadas, sendo que a IgG é detectável somente após eliminação da bactéria do trato respiratório, evidenciando a importância das respostas celulares inata e adaptativa no *clearance* do patógeno¹⁴.

As bactérias fagocitadas por macrófagos são em grande parte destruídas em compartimentos acidificados, mas uma pequena fração consegue evadir a destruição e sobreviver em ambientes mais favoráveis dentro das células¹⁴. A morte da bactéria pelos macrófagos é potencializada na presença de interferon (IFN) γ e IL-17, com o IFN- γ também aumentando a produção de NO, evidenciando a importância de células T *helper* (Th) 1 e Th17 no *clearance* de bactérias intracelulares¹⁴.

O papel principal das DCs é a apresentação dos antígenos para as células T e a produção de citocinas inatas que promovem a diferenciação de células T *naïves*¹⁴. O seu reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos é responsável pela indução de sinais pró-inflamatórios que serão cruciais na produção de citocinas e quimiocinas acompanhando a infiltração leucocitária seguida da ativação de linfócitos T. Um exemplo é a ligação do LPS no receptor do tipo *toll* (TLR, *toll-like receptor*) 4 das DCs, que promove sua maturação e secreção de IL-12 e IFN- γ , levando à indução de células Th1. As células ativadas com ACT, por sua vez, promovem a indução de linfócitos Th17, a partir da produção de IL-1 β e IL-23, importantes para o *clearance* bacteriano e recrutamento de neutrófilos¹⁴. Além disso, de modo similar à FHA e o LPS, pode promover resposta anti-inflamatória pelas células dendríticas com a indução de secreção de IL-10, o que leva à geração de Tregs produtoras de IL-10, inibindo a geração de células efetoras Th1 e retardando a eliminação da bactéria^{8,14}.

Figura 5 - Cinética do recrutamento de células para os pulmões e resposta imune subsequente da infecção por *B. pertussis* em modelo murino. As curvas hipotéticas representam números relativos de células imunes recrutadas nos pulmões de camundongos após infecção primária com a bactéria. T CD4⁺: recrutamento de células T CD4⁺ para os pulmões e resposta contra os antígenos bacterianos. Bp CFU: unidades formadoras de colônia de *B. pertussis* nos pulmões. DC: células dendríticas. IgA: IgA anti-*B. pertussis* nos pulmões. IgG: IgG anti-*B. pertussis* no soro. Mac: macrófagos. NK: células *natural killers*¹⁴.

Os neutrófilos possuem vida curta e não são reservatórios para a *B. pertussis*, mas possuem papel na morte de bactérias fagocitadas, assim como as células *natural-killer* (NK), que, apesar da sua predominância na eliminação viral, são fonte de IFN- γ e assim também exercem um papel na imunidade contra a bactéria¹⁴.

Os anticorpos agem como agentes neutralizantes de toxinas bacterianas na proteção contra *B. pertussis*, inibindo bactérias extracelulares de ligarem nas células da mucosa respiratória ou facilitando a captura e destruição destas por macrófagos e neutrófilos⁹. Entretanto, ainda não foi possível definir título específico de anticorpos contra um ou mais antígenos que seja capaz de constatar proteção^{9,69,70}. Mesmo assim, acredita-se que a fagocitose mediada por anticorpos tenha um importante papel na eliminação da bactéria. Em sua revisão, de Gouw *et al.*¹⁰ citam estudos que relacionam a presença de IgG contra PT, FIM e PRN com proteção, e associam a ligação com receptores de Fc (FcR) γ com a melhor eliminação da bactéria do trato

respiratório. Ainda, como os fatores de virulência FHA, FIM, PRN e PT mediam ligação e internalização da bactéria por macrófagos, células polimorfonucleares e células epiteliais traqueais, anticorpos contra esses antígenos podem prevenir a aderência das bactérias nessas células e promover a captura via opsonização⁹.

A imunização passiva com antissoro contra *B. pertussis* mostra redução da gravidade da doença em pacientes infectados, além de altos níveis de IgG anti-PT em crianças as tornarem menos propensas a desenvolver coqueluche grave. Isso evidencia o papel protetor de anticorpos em humanos¹⁴. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) detectam presença de IgA, IgG, IgE e IgM após infecção e/ou vacinação, mas de duração limitada⁷¹, e alguns estudos constataam que a presença de altos níveis de anticorpos anti-PT e anti-pertactina podem ser correlacionados com proteção^{69,72}.

A dosagem de anticorpos é problemática, apesar de superestimada. O ensaio de IgG por ELISA não detecta anticorpos funcionalmente relevantes, não refletindo necessariamente o que acontece na mucosa respiratória. Além do mais, a dosagem de IgG dá pouca informação sobre a indução de memória imunológica ou do envolvimento de subtipos de linfócitos T distintos na proteção⁹.

A infecção por *B. pertussis* induz IgA secretada em mucosas e posteriormente IgG, detectada no soro. Esses isótipos podem ser adquiridos via colostro e placenta, respectivamente, gerando proteção aos recém-nascidos¹⁴.

Apesar do foco em anticorpos como correlatos de proteção, a detecção de linfócitos T CD4⁺ específicos para PT, FHA, PRN em crianças infectadas indica que a imunidade celular é importante para eliminação da bactéria na infecção natural¹⁴. Mais especificamente, estudos mostram que uma resposta eficiente é a mediada por células Th1, com produção de IFN- γ . Essa citocina contribui para o aumento da resposta oxidativa de macrófagos e estimula a fagocitose^{13,73–75}.

Evidências experimentais em modelos murinos sugerem que o desenvolvimento de respostas Th1 e Th17 está relacionado com a velocidade de eliminação da bactéria. Camundongos *knock-out* para IFN- γ ou IL-17A desafiados *in vivo* com o patógeno mostraram maiores quantidades de unidades formadoras de colônia 10 dias após infecção do que camundongos selvagens¹³.

Clones de linfócitos T de indivíduos que tiveram coqueluche mostram um padrão de citocinas característico de células Th1, e estudos com crianças convalescentes ou na fase aguda da doença mostram secreção de IFN- γ e IL-2, enquanto IL-4 e IL-5 foram indetectáveis em resposta de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) aos estímulos com PT, FHA, PRN, ou a *B. pertussis* morta^{9,75}. Outros estudos mostram a importância do IFN- γ no *clearance* bacteriano, após infecção natural ou vacinação com a vacina de células inteiras, enquanto que após a vacinação acelular verificou-se resposta expressiva de anticorpos e linfócitos Th2, segundo revisão de Higgs *et al.*¹⁴.

1.8 Resposta imune associada à vacinação

No que concerne à resposta celular, há diferenças significativas no perfil de resposta associado à vacina de células inteiras em comparação às formulações acelulares (Figura 6).

No geral, a DTP promove uma resposta de perfil Th1, similar à infecção natural, com detecção de IFN- γ , TNF- α e IL-2 após estímulo *in vitro*. Por outro lado, após vacinação com DTPa/dTpa detecta-se IFN- γ e/ou IL-5/IL-4, marcando um perfil Th2 ou misto Th1/Th2, além da presença de células T CD4⁺ secretoras de IL-17^{11,76-}

Figura 6 - Mecanismos da infecção natural e imunidade induzida por vacinas pela *Bordetella pertussis* em modelo murino. A infecção natural ou imunização com vacina de células inteiras (wP) promove indução de células Th1 e Th17. As células Th1 ativam macrófagos a matar bactérias intracelulares e promovem produção de IgG2a por células B. As células Th17 auxiliam no recrutamento de neutrófilos que fagocitam e matam a *B. pertussis*. As vacinas acelulares (aP) induzem células Th2 e Th17. As células Th2 ativam a produção de IgG1 pelos linfócitos B, porém a proteção induzida por essas vacinas também é mediada por linfócitos Th17. DC: célula dendrítica. Adaptado de Alleen e Mills⁷⁶.

Uma análise de soro de indivíduos vacinados com a DTP mostrou presença de IFN- γ e TNF- α ⁷⁴ e níveis significativos de IgG1, ao passo que na resposta à vacina acelular citocinas do tipo Th2 como IL-4 e IL-5 são predominantes. Além disso, os níveis de anticorpos anti-pertussis permanecem detectáveis por um período maior na vacinação com DTP. Na vacina acelular, um adjuvante comumente utilizado é um sal de alumínio, que também é conhecido por promover proliferação de células Th2, além de induzir células Th17 e produção de IgG2¹³.

Essa diferença se dá por conta da formulação vacinal, pois enquanto a DTP contém a bactéria inteira e pode simular a infecção natural, as formulações acelulares

possuem apenas antígenos selecionados, gerando uma resposta menos potente e abrangente^{14,79}. Acredita-se que células T específicas para *B. pertussis* secretoras de IL-4 e IL-5 (Th2) são importantes para a indução de resposta humoral, apesar de que a concentração destes anticorpos se torna quase nula dentro de dois a três anos. Enquanto isso, as células Th1 limitam o curso da infecção pelo aumento de fagocitose de bactérias, e se mantêm ativas por cerca de quatro anos, sugerindo a existência de linfócitos de memória^{80,81}.

Além disso, sabe-se que a vacinação na infância com a vacina de células inteiras faz com que o sistema imune da criança seja primado para uma resposta Th1, e mesmo recebendo doses de reforço de vacinas acelulares posteriormente, ela irá produzir uma resposta de perfil predominantemente Th1. Da mesma maneira, crianças vacinadas com DTPa na série primária de imunização, se receberem a DTP como reforço ou complemento da série, irão produzir uma resposta de perfil misto Th1/Th2^{77,81}. Esse fenômeno é conhecido como “pecado antigênico original”, no qual após reexposição a antígenos semelhantes a uma infecção prévia, os indivíduos respondem da mesma maneira da qual responderam no primeiro contato com o antígeno. O pecado antigênico original reflete a preferência à reativação de células de memória de alta afinidade, ao invés de recrutar células *naïves* de baixa afinidade⁸².

Não obstante, há estudos que mostram que crianças vacinadas no primeiro ano de vida com a DTPa possuíam maior secreção de IFN- γ do que de IL-5 em resposta a antígenos bacterianos *in vitro*, quatro anos depois^{81,83}. Porém, essa relação se inverte após dose de reforço com a vacina acelular entre os quatro e os seis anos de idade⁸¹. Apesar de a DTPa induzir um perfil misto Th1/Th2, acredita-se que a resposta celular decaia após os quatro anos de idade, mas que ela possa ser reforçada por infecções naturais assintomáticas se a bactéria estiver em circulação⁸, adquirindo assim perfil predominantemente Th1.

Quanto à produção de anticorpos, a imunização primária de crianças com a DTP mostrou indução de IgG específica anti-PT, anti-FHA e anti-PRN, a partir da primeira dose da vacina aos dois meses e com duração de até dois anos⁸⁴. A IgG anti-PT também foi correlacionada positivamente com a proteção de crianças após vacina acelular⁷². Contudo, há indícios de que a IgG anti-PT formada após infecção natural possua maior avidéz e duração do que a induzida a partir da vacinação acelular⁸⁵.

1.9 Imunidade neonatal

Ao nascer, o neonato é exposto a um ambiente repleto de estímulos antigênicos e possui grande suscetibilidade a infecções. Durante muito tempo atribuiu-se essa suscetibilidade a um sistema imune deficiente e imaturo⁸⁶, porém hoje sabe-se que a sua responsividade é menor em relação ao adulto e que os efeitos reguladores decorrentes da tolerância materno-fetal durante o desenvolvimento podem permanecer após o parto⁸⁷. Sabe-se que há potencial de resposta antimicrobiana, mas com necessidade de equilíbrio entre hipoinflamação e hiperinflamação, uma vez que o neonato passa por uma fase de transição do ambiente parcialmente estéril da placenta para o meio ambiente externo⁸⁷.

A linha do tempo da ontogenia celular e funções efectoras e reguladoras na imunidade nas primeiras fases da vida estão representadas na Figura 7. A maturidade das células do sistema imune no feto humano sustenta a ideia de que o sistema imune fetal tem potencial pró-inflamatório e antimicrobiano, sendo então necessárias funções tolerogênicas para o desenvolvimento seguro do feto^{87,88}.

Figura 7 - Ondas de ontogenia celular nas primeiras fases da vida. A linha do tempo mostra o período gestacional, no qual a hematopoiese ocorre no saco vitelínico e no fígado fetal, e depois do nascimento ocorre predominantemente na medula óssea (BM). As principais populações de células incluem macrófagos, células B e células T (DP: duplo positivo; SP: *single positive*; CTLs: linfócitos T citotóxicos). Em rosa, estão as células com atividade supressora, como células B regulatórias (Bregs), células eritroides CD71⁺ e células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs). Durante a gestação, diferentes linfócitos inflamatórios e efetores aumentam progressivamente no sangue e nas mucosas, incluindo pele (LC: células de Langerhans; DCs: células dendríticas) e intestinos (MAIT: células T invariantes associadas a mucosa; ILCs: células linfoides inatas, células T *memory-like* e células T IL-8⁺ *naïves*), enquanto o pulmão é colonizado após o parto. Adaptado de Zhang, Zhivaki e Lo-Man⁸⁷.

Os mecanismos gerais da imunidade perinatal estão exemplificados na Figura 8. Como o reconhecimento de patógenos é mediado pelos mesmos receptores que podem reconhecer organismos comensais que irão colonizar o neonato a partir do nascimento, eles devem ser regulados a fim de evitar inflamação nociva⁸⁷.

Figura 8 - Mecanismos de regulação da imunidade perinatal. As diferenças entre leucócitos adultos e neonatais são observadas a nível epigenético. Elas são responsáveis pela menor resposta de IL-12 quando células apresentadoras de antígenos como células dendríticas (DCs) neonatais são estimuladas com agonistas de TLR e pela maior geração de células Th2 e Tregs, e menor indução de células Th1. IL-33 derivada de células estromais e células linfoides inatas (ILC) 2 são fatores neonatais extrínsecos capazes de aumentar a diferenciação de células Th2. A sinalização de receptores de lectina tipo C (CLRs) nas APCs pode restaurar a capacidade de indução de Th1. Em certas infecções pode ser encontrada em neonatos a expressão elevada de proteína de morte celular programada 1 (PD1), marcador de exaustão de células T CD4⁺ e CD8⁺. Células T produtoras de IL-8 são abundantes em neonatos, bem como Tregs, Bregs, neutrófilos regulatórios e células supressoras derivadas mieloides (MDSCs) com função imunorreguladora. A produção da citocina anti-inflamatória IL-10 por essas células pode ser induzida em resposta a estímulo de TLR por antígenos bacterianos ou virais. Células eritroides CD71⁺ podem suprimir respostas imunes via depleção de arginina pela arginase 2 (ARG2)⁸⁷.

Neonatos saudáveis expressam TLR de forma estável e semelhante a adultos, e são capazes de aumentar a expressão desses em suas células mononucleares no caso de sepse bacteriana⁸⁹. Entretanto, essas células, como neutrófilos, monócitos e macrófagos, possuem maior dificuldade de expressar moléculas coestimuladoras, secretar citocinas como TNF- α , IL-12p70 e IFN- γ e responder a quimiocinas, até aproximadamente os dois anos de idade^{90–92}.

As células apresentadoras de antígenos possuem menor capacidade de processamento de antígenos, com menor expressão de moléculas coestimuladoras, como CD80 e CD86, e de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, *major histocompatibility complex*) de classe II. Desse modo, a interação com CD28 dos linfócitos T fica comprometida, favorecendo a anergia^{87,90-92}.

Os neutrófilos encontram-se em menor número na medula óssea e são mais imaturos em relação aos adultos, possuindo menores quantidades de peptídeos antimicrobianos pré-formados e menor capacidade de eliminação de bactérias Gram negativas, justificando a maior suscetibilidade de neonatos a infecções e sepse^{90,93}.

As células NK encontram-se em número bastante aumentado no sangue periférico dos neonatos, mas com dificuldade na secreção de IFN- γ ⁹².

As proteínas do sistema complemento encontram-se reduzidas e com menor capacidade de opsonização, quimiotaxia e atividade lítica. No entanto, há níveis bastante elevados de monofosfato cíclico de adenosina no plasma de neonatos, o que parece contribuir para a produção de citocinas pró-inflamatórias^{94,95}.

Essas diferenças qualitativas e quantitativas na resposta imune inata se refletem no desenvolvimento e no perfil da resposta imune adaptativa neonatal. Recém-nascidos não possuem um microambiente anatômico apropriado para interação de células dendríticas com linfócitos T e B (não há demarcação definida entre as diferentes zonas linfoides)⁹¹ e as células T CD4⁺ neonatais possuem menor capacidade de gerar células de memória e de gerar respostas Th1 efectoras, também por conta da menor produção de IL-12 pelas DCs⁸⁷; assim, há menor produção subsequente de IL-12 e IFN- γ ⁸² e menor expressão de CD40L⁹⁰, o que leva também a uma menor produção de IgG, IgA e IgE⁹¹.

Contudo, a produção de IL-10 e IL-6, IL-23 e IL-1 β , citocinas que contribuem para a polarização de células Th17, é maior do que nos adultos^{87,89}. A maior produção

de IL-10 no início da vida foi mostrado ser predominante em casos de infecção por *B. pertussis*^{87,96,97}.

Ao passo que há menor polarização de células Th1, há maior detecção de IL-4 em células neonatais tanto sem estímulo quanto quando estimuladas, em comparação às células de adultos, bem como elevada expressão de *GATA3*. O *locus* de Th2 encontra-se hipometilado em neonatos, e metilado em adultos, enquanto que a transcrição da subunidade p35 da IL-12p70 em DCs derivadas de monócitos estimuladas com LPS é limitada por regulação epigenética^{87,98}. Isso faz com que haja predominância de células Th2 no período neonatal, inclusive após vacinações. Contudo, sabe-se que a vacina contra a tuberculose (Bacilo Calmette-Guérin) pode induzir células Th1⁹⁹, então pode ser que a predominância do perfil Th2 não seja um viés característico do período neonatal, mas sim derivada da dificuldade em polarizar células para o perfil Th1 nesse período⁸⁷.

O neonato também possui níveis elevados de fator de transformação do crescimento β , o que favorece o desenvolvimento de Tregs que se encontram principalmente nas mucosas intestinal e pulmonar⁸⁷, e a presença de células eritroides CD71⁺, que parecem suprimir a ativação de células T por conta da produção de arginase 2¹⁰⁰.

A predominância de linfócitos Th2, Th17 e Tregs, aliada à ausência de memória, favorece a maior suscetibilidade do neonato à diversas infecções por patógenos intracelulares¹⁰¹. Além disso, os anticorpos produzidos pelos neonatos possuem curta duração, início tardio, menor afinidade, heterogeneidade reduzida e resposta deficiente contra polissacarídeos bacterianos⁹⁰. Há também baixa indução de plasmócitos e menor migração para a medula óssea, o que contribui para a resposta humoral limitada e o rápido declínio de anticorpos vacinais, limitando a vacinação posterior ao parto^{48,91,92}.

1.10 Novas estratégias de vacinação

Devido à maior suscetibilidade dos neonatos e lactentes frente à infecção por *B. pertussis*⁵¹, a ocorrência de complicações, a taxa de hospitalização e a letalidade nestes grupos são quatro vezes maior do que em adolescentes ou adultos¹⁰².

A principal fonte de infecção para as crianças são os contatos domiciliares, principalmente os irmãos e os pais, que podem apresentar formas leves ou inespecíficas da doença^{103–105}. Cerca de um terço tem como fonte de infecção um contato casual na comunidade, como vizinhos, amigos ou outras crianças em parques ou escolas¹⁰⁶. Essas fontes de infecção proporcionam aumento dos casos de coqueluche em lactentes, que está relacionado diretamente com o aumento da ocorrência da doença em adolescentes e adultos¹⁰⁷. Por conta disso, países como Austrália, Canadá, Finlândia, Alemanha e EUA já adotam a estratégia de vacinação com uma dose de reforço contra a coqueluche nesses grupos¹⁰⁸, como meio de compensar a queda natural da imunidade induzida pela vacinação na infância.

Outra estratégia que visa a redução da coqueluche especificamente entre lactentes é a vacinação de pessoas com contato próximo à criança, como familiares e profissionais de saúde. Conhecida como *cocooning*, foi implementada em vários países como Alemanha, França, Austrália e Costa Rica⁵¹. Entretanto, ela tem efetividade limitada, uma vez que, como a criança não tem anticorpos contra a coqueluche, isso exige a vacinação de vários adultos para a sua proteção, o que torna a estratégia de difícil execução e alto custo¹⁰⁹.

A estratégia alternativa mais recente, e foco de estudos atuais, é a imunização de gestantes. Seu objetivo é induzir títulos elevados de anticorpos anti-pertussis na mãe e a transferência transplacentária destes para o feto, resultando na proteção do recém-nascido nos primeiros meses de vida, período no qual são mais vulneráveis à infecção, até a sua vacinação completa¹¹⁰.

Essa estratégia possui menor custo e melhor execução pois, diferentemente do *cocooning*, é necessário somente a vacinação das mães previamente ao parto, e o neonato adquire proteção passiva até o momento em que se torna capaz de produzir seus próprios anticorpos¹⁰⁹.

A vacinação de gestantes foi aprovada pela OMS e por especialistas de diversos comitês americanos, como o *American College of Obstetricians and Gynecologists*. A recomendação destas instituições é a vacinação de todas as gestantes com a vacina dTpa a partir da 27ª até a 36ª semana de gestação, podendo ser aplicada até 20 dias antes da data provável do parto, a fim de reduzir a morbidade e mortalidade em crianças com menores de seis meses de idade¹¹¹.

Países como EUA, Reino Unido e Austrália já recomendam o seu uso desde 2012¹¹². Estudos de eficácia e segurança vêm sendo publicados nestes e outros países, os quais indicam queda nas hospitalizações de crianças devido à coqueluche e queda da gravidade da doença^{49,113–116}.

No Brasil, o Ministério da Saúde oficializou a decisão de incluir a vacinação de gestantes contra a coqueluche no Calendário Nacional de Vacinação em novembro de 2014. Inicialmente foi recomendada de acordo com o período estipulado pela OMS¹¹¹, porém em 2017 o Ministério decidiu alterar a recomendação para a partir da 20ª semana, para abranger o maior número possível de gestantes, incluindo aquelas que não tiveram acesso ao pré-natal. Assim, torna-se possível a vacinação por um maior período de tempo, inclusive no dia do parto ou no período puerperal, com a finalidade de proteger a mãe contra a coqueluche, evitando que esta seja transmissora da doença para seu filho¹¹⁷.

Um acordo de transferência de tecnologia foi firmado entre o Instituto Butantã e o laboratório britânico GlaxoSmithKline, o que permitirá a fabricação da vacina dTpa no Brasil¹¹¹. Até o momento, foi publicado um estudo nacional¹¹⁸ atestando o custo-

benefício da implementação da vacinação em gestantes no Brasil, porém ainda não há estudos locais de efetividade e mecanismos de proteção.

1.11 Vacinação materna

Sabe-se da importância da imunização materna e de seus efeitos protetores nas crianças desde 1879, quando mães que receberam a vacinação contra varíola durante a gestação tiveram seus filhos protegidos contra a doença (Burckhardt¹¹⁹ apud Martino¹²⁰). Hoje, ainda que se saiba que os anticorpos maternos promovem imunidade de curta duração, é visto que a proporção de mortes entre recém-nascidos de um mês de vida é menor do que entre um e três meses²⁴.

As imunoglobulinas no feto em sua totalidade são IgGs maternas, a única classe de anticorpos transferida através da placenta. A transferência se dá via mecanismo ativo mediado por receptor Fc neonatal (FcRn) expresso nos sinciciotrofoblastos durante o desenvolvimento fetal^{90,121}. Todas as subclasses de IgG são transferidas via placenta para o feto, principalmente durante o terceiro trimestre de gestação, e sua meia-vida no recém-nascido é de aproximadamente seis semanas²⁴.

Antes da 16ª semana de gestação, os níveis séricos de IgG do feto correspondem a 8% dos níveis maternos. Entre as 17ª e 22ª semanas, a concentração fetal sérica de IgG varia de 10 a 20%, e após a 22ª semana há rápido aumento, alcançando níveis maternos na 26ª semana. Nas últimas quatro semanas, concentrações fetais excedem concentrações maternas, especialmente de IgG1¹²¹. Os neonatos apenas atingem níveis adultos de IgG própria aos três anos de idade¹²¹.

A transferência das imunoglobulinas depende dos níveis totais de IgG materna e da saturação do FcRn, da idade gestacional, da integridade da placenta, da subclasse de IgG e da natureza do antígeno, sendo maior para antígenos T-dependentes, como proteínas⁹⁰.

Sendo assim, desde a década de 40¹²², a imunização materna é empregada para contribuir na proteção do neonato contra patógenos específicos, além de também proporcionar benefício materno⁹⁰. De maneira geral, além de imunizar a gestante e impedir que ela seja infectada e transmita o patógeno para o recém-nascido não vacinado, a vacinação materna aumenta os títulos de anticorpos no feto e, ao longo de sua meia vida, permite que a criança possua anticorpos específicos passivos por tempo suficiente até a administração da primeira dose da maioria das vacinas, que ocorre aos dois meses de idade²⁴.

Contudo, desde a década de 50¹²³ sabe-se que a presença de anticorpos maternos na criança pode interferir na sua resposta vacinal. Há diversos estudos que abordam o assunto, especialmente em modelos de vacinação de tétano e sarampo^{124–127}.

O intervalo de tempo entre a imunização e o parto pode ser um fator limitante, bem como o comportamento destes anticorpos quando em contato com os antígenos vacinais da infância, ou com as diferentes formulações utilizadas em adultos e crianças^{90,124}.

Concentrações muito elevadas de anticorpos maternos podem suprimir a resposta imune da criança por mecanismos ainda não completamente elucidados. As teorias mais aceitas destacam a formação de imunocomplexos com os antígenos vacinais, inibindo a ativação de linfócitos B da criança; a eliminação do antígeno vacinal via fagocitose dependente de anticorpos; e o mascaramento de epítomos antigênicos vacinais pelos anticorpos maternos, prevenindo a sua ligação com os linfócitos B do neonato^{90,127}.

Para a vacinação contra coqueluche, alguns estudos foram realizados na tentativa de se estimar o melhor período para a vacinação materna, e avaliou-se que esse período seria entre a 27^a e a 31^a semanas de gestação^{128–130}.

Segundo Raya *et al.*¹²⁹, é durante esse período que a taxa de transferência de anticorpos maternos é maior, e também é o mesmo período, especialmente no início do terceiro trimestre¹³¹, em que eles possuem maior avidéz. Ou seja, a IgG anti-PT transferida da mãe para o feto possui elevada avidéz pela toxina, logo é capaz de gerar melhor resposta imune contra a infecção por *B. pertussis*. Não obstante, a vacinação a partir do início do segundo trimestre também parece gerar elevados níveis de anticorpos nos neonatos, além de aumentar o intervalo de tempo para uma maior quantidade de gestantes serem imunizadas¹³².

Como a maioria dos estudos é realizada em países no qual o esquema vacinal de crianças possui a vacina acelular contra a coqueluche, é importante ressaltar a existência de dados mostrando que a inibição dos anticorpos maternos à resposta vacinal infantil é maior quando a vacina da criança é a DTP, em comparação com a DTPa¹³³.

1.12 Justificativa

A vacina tríplice acelular do adulto (dTpa) foi disponibilizada para gestantes na rede pública de saúde brasileira a partir de novembro de 2014. Apesar de já ser indicada em outros países, seu uso é recente e a incorporação de tecnologia de saúde no sistema público deve ser seguida de avaliação de eficácia e efetividade, pois pouco se sabe sobre o seu comportamento no público brasileiro.

Anticorpos maternos ajudam a proteger recém-nascidos da infecção causada pela *B. pertussis* nos primeiros meses de vida, mas podem, também, neutralizar a vacinação destes, diminuindo a eficiência vacinal^{124,134}. Segundo Jones *et al.*¹³⁵, esse efeito inibitório ocorre principalmente com vacinas de células inteiras, não afetando a resposta da criança se a vacina for acelular, como em países como EUA e Reino

Unido. No Brasil, enquanto a vacina acelular é utilizada em adultos, a vacinação das crianças ainda é padronizada pelo sistema público com a formulação celular DTP.

Além disso, a imunização materna durante a gestação pode causar a transferência de antígenos para o feto, o que pode induzir tolerância imunológica do recém-nascido ou alterar padrões de resposta¹³⁶, e até mesmo prevenir o reconhecimento de antígenos pelo feto¹³⁵. Esses aspectos são importantes e devem ser investigados quando novos programas de vacinação materna são implantados, para justificar a sua utilização.

2 OBJETIVOS

Nothing contributes so much to tranquilize the mind as a steady purpose.

Mary Wollstonecraft Shelley (1797-1851)

2.1 Objetivo geral

Considerando a recente implantação no Brasil da vacina difteria/tétano/pertussis acelular do adulto no calendário vacinal das gestantes e as possíveis implicações desta na posterior vacinação da criança, este projeto tem por objetivo avaliar a influência da estratégia de vacinação de gestantes contra a coqueluche na resposta imune celular de seus filhos.

2.2 Objetivos específicos

- a) Analisar o perfil de resposta imune celular das mães vacinadas no dia do parto e correlacioná-lo com o perfil de resposta do recém-nascido;
- b) Verificar a influência da vacinação materna na resposta imune celular das crianças promovida pela série primária de imunização contra a coqueluche.

3 METODOLOGIA

Don't tell me the moon is shining; show me the glint of light on broken glass.

Bernard Cornwell (1944-)

3.1 Casuística

As amostras utilizadas no presente estudo são parte de um projeto maior intitulado “Avaliação da vacina tríplice acelular do adulto (dTpa) em gestantes na redução da ocorrência de coqueluche em lactentes”, em andamento no Instituto Adolfo Lutz em São Paulo (CAAE: 37581114.0.0000.0059). Esse projeto visa avaliar os títulos de anticorpos em mães vacinadas e não vacinadas contra a coqueluche na gestação, e em seus respectivos filhos, tanto no período neonatal quanto após as três primeiras doses de imunização contra a coqueluche.

Ambos os estudos envolveram mães e filhos atendidos nos Hospitais-Maternidade Interlagos e Leonor Mendes de Barros, na cidade de São Paulo, de agosto de 2015 a março de 2017. Foi realizado acompanhamento das participantes do estudo até cerca de um mês após a terceira dose de vacinação com DTP dos lactentes.

Todos os participantes do estudo são brasileiros residentes no município de São Paulo. As mulheres que concordaram em participar do projeto receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e responderam um questionário para coleta de informações demográficas e de saúde.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAAE: 62566716.7.0000.0065).

3.2 Critérios de exclusão

- a) Gestantes que receberam transfusão de sangue ou hemoderivados nos três meses anteriores ao parto;
- b) Gestantes que receberam a vacina dTpa dentro dos últimos 21 dias de gestação;
- c) Gestantes em uso de imunossupressores e/ou corticoides em um período maior que 15 dias;
- d) Gestantes portadoras de doenças cardíacas, neurológicas ou renais;
- e) Gestantes e/ou neonatos portadores de imunodeficiências primárias ou adquiridas;
- f) Gestantes que referiam terem tido sintomas suspeitos de coqueluche durante a gestação;
- g) Neonatos com anomalias cromossômicas e/ou defeitos graves ao nascimento;
- h) Neonatos com peso ao nascer menor do que 2.500 g ou nascidos com menos de 37 semanas de gestação (pré-termos).

3.3 Grupos de estudo e coleta das amostras biológicas

Para ambos os estudos foram coletados cerca de 10 mL de sangue periférico materno de gestantes no dia do parto (referenciadas nos resultados como parturientes) e a mesma quantidade do respectivo cordão umbilical, após dequitação da placenta, de mulheres que receberam ou não a dTpa durante a gestação, de

acordo com sua carteira de vacinação. Dos lactentes, filhos de mães vacinadas ou não, coletou-se cerca de 5 mL de sangue periférico após as três doses da vacina contra a coqueluche, até o período máximo de um ano de idade. Para o presente estudo, cuja finalidade era a avaliação da resposta celular, foi utilizada apenas a fração celular. Sendo assim, para evitar a degradação das células foi necessário que as amostras fossem coletadas e processadas no mesmo dia, não sendo possível seu estoque em geladeira.

As amostras coletadas foram separadas em grupos segundo a Tabela 1. Na Tabela 2 encontram-se informações sobre o período gestacional das participantes e o período de coleta das amostras dos lactentes. O teste U de *Mann-Whitney* bicaudal foi usado para comparação dos dados entre vacinados e não vacinados.

Todas as amostras foram coletadas em tubos heparinizados, com auxílio de seringa e agulha descartáveis, e armazenadas em temperatura ambiente até o transporte ao laboratório, no mesmo dia da coleta.

Tabela 1 - Grupos amostrais do estudo.

Grupo	Amostras
Mães vacinadas com dTpa	19
Recém-nascidos filhos de mães vacinadas com dTpa	19
Mães não vacinadas não dTpa	2
Recém-nascidos filhos de mães não vacinadas com dTpa	2
Lactentes filhos de mães vacinadas com dTpa	33
Lactentes filhos de mães não vacinadas com dTpa	10

Tabela 2 - Informações dos participantes do estudo.

		Grupo vacinado	Grupo não vacinado
N (parturientes)		19	2
Idade no parto (média±IC, em anos)		31,0±2,9	20,0±3,4
Idade gestacional na vacinação (média±IC, em semanas)		30,5±1,3	-
Idade gestacional no parto (média±IC, em semanas)		39,1±1,2	38,6±2,1
Intervalo entre vacinação e parto (média±IC, em semanas)		8,6±1,0	-
Via de parto (%)	Vaginal	7 (36,8%)	2 (100%)
	Cesárea	12 (63,2%)	0 (0%)
N (neonatos)		19	2
Sexo (%)	Feminino	6 (31,6%)	1 (50%)
	Masculino	13 (68,4%)	1 (50%)
N (lactentes)		33	10
Sexo (%)	Feminino	16 (48,5%)	7 (70%)
	Masculino	17 (51,5%)	3 (30%)
Via de parto (%)	Vaginal	14 (42,4%)	6 (60%)
	Cesárea	20 (57,6%)	4 (40%)
Aleitamento materno exclusivo (média±IC, em meses)		6,2±0,6	5,7±1,4
Idade da mãe no parto (média±IC, em anos)		29,9±2,7*	24,3±3,2*
Idade gestacional na vacinação (média±IC, em semanas)		29,6±1,0	-
Idade gestacional no parto (média±IC, em semanas)		39,1±0,6	39,6±0,7
Intervalo entre vacinação e parto (média±IC, em semanas)		9,6±1,0	-
Idade na 1ª dose DTP (mínimo-máximo (média), em dias)		21-92 (62,5)	62-70 (64)
Idade na 2ª dose DTP (mínimo-máximo (média), em dias)		99-155 (128)	122-194 (138)
Idade na 3ª dose DTP (mínimo-máximo (média), em dias)		182-232 (198)	183-267 (212)
Intervalo entre a 3ª dose e a coleta (mínimo-máximo (média), em dias)		10-127 (44)*	7-129 (59)*

Valores marcados com * possuem diferença estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,05$. IC: intervalo de confiança, com $\alpha = 5\%$.

3.4 Separação do plasma

Logo após a chegada das amostras, o sangue total heparinizado foi centrifugado por 10 minutos a 450 RCF para separação das fases plasmática e celular. O plasma foi separado, aliquotado e armazenado a -20 °C para utilização no outro estudo, e a fase celular foi processada para obtenção de PBMC ou células mononucleares do cordão umbilical (CBMC).

3.5 Obtenção das células mononucleares

As amostras sem a fase plasmática foram diluídas em meio RPMI 1640^a (Gibco, EUA), quando de cordão umbilical e lactentes, ou salina (NaCl 0,9%), quando de parturientes, na proporção 1:4 de meio ou 1:2 de salina, para melhor separação entre leucócitos e hemácias. As amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 1.400 RCF em solução de gradiente de densidade Ficoll-Paque™ Plus 1440 (GE Healthcare, Suécia) para separação das células mononucleares. As células obtidas foram quantificadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada de acordo com o ensaio a ser realizado.

3.6 Cultivo celular

As células foram diluídas em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro AB humano (H4522, Sigma, Alemanha) e distribuídas, em duplicata, em microplacas de 48 poços (Nest Biotechnology, China) em volume de 250 µL, totalizando 1×10^6

^a O meio RPMI 1640 foi suplementado com 2 g de NaHCO₃, 10 mL de aminoácidos não-essenciais (Gibco, EUA), 40 mg de gentamicina e 10 mL de L-glutamina 200 mM (Sigma, EUA).

células/poço. As células foram mantidas em incubação em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ *overnight*. No dia seguinte, foram cultivadas com estímulo policlonal fitoemaglutinina (PHA) a 2 µg/mL por 48 horas (Sigma, EUA), ou com estímulo específico do patógeno, toxoide pertussis (PT) a 5 µg/mL por 120 horas, cedido pela GSK, ambos completando volume final de 500 µL/poço.

Depois do tempo determinado em cultura, as células e o sobrenadante foram coletados e armazenados, separadamente, a -80 °C para ensaios posteriores de biologia molecular e dosagens de citocinas. As células foram armazenadas em RNA later (Sigma, EUA) e tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*, PBS)^b.

3.7 Reação semi-quantitativa de cadeia de polimerase em tempo real (qPCR)

Para avaliação da expressão dos genes de interesse, o RNA total das células previamente cultivadas foi extraído em colunas de sílica, utilizando o *RNeasy Mini kit* (QIAGEN, Alemanha) seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante. A possível contaminação por DNA foi neutralizada com o kit RNAqueous[®] Micro Kit (Ambion, EUA). A pureza e a quantidade do RNA foram avaliadas por meio de leitura por espectrofotometria em Nanodrop (Thermo Scientific, EUA). O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total purificado utilizando o *iScriptTM cDNA Synthesis kit* (Bio-Rad, EUA), também conforme a bula.

Para a realização da qPCR, foram utilizados, para cada amostra de 5 ng de cDNA, 7 µL de *SYBR[®] Green PCR Master Mix* (Life Technologies, EUA) e 2 µL da dupla de *forward* e *reverse primers* (1 µM cada, Tabela 3), sendo um gene por poço, em triplicata. As ciclagens foram de 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos e então 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto (pareamento,

^b 21,02 g de Na₂HPO₄, 7,16 g de NaH₂PO₄.H₂O, 164,64 g de NaCl e H₂O de osmose reversa com quantidade suficiente para 1 litro.

extensão e coleta de dados), seguidas de uma curva de dissociação para avaliação da especificidade da reação.

O software do aparelho 7500 (Applied Biosystems, EUA) foi utilizado para obter os dados de *cycle threshold* (Ct) para cada gene. Os dados de Ct foram utilizados para análise comparativa da expressão gênica, que por sua vez foi calculada utilizando-se o método comparativo de Ct proposto por Schmittgen e Livak¹³⁷. Para normalização dos dados de Ct (Δ Ct) foi utilizado o gene constitutivo gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

Tabela 3 - Sequências dos *primers* utilizados no estudo.

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>GAPDH</i>	5' GAAGGTGAAGGTCGGAGT 3'	5' GAAGATGGTGATGGGATTTCCA 3'
<i>RORC2</i>	5' TGGAAGTGGTGCTGGTTAGGA 3'	5' AAGGCTCGGAACAGCTCCAT 3'
<i>GATA3</i>	5' AGATGGCACGGGACACTACCT 3'	5' TAATTCGGGTTTCGCTTCCG 3'
<i>IFNG</i>	5' GTTTTGGGTTCTCTTGGCTGTTA 3'	5' AAAAGAGTTCATTATGCGCTACATC 3'
<i>IL17A</i>	5' GACTCCTGGGAAGACCTCATTGG 3'	5' CTTGTCTCAGAATTTGGGCATCC 3'
<i>IL4</i>	5' ACAGCCTCACAGAGCAGAAGACT 3'	5' TGTTCTTGGAGGCAGCAAAGA 3'
<i>IL10</i>	5' CAGGGCACCCAGTCTGAGAA 3'	5' CACATGCGCCTTGATGTCTG 3'

3.8 Dosagem de citocinas

A concentração de citocinas presente nos sobrenadantes de cultura celular foi determinada via citometria de fluxo por meio de dois *kits* distintos, de acordo com a sensibilidade de detecção de cada citocina. Os *kits* utilizados estão descritos nos itens a seguir.

3.8.1 BD™ Cytometric Bead Array (CBA)

A determinação da concentração das citocinas IL-2, IL-10, IL-17A, TNF- α e IFN- γ nos sobrenadantes de cultura foi realizada utilizando o *kit Cytometric Bead*

Array Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A curva padrão e as amostras foram diluídas e incubadas com esferas de captura e anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina por duas horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, a curva e as amostras foram lavadas por centrifugação a 805 RCF por cinco minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet formado foi ressuspensionado em tampão de lavagem para a análise no citômetro BD LSRFortessa™ (BD Biosciences, EUA). Os limites de detecção teóricos mínimo e máximo para todas as citocinas foram de 4,88 pg/mL e 5.000,00 pg/mL, respectivamente.

3.8.2 LEGENDplex™

A determinação da concentração das citocinas IL-4, IL-5, IL-6 IL-9, IL-13, IL-17F, IL-21 e IL-22 nos sobrenadantes de cultura foi realizada utilizando o *kit* LEGENDplex™ *Human Th Cytokine Panel (13-plex)* (BioLegend®, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A curva padrão e as amostras foram diluídas e incubadas com esferas de captura e anticorpo de detecção biotinilado por duas horas, e marcadas posteriormente com streptavidina-ficoeritrina por 30 minutos, ambos os processos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e sob agitação.

Após a incubação a curva e as amostras foram lavadas por centrifugação a 1.000 RCF por cinco minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet formado foi ressuspensionado em tampão de lavagem. Após nova centrifugação, o pellet foi ressuspensionado em tampão de lavagem para análise no citômetro BD LSRFortessa™ (BD Biosciences, EUA). Os limites de detecção teóricos mínimo e máximo para todas as citocinas foram de 2,4 pg/mL e 10.000,0 pg/mL, respectivamente.

3.9 Análise dos resultados

As análises estatísticas descritiva e inferencial dos grupos foi realizada no software GraphPadPrism (versão 5.0, EUA). Utilizou-se o teste de *Kolmogorov-Smirnov* para verificação da aderência à curva normal, e os testes não paramétricos de *Mann-Whitney*, *Kruskal-Wallis*, Friedman, *Dunn* e *Wilcoxon* para análise inter e intragrupos. O coeficiente de correlação de *Spearman* foi utilizado para correlação de dados demográficos com dados experimentais, e correlação entre citocinas.

Foram considerados valor de α igual a 5%, intervalo de 95% de confiança e nível descritivo dos testes (valor de p) $<0,05$ para significância.

4 RESULTADOS

(...) a scientist must also be absolutely like a child. If he sees a thing, he must say that he sees it, whether it was what he thought he was going to see or not. See first, think later, then test. But always see first. Otherwise you will only see what you were expecting.

Douglas Adams (1952-2001)

Considerando a recente implantação da dTpa no calendário vacinal das gestantes e as possíveis implicações na resposta imune vacinal infantil, buscou-se analisar o perfil de resposta imune celular de cada grupo separadamente, para em seguida compará-los entre si e avaliar a influência da vacinação materna no perfil de resposta do lactente após a sua série primária de imunização contra a coqueluche.

4.1 Perfil de resposta de PBMC de parturientes

Para avaliarmos a resposta celular das mães após a vacinação com dTpa na gestação, as PBMC foram estimuladas *in vitro* com PHA (Figura 9), mitógeno que ativa principalmente células T, e PT (Figuras 10 e 11), um dos antígenos da *B. pertussis* presente na formulação da dTpa. Devido à dificuldade de obtenção de amostras de mães não vacinadas, não foi possível comparar estatisticamente as respostas entre os grupos vacinado e não vacinado.

Após estímulo com PHA, observamos uma resposta bastante heterogênea quanto à secreção de citocinas. A produção de IL-2 indica a existência de linfócitos T ativados e em proliferação, sendo capazes de produção de citocinas variadas da

resposta adaptativa. Também foram detectadas quantidades expressivas de IL-6, IFN- γ e TNF- α , mas não de IL-4.

Figura 9 - Resposta celular de parturientes vacinadas com dTpa frente à PHA. A concentração de citocinas em sobrenadante de cultura celular de PBMC de parturientes, nas situações basal (sem estímulo) e após estímulo *in vitro* com PHA por 48 horas mostra que mães vacinadas com dTpa na gestação (MV; n=19) apresentam resposta celular com produção de todas as citocinas analisadas, à exceção de IL-4. No grupo de mães não vacinadas (MNV; n=2) verifica-se resposta predominante de IL-2 e IFN- γ . Os resultados estão apresentados em gráfico de dispersão, com barra de média e erro padrão médio. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa, com p<0,05.

A seguir verificamos o perfil de expressão gênica relacionado à resposta vacinal, para isso, realizamos qPCR das PBMC estimuladas com PT (Figura 10). Foram analisados os genes *IFNG* como correlato do perfil Th1, *IL4* de Th2, *IL17A* de Th17 e *IL10* de resposta supressora. A expressão dos fatores de transcrição *GATA3* e *RORC2* também foi analisada, para indicar a via de sinalização das citocinas IL-4

e IL-17A, respectivamente. O gene *TBX21* da via de transcrição do IFN- γ não foi apresentado por problemas com a sequência dos *primers*.

Os resultados foram analisados quanto à expressão relativa (*fold change*) em relação ao basal. Desta forma, vimos que a expressão de *IFNG* é aumentada em comparação aos genes *GATA3* e *IL4*, relacionados à resposta Th2, e ao *RORC2*, relacionado à resposta Th17. Como não há diferença em comparação com o gene *IL17A*, é possível que o fator de transcrição já tenha sido ativado e sinalizado a diferenciação dos linfócitos T para o perfil Th17, resultando em expressão de *IL17A* e produção da citocina homônima. A maior expressão de *IFNG* em relação ao *IL4* pode indicar resposta à PT predominante Th1.

Figura 10 - PBMC de parturientes vacinadas com dTpa apresentam potencial contra patógenos intracelulares. A expressão relativa de genes relacionados à resposta Th1, Th2 e Th17 em PBMC de parturientes vacinadas com dTpa na gestação (n=10) após estímulo *in vitro* com PT por 120 horas, mostra maior expressão de *IFNG* em relação ao *IL4*, *GATA3* e *RORC2* (*, p<0,05). A caixa representa a variação entre o 25º e o 75º percentil, e as barras representam os valores mínimo e máximo.

Em seguida, foram dosadas as citocinas no sobrenadante de cultura de PBMC após estímulo com PT para avaliação dos perfis de resposta Th1, Th2, Th17, inflamatório ou regulatório (Figura 11). Devido ao pequeno número de amostras de mães não vacinadas (n=2), não foi possível realizar análise estatística entre os grupos, mas, ao contrário do observado com estímulo de PHA, as parturientes vacinadas apresentaram níveis mais elevados de IL-2, indicando aumento da resposta de células T pela vacinação. Também foi verificada grande dispersão dos valores entre diferentes indivíduos. De maneira geral, observa-se que há presença de resposta envolvendo citocinas de perfil Th1 (11 **A**), com potencial inflamatório, como TNF- α e, apesar da elevada concentração de IL-6, a resposta Th17 não é predominante.

Figura 11 - PT induz produção predominante de citocinas de perfil Th1 em parturientes vacinadas. A concentração de citocinas de perfil Th1 (A), inflamatório (B), regulador (C), Th2 (D) e Th17 (E) foi dosada em sobrenadante de cultura celular de PBMC de parturientes após estímulo *in vitro* com PT por 120 horas. O IFN- γ foi a citocina mais bem distribuída entre as amostras, havendo também importante produção de IL-2, IL-13, TNF- α e IL-6, mostrando perfil variado de resposta. Os resultados estão apresentados em gráfico de dispersão, com barra de mediana. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,05$.

4.2 Perfil de resposta de CMCB de neonatos

Para verificarmos se a vacinação na gestação poderia induzir alguma resposta imune detectável à PT no recém-nascido, seja pela sensibilização intraútero ou por conta do microquimerismo, e tentar determinar o perfil de resposta induzido, avaliamos a resposta de células mononucleares de cordão umbilical. A concentração de citocinas nas amostras de cordão umbilical após estímulo com PHA foi indetectável para a maioria das citocinas analisadas, à exceção de IL-6, TNF- α e IL-10, mostrando potencial inflamatório das células (Figura 12).

Figura 12 - Baixa produção de resposta celular em PBMC de neonatos frente à PHA. A comparação entre as situações basal (sem estímulo) e após estímulo *in vitro* com PHA por 48 horas de citocinas no sobrenadante de cultura celular mostra predominância de IL-6, TNF- α e IL-10 em neonatos filhos de mães vacinadas com dTpa na gestação (RNV; n=19). Em neonatos filhos de mães não vacinadas (RNNV; n=2) a resposta foi parcialmente inexistente. Os resultados estão apresentados em gráfico de dispersão, com barra de média e erro padrão médio. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,05$.

A qPCR (Figura 13) não indicou diferenças significativas entre as expressões dos genes de interesse nos neonatos filhos de mães vacinadas, devido à grande dispersão entre os indivíduos ($p>0,05$). Percebe-se que há poucos neonatos que mostram alteração da expressão de citocinas e fatores de transcrição. Porém, apesar da falta de diferença estatisticamente significativa, a produção de IL-10 tende a ser a mais uniforme e a mais elevada, em relação ao grupo como um todo.

Figura 13 - Expressão relativa de genes relacionados à resposta Th1, Th2 e Th17 em neonatos. CBMC de neonatos filhos de mães vacinadas com dTpa durante a gestação ($n=10$) foram estimuladas *in vitro* com PT durante 120 horas. A caixa representa a variação entre o 25º e o 75º percentil, e as barras representam os valores mínimo e máximo.

Na dosagem de citocinas (Figura 14), verificou-se presença elevada de IL-6 em relação às outras citocinas, do mesmo modo como após estímulo com PHA, e também sem a produção de citocinas de linfócitos Th17.

Alguns indivíduos foram mais responsivos em relação ao grupo para determinadas citocinas, e apenas para IL-4 detectou-se concentração mais equilibrada no grupo. Ela possivelmente indica uma característica imune intrínseca de neonatos em geral, a despeito das variabilidades individuais.

A baixa detecção, a variação de resposta e a baixa amostragem no grupo não vacinado torna difícil a determinação de resposta específica à PT no grupo vacinado, ainda que haja indicativos de resposta Th2 (14 **D**), com grande potencial inflamatório por IL-6 e TNF- α . Mesmo assim, não é possível estabelecer um padrão de resposta.

Figura 14 - Baixa produção de citocinas por neonatos após estímulo antigênico. A concentração de citocinas de perfil Th1 (A), inflamatório (B), regulador (C), Th2 (D) e Th17 (E) foi dosada em sobrenadante de cultura celular de CBMC de neonatos. Após estímulo *in vitro* com PT durante 120 horas não foi detectada produção expressiva da maioria das citocinas. RNNV: recém-nascidos filhos de mães não vacinadas; RNV: recém-nascidos filhos de mães vacinadas. Os resultados estão apresentados em gráfico de dispersão, com barra de mediana. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,05$.

4.3 Resposta materna X resposta neonatal

A correlação das citocinas no binômio parturiente-cordão umbilical do grupo vacinado foi analisada para aquelas que foram detectáveis em ambos os grupos (Figura 15). Apenas a concentração de IL-6 apresentou correlação estatisticamente significativa, com valor do coeficiente de Spearman $r=0,73$ ($p=0,0311$), enquanto que para os níveis de IFN- γ , IL-4, IL-13 e TNF- α não houve diferenças na produção entre os grupos.

Figura 15 - Correlação da produção de citocinas entre mães e neonatos. A concentração de citocinas no grupo de mães ($n=9$) não apresenta correlação com o grupo de neonatos ($n=9$), à exceção da IL-6.

4.4 Perfil de resposta de PBMC de lactentes

A vacinação das gestantes pode conferir proteção aos recém-nascidos pela transferência de grandes quantidades de anticorpos contra *B. pertussis*. Por outro lado, alguns trabalhos mostram que a produção de anticorpos pelos lactentes em resposta à vacinação pode ser prejudicada^{127,138,139}. Para avaliarmos se a resposta celular também seria afetada, avaliamos a resposta de PBMC dos lactentes ao

estímulo *in vitro* com PT. Primeiramente, realizamos qPCR dos genes envolvidos na resposta Th1, Th2 e Th17, a fim de verificar diferenças no perfil transcricional dos dois grupos (Figura 16).

Após comparação de médias, não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão relativa das citocinas e fatores de transcrição em amostras de lactentes filhos de mães vacinadas com a dTpa durante a gestação (V) ou não (NV), quando estimuladas com PT. Não obstante, observa-se que no grupo V a expressão relativa é mais uniforme e menor do que no grupo NV. Neste, os indivíduos apresentam resposta mais dispersa, sendo que para os genes *IL10* e *IFNG* as mediadas são notavelmente maiores.

Figura 16 - Expressão relativa de genes relacionados à resposta Th1, Th2 e Th17 em lactentes. Lactentes filhos de mães não vacinadas (NV, n=9) e filhos de mães vacinadas com dTpa durante a gestação (V, n=10) não apresentam diferenças significativas quanto ao perfil de expressão gênica. As células foram estimuladas *in vitro* com PT durante 120 horas. A caixa representa a variação entre o 25º e o 75º percentil, e as barras representam os valores mínimo e máximo.

Quando comparamos as células sem estímulo (basal) e com estímulo, dentro de cada grupo, verificamos diferenças na expressão relativa de alguns genes (Figura 17). A expressão de *GATA3* ($p=0,0279$) e *IFNG* ($p=0,0290$) na situação basal do

grupo V é estatisticamente maior do que no basal do grupo NV, muito embora na situação com estímulo essa diferença desapareça.

Figura 17 - Aumento basal da expressão de *GATA3* e *IFNG* em lactentes filhos de mães vacinadas. A expressão normalizada de citocinas em PBMC de lactentes comparando-se as situações basal (sem estímulo) e a situação após o estímulo *in vitro* com PT durante 120 horas mostra aumento da expressão relativa basal de *GATA3* e *IFNG* em crianças filhas de mães vacinadas com dTpa (V, n=10), em relação aos filhos de mães não vacinadas (NV, n=9). A diferença desaparece quando as células são estimuladas com PT. Os resultados estão apresentados em gráfico de dispersão, com barra de mediana. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,05$.

Como os grupos são semelhantes e o fator de separação é a presença ou ausência da vacinação com dTpa no desenvolvimento intrauterino, essa diferença pode sugerir modulação da resposta imune infantil pela vacinação materna. Então, para verificar se os resultados da expressão gênica eram refletidos na produção das citocinas, analisamos as proteínas secretadas pelos dois grupos.

Ao avaliarmos o sobrenadante de cultura celular de PBMC de crianças após a terceira dose da vacina DTP, não encontramos diferença estatisticamente significativa na produção das citocinas analisadas (Figura 18). Nesse grupo, não foi possível a análise com estímulo policlonal devido à pequena quantidade de células disponível depois da coleta e separação de PBMC.

Contudo, apesar da falta de diferença estatisticamente significativa, verifica-se maior dispersão entre os indivíduos do grupo V, e medianas maiores para a produção de IL-17A e IL-10, sob estímulo antigênico. O aumento do número amostral mostraria se esse padrão é característico do grupo V, ou se as populações se equivaleriam na produção destas citocinas.

No geral, nos grupos NV e V também houve produção de IFN- γ e IL-13, indicando possível perfil misto de resposta Th1/Th2, com a presença de IL-17A no grupo V sugerindo o auxílio de resposta Th17. Por isso, no segundo momento, analisamos estas citocinas em gráficos de correlação (Figura 19), para verificar a relação entre as citocinas dos diferentes perfis (Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-13), Th17 (IL-17A) e regulador (IL-10)), e para identificar se os mesmos indivíduos produzem diferentes citocinas. Nessa análise também buscamos verificar a possibilidade de identificar perfis de resposta predominante ou se teríamos amostras indistintamente “boas respondedoras” para todos os perfis Th. Os quadrantes presentes nos gráficos de correlação foram calculados com a média da concentração de cada citocina, mais um desvio padrão, a fim de dividir os indivíduos que produzem mais ou menos citocinas em cada comparação.

Figura 18 - A produção de citocinas por lactentes filhos de mães vacinadas ou não na gestação não apresenta diferenças quantitativas. A concentração de citocinas de perfil Th1 (A), inflamatório (B), regulador (C), Th2 (D) e Th17 (E) foi dosada em sobrenadante de cultura celular de PBMC de lactentes, após estímulo *in vitro* com PT por 120 horas. V: lactentes filhos de mães vacinadas; NV: lactentes filhos de mães não vacinadas durante a gestação, após série primária de vacinação contra a coqueluche. Os resultados estão apresentados em gráfico de dispersão, com barra de mediana. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,05$.

No grupo NV (A-F), três indivíduos produzem níveis elevados de pelo menos uma das citocinas analisadas, e não houve indivíduos que não produziram nenhuma citocina. Detectamos correlação estatística na comparação IFN- γ com IL-10 ($r=0,8584$; $p=0,0045$), porém apenas em três amostras houve produção de IL-10 acima do limite de detecção. Isso mostra que quantidade de citocinas produzidas após estímulo é bem variável de indivíduo para indivíduo, não sendo possível determinar um padrão de resposta predominante.

Já no grupo V (G-L), mais indivíduos produzem maior quantidade de apenas uma citocina (representados pelos círculos coloridos), e um possui níveis elevados de todas. Há correlação positiva entre IFN- γ e IL-10 ($r=0,5095$; $p=0,0066$) e IFN- γ e IL-13 ($r=0,4559$; $p=0,0169$), o que pode apontar tanto para uma resposta mista Th1/Th2 quanto para um equilíbrio entre ativação e regulação em alguns indivíduos. Esses resultados também mostram a grande variabilidade de resposta entre indivíduos, em uma amostra na qual há detecção elevada em alguns e nenhuma detecção em três amostras.

Figura 19 - Correlação da produção de citocinas nos lactentes. As citocinas representativas dos perfis Th1, Th2, Th17 e regulador foram correlacionadas entre si, dentro do grupo de lactentes filhos de mães não vacinadas (NV; **A-F**, n=9) ou vacinadas (V; **G-L**, n=29) durante a gestação. Os círculos coloridos representam indivíduos que produzem níveis elevados de uma citocina apenas, e as outras formas representam níveis elevados de duas ou mais citocinas. ●: IFN-γ; ●: IL-10; ●: IL-17A; ▲: IFN-γ, IL-17A, IL-13 e IL-10; ■: IFN-γ e IL-13; *: IFN-γ, IL-17A e IL-13; ◆: IFN-γ, IL-10 e IL-17A; ▼: IL-10 e IL-17A; ●: baixa produção de todas as citocinas. Os pontos não visíveis nos gráficos encontram-se muito próximos aos 0 para serem distinguidos.

Observamos que nas amostras de crianças nascidas de mães vacinadas há indivíduos que produzem mais ou menos determinadas citocinas, porém não produzem alta concentração de IL-13 em detrimento das outras. A detecção desta citocina está vinculada às outras, então, apesar não conseguirmos traçar um perfil de resposta específico, verificamos que o perfil Th2 não predomina. Além disso, apesar da correlação positiva com IL-10, verificamos que a produção de IFN- γ foi bem superior à da citocina tolerogênica.

Dos indivíduos destacados, considerados bons respondedores, avaliamos se essa polarização teve relação com fatores como idade gestacional da mãe na vacinação com dTpa, via de parto no nascimento, período de vacinação da criança com DTP e período de aleitamento materno exclusivo até a data de coleta das amostras. Porém, como são poucos em ambos os grupos, não houve nenhuma característica que se sobressaiu às demais. Além disso, em ambos os grupos, havia quantidade comparável de meninos e meninas, não havendo portando um sexo predominante avaliado.

5 DISCUSSÃO

Coming back to where you started is not the same as never leaving.

Terry Pratchett (1948-2015)

A coqueluche é uma doença infectocontagiosa antiga¹ que vem ressurgindo nos últimos anos em diversos países do mundo⁵¹. É especialmente preocupante que sua taxa de ataque mais alta e maiores índices de mortalidade ocorram em crianças pequenas, antes do início do seu esquema vacinal ou com a série de imunização incompleta⁵¹. Além disso, a imunidade gerada pela vacinação não é perpétua^{60,63–65}, fazendo-se necessário o controle constante das populações mais suscetíveis e não vacinadas.

A dose de reforço de dTpa na gestação foi proposta então como uma maneira custo-efetiva para gerar proteção específica às crianças até que elas estejam devidamente vacinadas¹¹⁸. O reforço é importante, uma vez que os níveis de anticorpos anti-pertussis em mães sem infecção por *B. pertussis* recente, e vacinadas somente na infância, são baixos, assim como os níveis transferidos aos neonatos. Aos dois meses, os níveis de anticorpos nas crianças são indetectáveis¹⁴⁰. Além disso, a dTpa também induz proteção nas mães para que estas não sejam fonte de contágio para seus filhos⁵¹.

A transferência de anticorpos maternos durante a gestação é sabidamente importante para a proteção fetal e neonatal até que a criança seja capaz de produzir anticorpos próprios (Burckhardt¹¹⁹ apud Martino¹²⁰), porém eles podem exercer efeito inibitório na resposta imune infantil¹²⁷.

A partir destes conhecimentos, e sabendo-se que a resposta imune gerada pela vacinação materna também pode afetar o feto, seja agindo como *priming* do seu sistema imune, seja influenciando na sua resposta a patógenos e vacinas nos primeiros meses de vida¹⁴¹, buscamos primeiro analisar o perfil de resposta das mães vacinadas ou não frente à toxina antigênica PT para então poder analisar como esse perfil pode influenciar na resposta tanto do neonato ao nascimento quanto da vacinação posterior da criança.

Mães que não receberam a dose de reforço na gestação produzem menor resposta de perfil Th1 após estímulo com antígeno específico do que as mães vacinadas. Mesmo a amostra contendo duas mulheres, por conta de dificuldades no processo de recrutamento, observa-se que elas possuem concentrações com medianas maiores para IL-4, IL-5 e IL-13, citocinas de perfil Th2, e IL-10, citocina de perfil tolerogênico.

A produção maior de citocinas do tipo 2 seria esperada após a vacinação com dTpa, que é vista como indutora predominante de linfócitos produtores de IL-4^{11,76-78}. Contudo, nas parturientes vacinadas verificamos concentrações maiores de IFN- γ e IL-2, e baixa produção de IL-4 e IL-10, tanto após estímulo com PHA quanto após estímulo com PT, não havendo detecção destas citocinas na situação basal. A expressão do gene *IFNG* também foi maior do que a expressão de *GATA3* e *RORC2* após estímulo com antígeno específico, corroborando com os dados de concentração.

Essa resposta provavelmente se refere à memória imunológica de vacinações e/ou infecções anteriores, considerando a vacinação das mães durante a infância com a formulação de células inteiras, que é potente indutora de células produtoras de IFN- γ ^{11,76-78,80,81}. Além disso, a PT foi escolhida pois é o único antígeno específico da *B. pertussis*¹⁴², e desse modo procurou-se analisar a resposta adaptativa estritamente relacionada a ela.

Existem estudos que mostram que a imunidade decorrente da vacinação anti-pertussis não é duradoura, decaindo por volta de dez anos após a última dose. Quando a vacina é acelular, a queda é mais rápida^{63,143}. Por isso em surtos da doença houve aumento do número de casos de infecções em adolescentes e adultos¹⁴⁴. Porém, segundo revisão de Vatti *et al.*¹⁴⁵, estudos em diversas infecções demonstram que o organismo pode induzir uma certa resposta quando exposto a um antígeno pela primeira vez, e, nas próximas exposições, seja em infecções ou vacinas, se o antígeno for idêntico o organismo é capaz de induzir uma resposta secundária a ele. Porém, se houver alguma ligeira diferença com o primeiro antígeno, o organismo não se adapta e continua induzindo o mesmo tipo de resposta. Essa teoria é chamada de “pecado antigênico original”, e poderia explicar o porquê depois de anos após a vacinação e, logo após uma dose de reforço com a dTpa as mães continuam produzindo altas concentrações de IFN- γ quando suas células são expostas a PT em cultura.

Outros dados mostram que o trabalho de parto e o parto normal induzem resposta inflamatória na mãe, para contração uterina, expulsão do feto e rejeição da placenta¹⁴⁶, porém essa resposta se dá principalmente a nível local, na interface materno-fetal, e não a nível sistêmico¹⁴⁷. Como foi coletado sangue periférico das parturientes e verificou-se resposta à estímulo específico, possivelmente o parto não foi o causador da produção de citocinas.

Esse panorama indica que a vacina acelular na gestação aumenta a resposta imunológica materna, não só em relação à produção de anticorpos, mas também à resposta celular, incluindo o perfil Th1.

Nos neonatos, encontramos elevada produção de IL-6 sob estímulo com PHA, o que pode ser reflexo do parto. O parto normal, devido à liberação de hormônios como dopamina e cortisol, aumenta o número de monócitos, neutrófilos e a resposta inata em geral, a fim de proteger o recém-nascido de infecção imediata¹⁴⁸.

O estado de baixa tensão de oxigênio inicial do neonato também pode contribuir para o aumento da produção de citocinas como IL-6 e IL-8¹⁴⁹. Segundo Gollwitzer e Marsland¹⁴⁸, essas influências são menos predominantes na imunidade adaptativa, como verificamos após estímulo antigênico com PT. O uso da toxina bacteriana purificada como estímulo teve a intenção de evitar a ativação de vias da resposta imune inata que pudessem influenciar essa análise. Como a PT é um padrão molecular associado a patógeno que é reconhecido pelos TLR2 e 4¹⁰ e neonatos possuem expressão diminuída destes receptores^{150,151}, observamos que não houve produção significativa de resposta antígeno-específica, corroborando dados da literatura que mostram a suscetibilidade de neonatos a infecções^{150,152}.

Segundo a literatura, o sistema imune neonatal responde diferentemente do sistema imune de adultos, principalmente no que concerne os mecanismos que levam à promoção de resposta de células T¹⁵³. Após estímulo antigênico, verificamos que a expressão gênica foi baixa e detectou-se produção de IL-6 e IL-4 com mais destaque.

A maior quantidade de IL-4 concorda com trabalho de Ribeiro-do-Couto *et al.*¹⁵⁴, no qual os autores sugerem que a presença desta citocina se deva ao perfil predominantemente Th2 do neonato, resultando em baixa produção de IFN- γ e IL-10. No grupo não vacinado, a IL-4 foi a única citocina produzida pelos dois igualmente, e a mediana de IL-13 foi aparentemente maior do que no grupo não vacinado.

Não obstante, a resposta diminuída, além de ser característica do neonato e ter sido utilizado estímulo muito específico, pode indicar que provavelmente a exposição intraútero a fatores maternos não foi capaz de primar o sistema imune neonatal a ponto de essa influência ser detectada nos ensaios. Em estudo com mães infectadas com malária, por exemplo¹⁵⁵, verificou-se que seus filhos geravam tolerância aos antígenos específicos e que, apesar de anergia dos linfócitos T, a

produção de IL-10 era alta. Outros estudos tratam de antígenos maternos¹⁵⁶ e microquimerismo materno¹⁵⁷ que podem sensibilizar os fetos e neonatos e estimular a geração de Tregs.

Ainda assim, como nas mães, a presença de TNF- α e IL-6 em ambas as situações – basal e sob estímulo policlinal – pode ser resultante do estresse celular após os procedimentos experimentais. Embora a IL-6 seja importante na polarização de linfócitos Th17¹⁵⁸, observamos baixa produção de IL-17A, e vemos correlação positiva entre mães e neonatos, em amostras que foram coletadas e processadas no mesmo dia. Como a IL-6 pode ser produzida por outras células que não linfócitos T, como macrófagos e monócitos, a elevada detecção desta pode refletir regulação inadequada destas células ou sua ativação inespecífica¹⁵⁹. Não obstante, como a IL-6 possui propriedades de resolução como inibição da migração de neutrófilos, a sua produção em neonatos também pode servir para diminuir o risco de inflamação excessiva por resposta Th1 durante a sua colonização microbiana no período após o parto¹⁶⁰.

A literatura mostra diversos outros mecanismos que regulam e/ou previnem a produção de citocinas inflamatórias para proteger os neonatos de infecções no início da vida, e que poderiam ser abordados em trabalhos posteriores. O papel de fatores solúveis plasmáticos^{89,161}, micro-RNAs¹⁶², metilação de genes responsáveis pela transcrição de citocinas tipos Th1 e Th2^{154,163}, imaturidade de células dendríticas, com menor produção de IL-12¹⁶⁴ e presença de células reguladoras^{100,150} pode ser investigado em neonatos com maiores títulos de anticorpos maternos para avaliar o seu papel na regulação da resposta, bem como a análise mais detalhada em relação ao parto. Dados mostram que crianças nascidas a termo apresentam maiores níveis de IL-6 e IL-23, levando a uma maior diferenciação de células Th17 e de liberação de IL-17A¹⁶⁰, ainda que não tenhamos encontrado resultado semelhante, devido às limitações do projeto. Esse mecanismo é benéfico nos recém-nascidos para reduzir

o risco de resposta inflamatória excessiva durante a colonização microbiana, e talvez esse quadro se mantenha nos primeiros meses de vida¹⁶⁰. As células Th1 neonatais também foram descritas como passíveis de sofrer apoptose quando expostas a um antígeno pela segunda vez⁸⁶, o que seria o caso das crianças que tiveram o contato com os antígenos da vacina dTpa durante a gestação e foram vacinados posteriormente com a DTP. Segundo Li *et al.*¹⁶⁵, a princípio, as células Th2 presentes no neonato não previnem a conversão da célula T *naïve* para o perfil Th1, mas induzem apoptose. Além disso, eles também constataram que a IL-10 promove anergia de células Th1 por meio da regulação negativa de moléculas acessórias ou IL-12 nas células apresentadoras de antígeno.

Como o estudo foi iniciado em agosto de 2015, a dTpa para gestantes já havia sido implantada na rede pública, então encontramos dificuldades na coleta de sangue de mães que não haviam sido vacinadas, e consequentemente de seus filhos recém-nascidos. Em termos de saúde pública, isto significa que a adesão das gestantes ao programa de vacinação tem sido favorável e que vem sendo possível imunizar uma parcela importante da população. No grupo dos neonatos, seria necessário a coleta de um número amostral maior para verificar sua capacidade de resposta, que foi não foi detectada.

Nas análises das crianças vacinadas com três doses de DTP, nascidas de mães vacinadas ou não com dTpa durante a gestação, não foram encontradas diferenças significativas na expressão gênica ou dosagem de citocinas nos dois grupos. A expressão de *GATA3* e *IFNG* estava aumentada no basal das crianças filhas de mães vacinadas, porém a expressão se equilibra quando as células são estimuladas com PT. Ainda, mesmo sem diferenças estatisticamente significativas, verifica-se que a expressão gênica no grupo V é menor, mostrando potencial modulação pela vacinação materna.

O grupo NV, mesmo com menor número de indivíduos, mostra menor concentração de citocinas em relação ao grupo V. Alguns indivíduos produzem IL-2 e IFN- γ , porém menos do que seria esperado após vacinação com DTP. De acordo com a literatura, a vacina celular induz predominância de IFN- γ , enquanto que após a vacinação acelular há predomínio de IFN- γ com citocinas do tipo 2^{11,76-78}.

No grupo V, em maior quantidade, também se verifica produção de IFN- γ , IL-13, IL-17A e IL-10, sugerindo variabilidade no perfil de resposta. Nos trabalhos que tratam de resposta celular à vacinação acelular^{11,76-78}, as citocinas avaliadas indicativas do perfil Th2 foram IL-4 e IL-5, e não IL-13, como neste estudo. Isso pode explicar o achado da correlação positiva entre IFN- γ e IL-13. A correlação positiva entre IL-10 e IFN- γ nos dois grupos pode indicar mecanismo regulador compensatório¹⁶⁶.

A variabilidade na resposta é fator recorrente em estudos com humanos, especialmente ligados à resposta vacinal. Em trabalhos com gêmeos, verificou-se que determinantes genéticos influenciam diretamente na resposta vacinal¹⁶⁷⁻¹⁶⁹, bem como imunocompetência, presença ou ausência de doenças concomitantes, estresse agudo ou crônico, e outros fatores diversos¹⁷⁰. Também deve-se considerar a possibilidade de regulação epigenética ou *priming* do sistema imune neonatal pelo sistema imune materno, influência que perdura durante todo o primeiro ano de vida. A revisão de Claycombe, Brissette e Ghribi¹⁴¹ mostra que modificações nas histonas podem levar à polarização de células para perfil Th1 ou Th2, e a hipo/hipermetilação de genes relacionados a esses perfis celulares pode estar associada à *imprinting* por citocinas maternas.

Além disso, como o material de estudo foi de células mononucleares e não linfócitos isolados, pode-se argumentar que o número de linfócitos presente era baixo, pois a resposta analisada foi gerada a partir de diversos tipos celulares presentes na cultura. Não obstante, e mesmo sem a suplementação com IL-2¹⁷¹, as

citocinas presentes no meio irão favorecer a polarização dos linfócitos para um ou outro perfil; logo, pode-se inferir o padrão de linfócitos Th que seria mais proeminente sob o estímulo utilizado, e se os indivíduos podem estar ou não mais suscetíveis à infecção.

A elevada produção de outras citocinas por alguns indivíduos, além de genética, pode ser consequência de fatores pré-natais, perinatais ou até mesmo de fatores que ocorrem meses após o nascimento. A idade gestacional na qual a mãe é vacinada influencia na maior ou menor passagem de anticorpos pela placenta¹³², o aleitamento materno pode transportar leucócitos e IgA que protegem o bebê durante e após o período de amamentação, mas podem interferir na vacinação da criança¹⁷² e o sexo da criança pode determinar se a resposta será maior ou menor às vacinas¹⁷³. Nosso número amostral não possibilitou a detecção de padrões, porém um estudo maior poderá ser mais informativo nestes aspectos.

Ao compararmos os grupos separados por via de parto, não vemos diferenças na produção das citocinas dos perfis Th1, Th2, Th17 e Treg. No grupo não vacinado houve maior concentração de IL-13 no grupo de parto cesárea do que no normal ($p=0,0357$), porém como havia apenas três indivíduos no grupo, não podemos afirmar que o causador seja o tipo de parto, mesmo porque a concentração de IFN- γ está igual. Essa diferença talvez se deva por variabilidades individuais dos voluntários do estudo.

O tabagismo também pode ser um fator externo capaz de exercer influência sobre diferentes perfis de resposta. Estudos já demonstraram a alteração em genes relacionados à imunidade no que concerne menor migração celular e produção de imunoglobulinas nas gestantes e cordão umbilical¹⁷⁴, o fumo como fator de risco para ocorrência de asma¹⁷⁵ e no aumento de citocinas inflamatórias em neonatos¹⁷⁶. Não tivemos acesso à essa informação para poder correlacionar com os dados

encontrados, contudo é uma hipótese a ser levantada, principalmente no que se refere à exposição ao fumo e a resposta vacinal.

Muito embora diversos estudos na área de infecção e/ou vacinação em modelo de *B. pertussis* analisem a resposta humoral, a correlação entre título de anticorpos e proteção ainda não está clara¹⁷⁷. Em contrapartida, cada vez mais estudos indicam a importância do papel das células T CD4⁺ e a produção de citocinas de perfil Th1 na eliminação da bactéria^{178–180}.

Estudos sobre a resposta humoral são predominantes na área de coqueluche, mesmo antes da implantação da imunização materna^{181,182}. Após as novas recomendações, os estudos continuam avaliando prioritariamente os níveis de imunoglobulinas produzidos pelas mães e transferidos aos neonatos^{183–185}. É importante ressaltar também que a maioria dos estudos trata de vacinação de lactentes com a formulação acelular.

Na Argentina, que também emprega a vacina celular no esquema vacinal de crianças e recentemente recomendou a vacinação de gestantes, foi realizado um estudo que abrangeu apenas as respostas humorais de mães e crianças de dois meses de idade, antes do esquema vacinal¹⁸⁴. Um estudo de Siegrist *et al.*¹²⁴ cita inclusive que anticorpos anti-PT maternos induzidos por exposição à bactéria ou pela DTP interferem na resposta humoral da criança induzida por DTP mas não por DTPa. Os autores ressaltam que a administração de vacina acelular em adolescentes e jovens adultos pode levar à geração de anticorpos maternos com efeito inibitório maior, em relação à resposta infantil após vacinação com DTPa¹²⁴. Já uma revisão mostra que anticorpos maternos não interferem na resposta de crianças à DTP¹⁸⁶. Desse modo, se faz ainda mais importante o estudo da resposta imune celular das crianças imunizadas.

Com isso, este trabalho buscou focar na resposta celular elicitada pela vacinação, em mães, neonatos e lactentes, e a influência da vacinação materna

neste tipo de resposta após vacinação com DTP da criança, tendo em vista que não foram encontrados trabalhos locais sobre o assunto.

Apesar do limitado número amostral, pudemos observar pela primeira vez o perfil de resposta celular de lactentes frente à vacinação materna. Embora não tenhamos amostras com estímulo policlonal devido à restrição do número de células nos ensaios, verificamos que a resposta produzida foi antígeno-específica, e que a resposta celular está preservada em ambos os grupos, não havendo interferência dos anticorpos maternos, já que todas as amostras foram tratadas nas mesmas condições.

Sabe-se que os anticorpos maternos podem inibir a resposta humoral infantil por diversos mecanismos, como inibição da ativação de células B neonatais pelo complexo anticorpo materno/antígeno vacinal, eliminação do antígeno via fagocitose, que seria induzida pela ligação com o anticorpo materno, formando imunocomplexos, ou o mascaramento dos epítomos vacinais pelos anticorpos maternos, prevenindo a sua ligação com as células B da criança¹²⁷. Entretanto, apesar desta inibição, a resposta de células T aparentemente se mantém preservada^{82,127}. Enquanto os anticorpos maternos podem mascarar epítomos vacinais e impedir o seu reconhecimento pelas células B neonatais, os imunocomplexos formados são mais facilmente captados pelas APCs do neonato e assim o estímulo e diferenciação de linfócitos T se mantém ativo (Figura 20).

Em suma, este trabalho traz informações importantes para a saúde pública. Sua contribuição é mostrar que a vacinação materna não altera o perfil de resposta celular das crianças frente à sua própria vacinação. Esse conhecimento é fundamental para a implantação e aprimoramento de protocolos de vacinação de gestantes, e no amparo de clínicos e gestores para a recomendação desta estratégia. Como o Brasil possui formulações que não são utilizadas em países mais industrializados, como EUA, Canadá e países europeus, é de suma importância que

se façam estudos locais para conhecer o comportamento da vacinação e o perfil de resposta na sua população alvo, e não apenas se basear em informações já existentes, mas que não refletem necessariamente a realidade do nosso país.

Figura 20 - Efeitos bivalentes dos anticorpos maternos. Os anticorpos maternos (MatAb) podem inibir especificamente resposta de células B dos neonatos mascarando epítomos vacinais, mas não afetando a geração lenta de células B de memória. Contudo, os anticorpos maternos tendem a aumentar a resposta de células T por meio da maior captura e apresentação de antígenos. CTL: linfócito T citotóxico. MHC: complexo principal de histocompatibilidade. TCR: receptor de células T⁸².

6 CONCLUSÕES

I do not know what I may appear to the world, but to myself I seem to have been only like a boy playing on the seashore, and diverting myself in now and then finding a smoother pebble or a prettier shell than ordinary, whilst the great ocean of truth lay all undiscovered before me.

Isaac Newton (1643-1727)

- a) A vacinação com dTpa durante a gestação foi capaz de aumentar a resposta imune celular materna, mas, pela ausência de resposta em cultura de células de cordão umbilical, não houve evidências de sensibilização intraútero da resposta imune celular neonatal;
- b) A produção de citocinas na resposta anti-pertussis de lactentes filhos de mães vacinadas foi semelhante à de filhos de mães não vacinadas, indicando que a resposta celular dos lactentes, promovida pela série primária de imunização com DTP, se mantém preservada mesmo com a vacinação materna.

REFERÊNCIAS

1. Weston R. Whooping Cough: A Brief History to the 19th Century. *Can Bull Med Hist.* 2012;29(2):329–49.
2. Cherry JD. Historical review of pertussis and the classical vaccine. *J Infect Dis.* 1996;174(Suppl 3):S259–63.
3. Hidalgo NTR, Silva CRC, Gonçalves CR, Vaz TMI, Irino K. Manual de Vigilância Epidemiológica Coqueluche - Normas e Instruções. São Paulo: CVE, 2000. [citado em 20 mar 2018]. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/resp/manu_coque.pdf.
4. Fresquet JL. Historia de la Medicina. Jules Bordet (1870-1961). *Inst Hist la Med y la Cienc.* 2004 [citado em 5 out 2017]. Disponível em: <http://www.historiadelamedicina.org/bordet.html>.
5. Bordet J, Gengou O. Le microbe de la coqueluche. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 1906;2:731–41.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde - volume 1. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.
7. Melvin JA, Scheller E V, Miller JF, Cotter PA. Bordetella pertussis pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(4):274–88.
8. Zlamy M. Rediscovering Pertussis. *Front Pediatr.* 2016;4:52.
9. Mills KHG. Immunity to Bordetella pertussis. *Microbes Infect.* 2001 jul;3(8):655–77.
10. Gouw D de, Diavatopoulos DA, Bootsma HJ, Hermans PWM, Mooi FR. Pertussis: A matter of immune modulation. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(3):441–74.
11. Ausiello CM, Urbani F, Sala A La, Lande R, Cassone A. Vaccine- and Antigen-Dependent Type 1 and Type 2 Cytokine Induction after Primary Vaccination of Infants with Whole-Cell or Acellular Pertussis Vaccines. *Infect Immun.* 1997;65(6):2168–74.
12. Hickey FB, Brereton CF, Mills KHG. Adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis inhibits TLR-induced IRF-1 and IRF-8 activation and IL-12 production and enhances IL-10 through MAPK activation in dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2008;84(1):234–43.
13. Ross PJ, Sutton CE, Higgins S, Allen AC, Walsh K, Misiak A, et al. Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to Bordetella pertussis: towards the rational design of an improved acellular pertussis vaccine. *PLoS Pathog.* 2013;9(4):e1003264.
14. Higgs R, Higgins SC, Ross PJ, Mills KHG. Immunity to the respiratory pathogen Bordetella pertussis. *Mucosal Immunol.* 2012;5(5):485–500.
15. Hewlett EL, Burns DL, Cotter PA, Harvill ET, Merkel TJ, Quinn CP, et al. Pertussis pathogenesis - what we know and what we don't know. *J Infect Dis.*

- 2014;209(7):982–5.
16. Jongerius I, Schuijt TJ, Mooi FR, Pinelli E. Complement evasion by *Bordetella pertussis*: implications for improving current vaccines. *J Mol Med*. 2015;93(4):395–402.
 17. Carbonetti NH. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol*. 2010 mar;5(March):455–69.
 18. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Saúde da Criança. Acompanhamento do crescimento e desenvolvimento infantil. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
 19. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Guia de Vigilância Epidemiológica. São Paulo: CVE, 2012.
 20. Brasil. Lei no 6.259, de 30 de outubro de 1975. Dispõe sobre a organização das ações de Vigilância Epidemiológica, sobre o Programa Nacional de Imunizações, estabelece normas relativas à notificação compulsória de doenças, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*; 1975.
 21. Brasil. Portaria MS/GM no 1.271, de 6 de junho de 2014. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*; 2014.
 22. Vaz-de-Lima LRA, Martin MD, Pawloski LC, Leite D, Rocha KCP, Brito CA de, et al. Serodiagnosis as Adjunct Assay for Pertussis Infection in Sao Paulo, Brazil. *Clin Vaccine Immunol*. 2014 maio 1;21(5):636–40.
 23. Gryninger LCF. Estudo descritivo de série histórica da coqueluche no Brasil no período de 2006 a 2013 [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2016.
 24. Public Health England. Guidelines for the Public Health Management of Pertussis in England. Londres:PHE, 2016 [citado 20 mar 2018]. Disponível em: <https://www.gov.uk/government/publications/pertussis-guidelines-for-public-health-management>.
 25. World Health Organization. Vaccines and Biologicals. WHO–recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases. Geneva:WHO, 2003.
 26. World Health Organization. Pertussis [Internet]. Immunization, Vaccines Biol. 2017 [citado 6 out 2017]. Disponível em: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/pertussis/en/.
 27. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
 28. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coqueluche no Brasil: análise da situação epidemiológica de 2010 a 2014. *Bol Epidemiol*. 2015;46:39.
 29. Rocha EL, Leite D, Camargo CH, Martins LM, Silva RSN, Martins VP, et al. The characterization of *Bordetella pertussis* strains isolated in the Central-Western region of Brazil suggests the selection of a specific genetic profile

- during 2012–2014 outbreaks. *Epidemiol Infect.* 2017 maio 21;145(7):1392–7.
30. Sáfadi MAP. Pertussis in young infants: a severe vaccine-preventable disease. Autops case reports. 2015;5(2):1–4.
 31. Pan American Health Organization. Epidemiological alert. Pertussis (Whooping Cough). PAHO Bull. 2012;(109):1–2.
 32. Luz PM, Codeço CT, Werneck GL. A reemergência da coqueluche em países desenvolvidos: um problema também para o Brasil? *Cad Saúde Pública.* 2003;19(4):1209–13.
 33. Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis Cases by Year 1922-2015) [Internet]. Pertussis (Whooping Cough). 2017 [citado 11 out 2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting/cases-by-year.html>.
 34. Queensland Government. Whooping Cough (Pertussis). *Bact Infect.* 2017 [citado 11 out 2017]. Disponível em: <http://conditions.health.qld.gov.au/HealthCondition/condition/14/33/150/Whooping-Cough-Pertussis>
 35. Public Health England. Pertussis (whooping cough) immunisation for pregnant women. Isle of Man:PHE, 2012 [citado 6 mar 2018]. Disponível em: <https://www.gov.uk/guidance/pertussis-whooping-cough-immunisation-for-pregnant-women-resources-and-training>.
 36. Public Health England. Laboratory confirmed cases of pertussis reported to the enhanced pertussis surveillance programme in England: annual report for 2013. *Heal Prot Rep.* 2014 [citado 26 out 2017]. Disponível em: <https://www.gov.uk/government/publications/pertussis-enhanced-surveillance-laboratory-confirmed-cases-in-england-in-2013/laboratory-confirmed-cases-of-pertussis-reported-to-the-enhanced-pertussis-surveillance-programme-in-england-annual-report-for-2013>
 37. Public Health England. Laboratory confirmed cases of Pertussis (England): April to June 2017 [citado 20 mar 2018]. Disponível em: <https://www.gov.uk/government/publications/pertussis-laboratory-confirmed-cases-reported-in-england-2017>.
 38. Torres RSLA, Santos TZ, Torres RAA, Pereira VVG, Fávero LAF, Filho ORM, et al. Resurgence of pertussis at the age of vaccination: Clinical, epidemiological, and molecular aspects. *J Pediatr (Rio J).* 2015;91(4):333–8.
 39. Crowcroft NS, Pebody RG. Recent developments in pertussis. *Lancet.* 2006;367:1926–36.
 40. Friedrich MJ. Research Aims to Boost Pertussis Control. *JAMA.* 2011 jul 6;306(1):27.
 41. Sabbe M, Vandermeulen C. The resurgence of mumps and pertussis. *Hum Vaccin Immunother.* 2016 abr 2;12(4):955–9.
 42. Plotkin SA. The Pertussis Problem. *Clin Infect Dis.* 2014 mar 15;58(6):830–3.
 43. Zeddeman A, Gent M van, Heuvelman CJ, Heide HG van der, Bart MJ, Advani A, et al. Investigations into the emergence of pertactin-deficient bordetella pertussis isolates in six European countries, 1996 to 2012. *Eurosurveillance.* 2014;19(33). pii: 20881.
 44. Martin SW, Pawloski L, Williams M, Weening K, Debolt C, Qin X, et al. Pertactin-negative Bordetella pertussis strains: Evidence for a possible

- selective advantage. *Clin Infect Dis*. 2015;60(2):223–7.
45. Milhorce F. Casos de coqueluche aumentam dez vezes em quatro anos no Brasil. *Jornal O Globo*, 2014 [citado 20 mar 2018]. Disponível em: <https://oglobo.globo.com/sociedade/saude/casos-de-coqueluche-aumentam-dez-vezes-em-quatro-anos-no-brasil-14598132>.
 46. Zahn M. Just when you think you know someone: the evolving epidemiologies of measles and pertussis. *Curr Opin Pediatr*. 2016 fev;28(1):101–6.
 47. Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis (Whooping Cough) | Countries | Pertussis in Brazil. *Natl Cent Immun Respir Dis Div Bact Dis*. 2017 [citado 4 out 2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/pertussis/countries/lapp-brazil.html>.
 48. Pihlgren M, Schallert N, Tougne C, Bozzotti P, Kovarik J, Fulurija A, et al. Delayed and deficient establishment of the long-term bone marrow plasma cell pool during early life. *Eur J Immunol*. 2001 mar 1;31(3):939–46.
 49. Amirthalingam G, Andrews N, Campbell H, Ribeiro S, Kara E, Donegan K, et al. Effectiveness of maternal pertussis vaccination in England: An observational study. *Lancet*. 2014;384:1521–8.
 50. Torre JAG Della, Benevides GN, Melo AMGP, Ferreira CR. Pertussis: the resurgence of a public health threat. *Autops CaseReports*. 2015;5(2):9–16.
 51. World Health Organization. Pertussis vaccines: WHO position paper - August 2015. *Weely Epidemiol Rec*. 2015;90(35):433–60.
 52. Institute of Medicine (US) Committee to Review the Adverse Consequences of Pertussis and Rubella Vaccines. *Adverse Effects of Pertussis and Rubella Vaccines: A Report of the Committee to Review the Adverse Consequences of Pertussis and Rubella Vaccines*. Washington (DC): National Academies Press (US), 1991.
 53. Immunization Action Coalition. *Historic Dates and Events Related to Vaccines and Immunization*. 2016 [citado 26 out 2017]. Disponível em: <http://www.immunize.org/timeline/>.
 54. Shapiro-Shapin CG. Pearl Kendrick, Grace Eldering, and the Pertussis Vaccine. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(8):6.
 55. Freitas AC. Avaliação de novas estratégias vacinais contra a coqueluche no município de São Paulo [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública; 2008.
 56. Domingues CMAS, Teixeira AM da S. Coberturas vacinais e doenças imunopreveníveis no Brasil no período 1982-2012: avanços e desafios do Programa Nacional de Imunizações. *Epidemiol e Serviços Saúde*. 2013;22(1):9–27.
 57. Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA. *Vaccines*. 6th ed. Elsevier, 2012.
 58. Noble GRGR, Bernier RHRH, Esber ECEC, Hardegree MCC, Hinman ARAR, Klein D, et al. Acellular and whole-cell pertussis vaccines in Japan. Report of a visit by US scientists. *JAMA*. 1987 mar 13;257(10):1351–6.
 59. Rigo-Medrano MV, Mendoza-García JL, Gimeno-Gascón A, Roda-Ramón J, Cremades-Bernabeu I, Antequera-Rodríguez P, et al. Vacunas acelulares (DTPa/dTpa) contra la tos ferina: duración de la protección. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016 jan;34(1):23–8.

60. World Health Organization. Pertussis vaccines: WHO position paper - August 2015. Table III: Pertussis Vaccine Evidence to Recommendations Table. Geneva: WHO, 2015.
61. Althouse BM, Scarpino S V. Asymptomatic transmission and the resurgence of *Bordetella pertussis*. *BMC Med*. 2015 dez 24;13(1):146.
62. Warfel JM, Zimmerman LI, Merkel TJ. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014 jan 14;111(2):787–92.
63. Wendelboe AM, Rie A Van, Salmaso S, Englund JA. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatr Infect Dis J*. 2005 maio;24(5):S58–S61.
64. Sheridan SL, Frith K, Snelling TL, Grimwood K, McIntyre PB, Lambert SB. Waning vaccine immunity in teenagers primed with whole cell and acellular pertussis vaccine: recent epidemiology. *Expert Rev Vaccines*. 2014;13(9):1081–106.
65. Burdin N, Handy L, Plotkin S. What Is Wrong with Pertussis Vaccine Immunity? The Problem of Waning Effectiveness of Pertussis Vaccines. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;1–19.
66. World Health Organization. Table 1: Summary of WHO Position Papers - Recommendations for Routine Immunization. 2017 [citado 27 out 2017]. Disponível em: http://www.who.int/immunization/policy/Immunization_routine_table1.pdf?ua=1.
67. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais. 4ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
68. Brasil. Ministério da Saúde. Calendário Nacional de Vacinação 2017. 2017 [citado 6 out 2017]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/13600-calendario-nacional-de-vacinacao>.
69. Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, Stehr K. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine*. 1998;16(20):1901–6.
70. Domenech de Cellès M, Magpantay FMG, King AA, Rohani P. The pertussis enigma: reconciling epidemiology, immunology and evolution. *Proc R Soc Biol Sci*. 2016;283:2015–309.
71. Nieves DJ, Heininger U. *Bordetella pertussis*. *Microbiol Spectr*. 2015 jun 3;4(3).
72. Taranger J, Trollfors B, Lagergård T, Sundh V, Bryla D a, Schneerson R, et al. Correlation between pertussis toxin IgG antibodies in postvaccination sera and subsequent protection against pertussis. *J Infect Dis*. 2000;181(3):1010–3.
73. Mahon BBP, Sheahan BJ, Griffin F, Murphy G, Mills KHG. Atypical disease after *Bordetella pertussis* respiratory infection of mice with targeted disruptions of interferon-gamma receptor or immunoglobulin mu chain genes. *J Infect Dis*. 1997;186(11): 1843-51.
74. Barbic J, Leef MF, Burns DL, Shahin RD. Role of gamma interferon in natural clearance of *Bordetella pertussis* infection. *Infect Immun*. 1997;65(12):4904–8.
75. Ryan M, Murphy G, Gothefors L, Nilsson L, Storsaeter J, Mills KH. *Bordetella*

- pertussis respiratory infection in children is associated with preferential activation of type 1 T helper cells. *J Infect Dis*. 1997;175(5):1246–50.
76. Allen AC, Mills KH. Improved pertussis vaccines based on adjuvants that induce cell-mediated immunity. *Expert Rev Vaccines*. 2014;13(10):1253–64.
 77. Ryan M, Murphy G, Ryan E, Nilsson L, Shackley F, Gothefors L, et al. Distinct T-cell subtypes induced with whole cell and acellular pertussis vaccines in children. *Immunology*. 1998;93(September):1–10.
 78. Edwards KM. Review of the laboratory approaches to the detection of antibody and cell-mediated immunity to pertussis disease and vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 2014;13(10):1183–90.
 79. Ausiello CM, Cassone A. Acellular Pertussis Vaccines and Pertussis Resurgence: Revise or Replace? *ASM*. 2014;5:3.
 80. Zhang L, Prietsch SO, Axelsson I, Halperin SA. Acellular vaccines for preventing whooping cough in children (Review). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014.
 81. Ryan EJ, Nilsson L, Kjellman NIM, Gothefors L, Mills KHG. Booster immunization of children with an acellular pertussis vaccine enhances Th2 cytokine production and serum IgE responses against pertussis toxin but not against common allergens. *Clin Exp Immunol*. 2000;121(2):193–200.
 82. Lambert P, Liu M, Siegrist C-A. Can successful vaccines teach us how to induce efficient protective immune responses? *Nat Med*. 2005;11(4):S54–S62.
 83. Ausiello C, Lande R, Urbani F, Sala A la, Stefanelli P, Salmaso S, et al. Cell-mediated immune responses in four-year-old children after primary immunization with acellular pertussis vaccines. *Infect Immun*. 1999;67(8):4064–71.
 84. Pereira A, Pereira AS Pietro, Silva CL, Melo Rocha G de, Lebrun I, Sant'Anna OA, et al. Antibody response from whole-cell pertussis vaccine immunized Brazilian children against different strains of *Bordetella pertussis*. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(4):678–82.
 85. Barkoff AM, Gröndahl-Yli-Hannuksela K, Vuononvirta J, Mertsola J, Kallonen T, He Q. Differences in avidity of IgG antibodies to pertussis toxin after acellular pertussis booster vaccination and natural infection. *Vaccine*. 2012;30(48):6897–902.
 86. Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):553–64.
 87. Zhang X, Zhivaki D, Lo-Man R. Unique aspects of the perinatal immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(8):495–507.
 88. Kollmann TR, Kampmann B, Mazmanian SK, Marchant A, Levy O. Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny. *Immunity*. 2017;46(3):350–63.
 89. Kollmann TR, Levy O, Montgomery RR, Goriely S. Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly. *Immunity*. 2012 nov 16;37(5):771–83.
 90. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev Immunol*. 2011;2012(July).

91. Brito CA de, Goldoni AL, Sato MN. Immune adjuvants in early life: targeting the innate immune system to overcome impaired adaptive response. *Immunotherapy*. 2009 set;1(5):883–95.
92. Siegrist C-A, Lambert P-H. Immunization with DNA vaccines in early life: Advantages and limitations as compared to conventional vaccines. *Springer Semin Immunopathol*. 1997;19(2):233–43.
93. Levy O, Martin S, Eichenwald E, Ganz T, Valore E, Carroll SF, et al. Impaired innate immunity in the newborn: newborn neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein. *Pediatrics*. 1999 dez;104(6):1327–33.
94. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(5):379–90.
95. Goenka A, Kollmann TR. Development of immunity in early life. *J Infect*. 2015 jun 1;71:S112–20.
96. Dirix V, Verscheure V, Goetghebuer T, Hainaut M, Debie AS, Locht C, et al. Monocyte-derived interleukin-10 depresses the *Bordetella pertussis*-specific gamma interferon response in vaccinated infants. *Clin vaccine Immunol*. 2009 dez 1;16(12):1816–21.
97. Belderbos ME, Bleek GM van, Levy O, Blanken MO, Houben ML, Schuijff L, et al. Skewed pattern of Toll-like receptor 4-mediated cytokine production in human neonatal blood: low LPS-induced IL-12p70 and high IL-10 persist throughout the first month of life. *Clin Immunol*. 2009 nov;133(2):228–37.
98. Adkins B, Yoshimoto M. Epigenetic Regulation of the Th2 Locus in Fetal and Neonatal T Cells. *Adv Neuroimmune Biol*. 2014 jan 1;5(2):69–73.
99. Ota MOC, Vekemans J, Schlegel-Haueter SE, Fielding K, Sanneh M, Kidd M, et al. Influence of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin on antibody and cytokine responses to human neonatal vaccination. *J Immunol*. 2002 jan 15;168(2):919–25.
100. Elahi S, Ertelt JM, Kinder JM, Jiang TT, Zhang X, Xin L, et al. Immunosuppressive CD71+ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection. *Nature*. 2014 dez 5;504(7478):158–62.
101. Maddux AB, Douglas IS. Is the developmentally immature immune response in paediatric sepsis a recapitulation of immune tolerance? *Immunol*. 2015 maio;145(1):1–10.
102. Heininger U, Riffelmann M, Leineweber B, Koenig CHW von. Maternally Derived Antibodies Against *Bordetella Pertussis* Antigens Pertussis Toxin and Filamentous Hemagglutinin in Preterm and Full Term Newborns. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(5):443–5.
103. Skoff TH, Kenyon C, Cocoros N, Liko J, Miller L, Kudish K, et al. Sources of Infant Pertussis Infection in the United States. *Pediatrics*. 2015 out 1;136(4):635–41.
104. Fedele G, Carollo M, Palazzo R, Stefanelli P, Pandolfi E, Gesualdo F, et al. Parents as source of pertussis transmission in hospitalized young infants. *Infection*. 2017 abr 10;45(2):171–8.
105. Berezin EN, Moraes JC de, Leite D, Carvalhanas TRMP, Yu ALF, Blanco RM, et al. Sources of Pertussis Infection in Young Babies From São Paulo State, Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 2014 dez;33(12):1289–91.

106. Wendelboe AM, Hudgens MG, Poole C, Rie A Van. Estimating the role of casual contact from the community in transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Emerg Themes Epidemiol*. 2007 out 19;4:15.
107. Gil A, Oyagüez I, Carrasco P, González A. Hospital admissions for pertussis in Spain, 1995-1998. *Vaccine*. 2001 set 14;19(32):4791-4.
108. World Health Organization. WHO SAGE pertussis working group: Background paper. Geneva: WHO, 2014.
109. Terranella A, Asay GRB, Messonnier ML, Clark TA, Liang JL. Pregnancy Dose Tdap and Postpartum Cocooning to Prevent Infant Pertussis: A Decision Analysis. *Pediatrics*. 2013;131(6):e1748-56.
110. Loch C, Mielcarek N. New pertussis vaccination approaches: En route to protect newborns? *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012 nov 1;66(2):121-33.
111. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações. Informe Técnico para Implantação da Vacina Adsorvida Difteria, Tétano e Coqueluche (Pertussis Acelular) Tipo adulto - dTpa. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
112. Centers for Disease Control and Prevention. Updated Recommendations for Use of Tetanus Toxoid, Reduced Diphtheria Toxoid, and Acellular Pertussis Vaccine (Tdap) in Pregnant Women — Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2013 Feb 22;62(7):131-5.
113. Dabrera G, Amirthalingam G, Andrews N, Campbell H, Ribeiro S, Kara E, et al. A case-control study to estimate the effectiveness of maternal pertussis vaccination in protecting newborn infants in England and Wales, 2012-2013. *Clin Infect Dis*. 2015;60(3):333-7.
114. Amirthalingam G, Campbell H, Ribeiro S, Fry NK, Ramsay M, Miller E, et al. Sustained effectiveness of the maternal pertussis immunization program in England 3 years following introduction. *Clin Infect Dis*. 2016;63:S236-43.
115. Winter K, Cherry JD, Harriman K. Effectiveness of Prenatal Tetanus, Diphtheria, and Acellular Pertussis Vaccination on Pertussis Severity in Infants. *Clin Infect Dis*. 2017 jan 1;64(1):9-14.
116. Petousis-Harris H, Walls T, Watson D, Paynter J, Graham P, Turner N. Safety of Tdap vaccine in pregnant women: an observational study. *BMJ Open*. 2016 abr 18;6(4):e010911.
117. Brasil. Ministério da Saúde. Nota informativa sobre mudanças no calendário nacional de vacinação para o ano de 2017. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.
118. Sartori AMC, Soárez PC de, Fernandes EG, Gryninger LCF, Viscondi JYK, Novaes HMD. Cost-effectiveness analysis of universal maternal immunization with tetanus-diphtheria-acellular pertussis (Tdap) vaccine in Brazil. *Vaccine*. 2016;34(13):1531-9.
119. Burckhardt AE. On intrauterine vaccination. *Dtsch Arch Win Med*. 1879;24:506-9.
120. Martino M de. Dismantling the taboo against vaccines in pregnancy. *Int J Mol Sci*. 2016 jun 7;17(6).
121. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Koyama M. Dynamics of immunoglobulins at the feto-maternal interface. *Rev Reprod*. 1999;4(2):81-9.

122. Cohen P, Scadron SJ. The Effects of Active Immunization of the Mother upon the Offspring. *J Pediatr*. 1946;609–19.
123. Osborn JJ, Dancis J, Julia JF. Studies of the immunology of the newborn infant. *Pediatrics*. 1952;10(3):339–45.
124. Siegrist CA, Córdova M, Brandt C, Barrios C, Berney M, Tougne C, et al. Determinants of infant responses to vaccines in presence of maternal antibodies. *Vaccine*. 1998;16(14–15):1409–14.
125. Premenko-Lanier M, Hodge G, Rota P, Tamin A, Bellini W, McChesney M. Maternal antibody inhibits both cellular and humoral immunity in response to measles vaccination at birth. *Virology*. 2006;350(2):429–32.
126. Gall SA, Myers J, Pichichero M. Maternal immunization with tetanus-diphtheria-pertussis vaccine: Effect on maternal and neonatal serum antibody levels. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;204(4):334.e1-5.
127. Siegrist CA. Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: Review of hypotheses and definition of main determinants. *Vaccine*. 2003;21(24):3406–12.
128. Healy CM, Rench MA, Baker CJ. Importance of timing of maternal combined tetanus, diphtheria, and acellular pertussis (Tdap) immunization and protection of young infants. *Clin Infect Dis*. 2013;56(4):539–44.
129. Abu Raya B, Bamberger E, Almog M, Peri R, Srugo I, Kessel A. Immunization of pregnant women against pertussis: The effect of timing on antibody avidity. *Vaccine*. 2015;33(16):1948–52.
130. Abu Raya B, Srugo I, Kessel A, Peterman M, Bader D, Gonen R, et al. The effect of timing of maternal tetanus, diphtheria, and acellular pertussis (Tdap) immunization during pregnancy on newborn pertussis antibody levels - A prospective study. *Vaccine*. 2014;32(44):5787–93.
131. Naidu MA, Muljadi R, Davies-Tuck ML, Wallace EM, Giles ML. The optimal gestation for pertussis vaccination during pregnancy: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215(2):237.e1-6.
132. Eberhardt CS, Blanchard-Rohner G, Lemaître B, Boukrid M, Combescure C, Othenin-Girard V, et al. Maternal immunization earlier in pregnancy maximizes antibody transfer and expected infant seropositivity against pertussis. *Clin Infect Dis*. 2016;62(7):829–36.
133. Englund J a, Anderson EL, Reed GF, Decker MD, Edwards KM, Pichichero ME, et al. The effect of maternal antibody on the serologic response and the incidence of adverse reactions after primary immunization with acellular and whole-cell pertussis vaccines combined with diphtheria and tetanus toxoids. *Pediatrics*. 1995;96(3):580–4.
134. Siegrist CA, Barrios C, Martinez X, Brandt C, Berney M, Córdova M, et al. Influence of maternal antibodies on vaccine responses: inhibition of antibody but not T cell responses allows successful early prime-boost strategies in mice. *Eur J Immunol*. 1998 dez;28(12):4138–48.
135. Jones C, Pollock L, Barnett SM, Battersby A, Kampmann B. The relationship between concentration of specific antibody at birth and subsequent response to primary immunization. *Vaccine*. 2014;32(8):996–1002.
136. Fusaro AE, Brito CA De, Taniguchi EF, Muniz BP, Victor JR, Oriei NM, et al. Balance between early life tolerance and sensitization in allergy: Dependence

- on the timing and intensity of prenatal and postnatal allergen exposure of the mother. *Immunology*. 2009;128:e541–50.
137. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001 dez;25(4):402–8.
 138. Siegrist CA. The Challenges of Vaccine Responses in Early Life: Selected Examples. *J Comp Pathol*. 2007;137:S4–9.
 139. Caboré RN, Maertens K, Dobly A, Leuridan E, Damme P Van, Huygen K. Influence of maternal vaccination against diphtheria, tetanus, and pertussis on the avidity of infant antibody responses to a pertussis containing vaccine in Belgium. *Virulence*. 2017 oct 3;8(7):1245–54.
 140. Healy CM, Munoz FM, Rench MA, Halasa NB, Edwards KM, Baker CJ. Prevalence of Pertussis Antibodies in Maternal Delivery, Cord, and Infant Serum. *J Infect Dis*. 2004 jul 15;190(2):335–40.
 141. Claycombe KJ, Brissette CA, Ghribi O. Epigenetics of inflammation, maternal infection, and nutrition. *J Nutr*. 2015 maio;145(5):1109S–15S.
 142. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev*. 2005 abr;18(2):326–82.
 143. Twillert I van, Han WGH, Els CACM van. Waning and aging of cellular immunity to *Bordetella pertussis*. *Pathog Dis*. 2015;73(8):ftv071.
 144. Rothstein E, Edwards K. Health burden of pertussis in adolescents and adults. *Pediatr Infect Dis J*. 2005 maio;24(5 Suppl):S44–7.
 145. Vatti A, Monsalve DM, Pacheco Y, Chang C, Anaya J-M, Gershwin ME. Original antigenic sin: A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2017 set;83:12–21.
 146. Mor G, Cardenas I. The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):425–33.
 147. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):601–10.
 148. Gollwitzer ES, Marsland BJ. Impact of Early-Life Exposures on Immune Maturation and Susceptibility to Disease. *Trends Immunol*. 2015 nov;36(11):684–96.
 149. Jokic M, Guillois B, Cauquelin B, Giroux JD, Bessis JL, Morello R, et al. Fetal distress increases interleukin-6 and interleukin-8 and decreases tumour necrosis factor-alpha cord blood levels in noninfected full-term neonates. *BJOG*. 2000 mar;107(3):420–5.
 150. Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(9):1171–84.
 151. Nguyen M, Leuridan E, Zhang T, Wit D De, Willems F, Damme P van, et al. Acquisition of adult-like TLR4 and TLR9 responses during the first year of life. *PLoS One*. 2010;5(4):e10407.
 152. Kan B, Razzaghian HR, Lavoie PM. An Immunological Perspective on Neonatal Sepsis. *Trends Mol Med*. 2016;22(4):290–302.
 153. Marchant A, Kollmann TR. Understanding the ontogeny of the immune system to promote immune-mediated health for life. *Front Immunol*. 2015;6:77.

154. Ribeiro-do-Couto LM, Boeije LCM, Kroon JS, Hooibrink B, Breur-Vriesendorp BS, Aarden LA, et al. High IL-13 production by human neonatal T cells: Neonate immune system regulator? *Eur J Immunol.* 2001 nov;31(11):3394–402.
155. Malhotra I, Dent A, Mungai P, Wamachi A, Ouma JH, Narum DL, et al. Can Prenatal Malaria Exposure Produce an Immune Tolerant Phenotype?: A Prospective Birth Cohort Study in Kenya. *PLoS Med.* 2009 jul 28;6(7):e1000116.
156. Mold JE, Michaëlsson J, Burt TD, Muench MO, Karen P, Busch MP, et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science* (80-). 2008;322(5907):1562–5.
157. Kinder JM, Stelzer IA, Arck PC, Way SS. Immunological implications of pregnancy-induced microchimerism. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(8):483–94.
158. Leung S, Liu X, Fang L, Chen X, Guo T, Zhang J. The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cell Mol Immunol.* 2010 maio 12;7(3):182–9.
159. Lilic D, Cant AJ, Abinun M, Calvert JE, Spickett GP. Cytokine Production Differs in Children and Adults. *Pediatr Res.* 1997 ago 1;42(2):237–40.
160. Levy O, Wynn JL. A prime time for trained immunity: innate immune memory in newborns and infants. *Neonatology.* 2014;105(2):136–41.
161. Pettengill M, Robson S, Tresenriter M, Millán JL, Usheva A, Bingham T, et al. Soluble Ecto-5'-nucleotidase (5'-NT), Alkaline Phosphatase, and Adenosine Deaminase (ADA1) Activities in Neonatal Blood Favor Elevated Extracellular Adenosine. *J Biol Chem.* 2013 set 20;288(38):27315–26.
162. Adkins B. Neonatal immunology: Responses to pathogenic microorganisms and epigenetics reveal an “immunodiverse” developmental state. *Immunol Res.* 2013 dez 9;57(1–3):246–57.
163. Maródi L. Down-regulation of Th1 responses in human neonates. *Clin Exp Immunol.* 2002;128(1):1–2.
164. Langrish CL, Buddle JC, Thrasher AJ, Goldblatt D. Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. *Clin Exp Immunol.* 2002;128(1):118–23.
165. Li L, Lee H-HH, Bell JJ, Gregg RK, Ellis JS, Gessner A, et al. IL-4 utilizes an alternative receptor to drive apoptosis of Th1 cells and skews neonatal immunity toward Th2. *Immunity.* 2004 abr 1;20(4):429–40.
166. Chomarat P, Rissoan MC, Banchereau J, Miossec P. Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. *J Exp Med.* 1993 fev 1;177(2):523–7.
167. Lee YC, Newport MJ, Goetghebuer T, Siegrist CA, Weiss HA, Pollard AJ, et al. Influence of genetic and environmental factors on the immunogenicity of Hib vaccine in Gambian twins. *Vaccine.* 2006;24(25):5335–40.
168. Newport MJ, Goetghebuer T, Weiss HA, Whittle H, Siegrist C-A, Marchant A, et al. Genetic regulation of immune responses to vaccines in early life. *Genes Immun.* 2004 mar 22;5(2):122–9.
169. Tan PL, Jacobson RM, Poland GA, Jacobsen SJ, Pankratz VS. Twin studies of immunogenicity-determining the genetic contribution to vaccine failure. *Vaccine.* 2001 mar 21;19(17–19):2434–9.

170. Grassly NC, Kang G, Kampmann B. Biological challenges to effective vaccines in the developing world. *Philos Trans R Soc Biol Sci.* 2015;370(1671):20140138.
171. Cousins DJ, Lee TH, Staynov DZ. Cytokine coexpression during human Th1/Th2 cell differentiation: direct evidence for coordinated expression of Th2 cytokines. *J Immunol.* 2002 set 1;169(5):2498–506.
172. Hanson LÅ. The mother-offspring dyad and the immune system. *Acta Paediatr.* 2000;89(3):252–8.
173. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(10):626–38.
174. Votavova H, Dostalova Merkerova M, Fejglova K, Vasikova A, Krejcik Z, Pastorkova A, et al. Transcriptome alterations in maternal and fetal cells induced by tobacco smoke. *Placenta.* 2011;32:763–70.
175. Zacharasiewicz A. Maternal smoking in pregnancy and its influence on childhood asthma. *ERJ open Res.* 2016 jul;2(3):00042-2016.
176. Chahal N, McLain AC, Ghassabian A, Michels KA, Bell EM, Lawrence DA, et al. Maternal Smoking and Newborn Cytokine and Immunoglobulin Levels. *Nicotine Tob Res.* 2016 dez 23;19(7):789–96.
177. Palazzo R, Carollo M, Bianco M, Fedele G, Schiavoni I, Pandolfi E, et al. Persistence of T-cell immune response induced by two acellular pertussis vaccines in children five years after primary vaccination. *New Microbiol.* 2016;39(December):35–47.
178. Fedele G, Cassone A, Ausiello CM. T-cell immune responses to Bordetella pertussis infection and vaccination. *Pathog Dis.* 2015 out 1;73(7):pii:ftv051.
179. Schure R-M, Hendrikx LH, Rond LGH de, Öztürk K, Sanders EAM, Berbers GAM, et al. T-Cell Responses before and after the Fifth Consecutive Acellular Pertussis Vaccination in 4-Year-Old Dutch Children. *Clin Vaccine Immunol.* 2012 nov;19(11):1879–86.
180. Schure R-M, Hendrikx LH, Rond LGH de, Oztürk K, Sanders EAM, Berbers GAM, et al. Differential T- and B-cell responses to pertussis in acellular vaccine-primed versus whole-cell vaccine-primed children 2 years after preschool acellular booster vaccination. *Clin Vaccine Immunol.* 2013 set;20(9):1388–95.
181. Ercan TE, Sonmez C, Vural M, Erginoz E, Torunoğlu MA, Perk Y. Seroprevalance of pertussis antibodies in maternal and cord blood of preterm and term infants. *Vaccine.* 2013;31(38):4172–6.
182. Marcellini V, Piano Mortari E, Fedele G, Gesualdo F, Pandolfi E, Midulla F, et al. Protection against Pertussis in Humans Correlates to Elevated Serum Antibodies and Memory B Cells. *Front Immunol.* 2017;8:1158.
183. Maertens K, Caboré RN, Huygen K, Vermeiren S, Hens N, Damme P Van, et al. Pertussis vaccination during pregnancy in Belgium: Follow-up of infants until 1 month after the fourth infant pertussis vaccination at 15 months of age. *Vaccine.* 2016;34(31):3613–9.
184. Fallo AA, Neyro SE, Manonelles G V., Lara C, Hozbor D, Zintgraff J, et al. Prevalence of Pertussis Antibodies in Maternal Blood, Cord Serum, and Infants From Mothers With and Those Without Tdap Booster Vaccination During Pregnancy in Argentina. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2018 Feb 19;7(1):11-7.

185. Hardy-Fairbanks AJ, Pan SJ, Decker MD, Johnson DR, Greenberg DP, Kirkland KB, et al. Immune Responses in Infants Whose Mothers Received Tdap Vaccine During Pregnancy. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(11):1257–60.
186. Bento AI, Rohani P. Forecasting epidemiological consequences of maternal immunization. *Clin Infect Dis*. 2016;63(S4):S205–12.

APÊNDICES

**APÊNDICE A – DADOS INDIVIDUAIS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO –
GRUPOS COM DTPA**

Informações sobre parturientes vacinadas com dTpa na gestação e seus neonatos.

Amostras de parturientes e neonatos - dTpa					
Amostra	Idade no parto	Via de parto	IG dTpa	IG parto	Sexo RN
1	35	cesárea	28 6/7	39	M
2	30	cesárea	34	38	M
3	23	cesárea	25	38	F
4	26	vaginal	32 1/7	40	M
5	39	cesárea	28	39	M
6	41	vaginal	28 5/7	40	M
7	29	vaginal	33 3/7	39	F
8	27	vaginal	30 4/7	41	M
9	37	cesárea	30 3/7	39	M
10	25	cesárea	30 2/7	40	M
11	35	vaginal	31	39	M
12	42	cesárea	24	29	M
13	31	vaginal	28 5/7	40	F
14	35	cesárea	31 2/7	39	M
15	32	cesárea	32 6/7	41	F
16	22	cesárea	30 6/7	40	F
17	25	cesárea	31 2/7	40	M
18	22	vaginal	34 3/7	42	F
19	37	cesárea	34 5/7	40	M

dTpa: vacina combinada de difteria, tétano e pertussis acelular. F: feminino. IG: idade gestacional. M: masculino. RN: recém-nascido.

Informações sobre os lactentes e suas mães, vacinadas com dTpa na gestação.

Amostras de lactentes - dTpa											
Amostras	Sexo	Idade da mãe no parto	Via de parto	IG dTpa	IG parto	DTP 1	DTP 2	DTP 3	Idade na coleta	Dias entre a DTP3 e coleta	Aleitamento materno exclusivo
1	F	30	vaginal	28	41	2 M 5D	4M 6D	7M 25D	8M	35	7M
2	M	20	vaginal	33 2/7	40	2M 1D	4M 5D	6M 10D	7M 15D	35	7M
3	M	28	vaginal	27 6/7	41	2M 1D	4M 3D	6M 9D	7M 14D	35	5M
4	F	30	vaginal	35	39	2M 2D	4M 5D	6M 8D	7M 9D	35	7M
5	F	22	vaginal	34 6/7	39	2M 1D	4M 6D	6M 16D	8M 11D	55	7M
6	M	47	cesárea	26 2/7	39	2 M 5D	4M 9D	6M 12D	7M 16D	34	7M
7	M	26	cesárea	27	39	2M 2D	4M 11D	7M 2D	9M 3D	51	7D
8	F	23	cesárea	25	38	2M 2D	5M 4D	7M 12D	8M 27D	35	#
9	M	19	vaginal	32 1/7	40	2M 2D	4M 5D	6M 9D	8M 21D	72	7M
10	M	39	cesárea	28	39	2M 1D	4M 4D	6M 7D	8M 13D	66	7M
11	M	36	vaginal	27 1/7	40	2M 1D	4M 3D	6M 17D	7M 11D	34	5M
12	M	28	cesárea	34 1/7	41	2M 3D	4M 7D	6M 10D	7M 10D	30	7M
13	F	27	vaginal	31 4/7	40	2M 4D	5M	7M 1D	8M 29D	48	8M
14	F	21	vaginal	31 5/7	39	2M 1D	4M 13D	7M 24D	8M 13D	49	7M
15	M	45	cesárea	30 3/7	39	21D	3M 3D	7M 23D	7M 23D	30	7M
16	F	23	vaginal	26 6/7	36	3M 2D	5M 5D	7M 8D	8M 22D	34	6M
17	M	29	vaginal	27 1/7	41	2M 3D	4M 7D	6M 19D	8M 8D	49	7M
18	F	38	cesárea	27 1/7	37	2M 2D	4M 7D	6M 10D	7M 12D	42	7M
19	F	44	cesárea	31 6/7	40	2M 5D	4M 8D	6M 11D	7M 16D	35	15D
20	F	36	cesárea	27 6/7	39	2M 5D	4M 8D	6M 11D	7M 16D	35	7M
21	M	27	cesárea	27 4/7	40	2M 4D	4M 7D	6M 10D	7M 15D	35	7M
22	M	29	cesárea	30 2/7	39	2M 3D	4M 3D	6M 9D	7M 14D	35	4M
23	F	36	cesárea	29 1/7	39	2M 4D	4M 8D	7M 9D	8M 29D	10	7M
24	F	38	cesárea	27	39	2M 1D	4M 4D	6M 7D	8M 5D	58	6M
25	M	23	vaginal	31	42	2M 3D	4M 4D	6M 2D	10M 9D	127	6M
26	M	21	vaginal	34	39	2M 1D	2M 12D	6M 13D	7M 20D	37	7M
27	F	23	cesárea	28	37	2M 1D	4M 3D	6M 13D	9M 3D	80	8M
28	M	20	cesárea	30 1/7	40	2M 5D	2M 15D	7M 23D	7M 23D	30	7M
29	F	31	vaginal	29 6/7	38	2M 11D	4M 5D	6M 7D	7M 15D	38	6M
30	M	40	cesárea	27 1/7	41	2M 3D	4M 5D	6M 8D	7M 23D	45	#
31	F	27	cesárea	26 3/7	33	2M 3D	2M 13D	6M 18D	7M 23D	35	7M
32	M	37	cesárea	30 6/7	37	2M 3D	4M 6D	6M 12D	7M 17D	35	6M
33	F	26	cesárea	33 1/7	40	2M 3D	4M 3D	6M 6D	7M 14D	38	6M

DTP: vacina combinada de difteria, tétano e pertussis celular. dTpa: vacina combinada de difteria, tétano e pertussis acelular. F: feminino. IG: idade gestacional. M: masculino. M e D: mês/meses e dia/dias. #: sem informação.

APÊNDICE B – DADOS INDIVIDUAIS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO – GRUPO SEM DTPA

Informações sobre parturientes não vacinadas com dTpa na gestação e seus neonatos.

Amostras de parturientes e neonatos - sem dTpa					
Amostra	Idade no parto	Via de parto	IG dTpa	IG parto	Sexo RN
1	18	vaginal	-	38	M
2	22	vaginal	-	40	F

dTpa: vacina combinada de difteria, tétano e pertussis acelular. F: feminino. IG: idade gestacional. M: masculino. RN: recém-nascido.

Informações sobre os lactentes e suas mães, não vacinadas com dTpa na gestação.

Amostras de lactentes - sem dTpa											
Amostras	Sexo	Idade da mãe no parto	Via de parto	IG dTpa	IG parto	DTP 1	DTP 2	DTP 3	Idade na coleta	Dias entre a DTP3 e coleta	Aleitamento materno exclusivo
1	M	21	vaginal	-	39	2M 10D	4M 19D	8M 27D	9M 5D	8	6M
2	F	25	vaginal	-	40	2M 2D	4M 5D	6M 8D	7M 13D	35	6M
3	F	25	vaginal	-	37	2M 3D	4M 6D	6M 8D	10M 17D	129	10M
4	F	22	vaginal	-	40	2M 4D	4M 13D	6M 25D	10M 3D	98	5M
5	F	19	vaginal	-	40	2M 2D	4M 7D	6M 22D	8M 8D	46	7M
6	F	21	cesárea	-	40	2M 2D	4M 5D	6M 12D	7M 23D	41	1M
7	F	28	vaginal	-	42	2M 3D	4M 2D	6M 3D	6M 10D	7	4M
8	M	22	cesárea	-	40	2M 2D	4M 29D	7M 3D	10M 18D	95	6M
9	M	37	cesárea	-	39	2M 2D	194	8M 20D	10M 10D	50	6M
10	F	25	cesárea	-	40	2M 10D	4M 15D	6M 27D	9M 14D	77	6M

DTP: vacina combinada de difteria, tétano e pertussis celular. dTpa: vacina combinada de difteria, tétano e pertussis acelular. F: feminino. IG: idade gestacional. M: masculino. M e D: mês/meses e dia/dias. #: sem informação.

APÊNDICE C – CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS

Concentração de citocinas em lactentes. Valores individuais da concentração de citocinas em sobrenadante de cultura celular, dos perfis Th1/Th2/Th17/regulador, no grupo de lactentes.

	IFN- γ	IL-13	IL-17A	IL-10
C7 V	2313,63	0,00	5,47	33,51
	1491,77	5966,00	0,00	34,90
	1198,92	1158,00	0,00	13,37
	1138,95	4985,00	29,71	66,36
	1102,78	157,56	0,00	16,61
	727,68	733,60	0,00	13,41
	700,70	278,57	0,00	6,36
	554,67	1200,00	11,45	22,61
	407,45	479,04	7,83	5,57
	389,76	0,00	7,83	15,32
	352,27	24,61	0,00	174,53
	332,67	1348,00	13,18	12,14
	273,07	84,67	0,00	0,00
	230,00	323,35	12,49	8,40
	134,91	448,98	6,68	33,63
	53,57	4,07	0,00	0,00
	41,09	620,39	25,87	86,18
	21,64	300,96	0,00	10,98
	0,00	1504,00	19,41	0,00
	0,00	685,87	5,47	0,00
	0,00	3,11	9,32	44,51
	0,00	0,00	32,02	23,34
	0,00	0,00	9,32	0,00
	0,00	0,00	4,63	0,00
	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00	0,00	0,00	0,00
C7 NV	2632,72	2713,00	13,86	32,05
	2613,05	0,00	11,45	71,73
	750,93	0,00	0,00	12,55
	492,64	706,76	0,00	0,00
	148,54	79,36	0,00	0,00
	0,00	542,37	0,00	0,00
	0,00	296,17	13,18	0,00
	0,00	48,61	0,00	0,00
	0,00	3,99	0,00	0,00

V: lactentes filhos de mães vacinadas com dTpa na gestação. NV: lactentes filhos de mães não vacinadas com dTpa na gestação.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Folha de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div> USP - FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FMUSP </div> <div> </div> </div>		
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
<p>DADOS DA EMENDA</p> <p>Título da Pesquisa: Influência da vacinação com dTpa em gestantes no perfil da resposta imunológica contra a Bordetella pertussis na criança</p> <p>Pesquisador: Cyro Alves de Brito</p> <p>Área Temática:</p> <p>Versão: 3</p> <p>CAAE: 62566716.7.0000.0065</p> <p>Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo</p> <p>Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO</p> <p>DADOS DO PARECER</p> <p>Número do Parecer: 2.130.229</p> <p>Apresentação do Projeto: O projeto de pesquisa está em andamento e no presente momento o Pesquisador Principal solicita a análise de uma emenda.</p> <p>Objetivo da Pesquisa: O objetivo da presente emenda é o de justificar a inclusão do Instituto Adolfo Lutz. A Faculdade de Medicina da USP (FMUSP) foi considerada como Instituição proponente pois a aluna Carolina Argondizo Correia está vinculada como aluna a nível de mestrado no Instituto de Medicina Tropical (IMT), vinculado à FMUSP, porém no presente momento foi proposto a emenda de inclusão do Instituto Adolfo Lutz como instituição coparticipante pois as amostras coletadas para o estudo em questão são integrantes de projeto em vigência nesta Instituição, intitulado "Avaliação da vacina tríplice acelular do adulto (dTpa) em gestantes na redução da ocorrência de coqueluche em lactentes", CAAE número 37581114.0.0000.0059, e serão processadas, analisadas e armazenadas no Instituto Adolfo Lutz. Como solicitado pelo CEP do Instituto Adolfo Lutz foi anexado o comprovante de aprovação do projeto pelo Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz.</p> <p>Avaliação dos Riscos e Benefícios: A emenda não implica na alteração em riscos e benefícios aos participantes quando considerado o projeto original.</p>		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;"> Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36 Bairro: PACAEMBU UF: SP Município: SÃO PAULO Telefone: (11)3893-4401 </td> <td style="padding: 5px; text-align: right;"> CEP: 01.246-903 E-mail: cep.fm@usp.br </td> </tr> </table>	Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36 Bairro: PACAEMBU UF: SP Município: SÃO PAULO Telefone: (11)3893-4401	CEP: 01.246-903 E-mail: cep.fm@usp.br
Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36 Bairro: PACAEMBU UF: SP Município: SÃO PAULO Telefone: (11)3893-4401	CEP: 01.246-903 E-mail: cep.fm@usp.br	

Continuação

**USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP**

Continuação do Parecer: 2.130.229

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nada a declarar

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A emenda não implica em alteração do que anteriormente estabelecido no TCLE

Recomendações:

A emenda não implica em alterações ao projeto que resultem em pendências éticas

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Projeto não apresenta pendências éticas

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_924773 E1.pdf	19/05/2017 11:40:13		Aceito
Outros	AprovacaoCTC.pdf	18/05/2017 18:42:37	Carolina Argondizo Correia	Aceito
Outros	ParecerprevioCEP.pdf	12/12/2016 11:32:16	Carolina Argondizo Correia	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	12/12/2016 11:31:53	Carolina Argondizo Correia	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	12/12/2016 11:31:38	Carolina Argondizo Correia	Aceito
Outros	Questionarios.pdf	11/12/2016 16:22:12	Carolina Argondizo Correia	Aceito
Outros	CadastroOnline.pdf	21/11/2016 12:35:04	Carolina Argondizo Correia	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	18/10/2016 11:01:46	Carolina Argondizo Correia	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	04/10/2016 13:27:25	Carolina Argondizo Correia	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anexo.pdf	04/10/2016 13:26:47	Carolina Argondizo Correia	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	04/10/2016 13:26:34	Carolina Argondizo Correia	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

Página 02 de 03

Continua

Continuação

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 2.130.229

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 21 de Junho de 2017

Assinado por:

Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

ANEXO B – TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de consentimento livre e esclarecido apresentado às parturientes que não foram vacinadas com a dTpa na gestação.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CENTRO DE IMUNOLOGIA

ANEXO 3 (Estudo coorte/Mães não vacinadas) TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CONVIDAMOS A SENHORA E O SEU/SUA FILHO (A) PARA PARTICIPAR DE UMA PESQUISA: “Avaliação da vacina tríplice acelular do adulto (dTpa) em gestantes na redução da ocorrência de coqueluche em lactentes” de responsabilidade dos seguintes pesquisadores: -**Lourdes Rehder de Andrade Vaz de Lima e Helena Keico Sato. Esta pesquisa será conduzida no Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz-SP e terá a duração de 1 ano.**

A Coqueluche é uma doença respiratória que causa uma forte tosse e é grave nos primeiros meses de vida das crianças. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar a sua proteção contra a Coqueluche e a proteção do seu filho(a). Para isto, convidamos a senhora a doar voluntariamente amostra de sangue da senhora e amostra de sangue do seu filho, para serem estudadas sobre como o sistema de defesa do seu organismo responde à coqueluche. Também convidamos a senhora para responder a um questionário de forma totalmente voluntária e a sua recusa não ocasionará nenhum prejuízo na assistência do (a) seu/sua filho(a).

A coleta de material

Se a senhora concordar em participar desta pesquisa, esta coleta será realizada uma única vez, no mesmo momento em que for obtido o sangue da senhora para a realização de exames de rotina, como sífilis e AIDS. Dessa forma, no momento da realização dos referidos exames obrigatórios, serão coletados 10ml a mais de sangue da veia de seu antebraço no hospital, no momento do parto (podendo ser 24 horas pré ou após parto). Para coleta de sangue, o material utilizado é totalmente estéril e descartável, e o procedimento será realizado por um funcionário devidamente qualificado.

Precisamos da sua permissão, também, para coletar sangue do seu filho em três momentos: 1º) momento-sangue do cordão umbilical do seu filho ao nascimento; 2º) momento- 5 ml, de sangue da veia do antebraço do seu filho(a) antes da primeira dose da vacina contra coqueluche aos 2 meses; 3º) momento- 5 ml de sangue que será coletado 30 dias após a terceira dose, aos 7 meses. Estas coletas serão realizadas no hospital na melhor data para a senhora. Após a coleta, o material será enviado ao laboratório e será utilizado somente para pesquisa.

Como em qualquer coleta de sangue, é possível haver algum desconforto como, por exemplo, um pouco de dor ou mancha no local da punção. Já no caso da coleta de sangue do cordão umbilical, este não terá o mesmo risco, porque será coletado depois de cortado o cordão umbilical, do bebê. Vale lembrar que você pode desistir de participar desta pesquisa a qualquer momento sem prejuízo da sua assistência.

Da amostra de sangue será obtido o plasma que será enviado ao Laboratório do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, somente para pesquisa. Será necessário também que a senhora responda a um questionário sobre dados gerais sobre a sua saúde e do seu filho(a).

O excedente do seu plasma e do seu filho(a) poderá somente ser utilizado para esta pesquisa.

Continuação

O questionário

Antes de concordar em participar deste estudo e responder ao questionário, é muito importante que compreenda as informações e instruções contidas neste documento. Gostaríamos de pedir o seu consentimento para fazer algumas perguntas sobre a senhora e seu bebê. Gostaríamos de saber, também, os registros contidos na sua carteira de gestante, bem como na sua carteira de vacinação. Este questionário será aplicado por um funcionário devidamente qualificado e identificado em três momentos: no hospital (para coleta dos seus dados e do seu bebê) e em dois momentos no hospital (Quando seu filho (a) tiver dois e sete meses). As respostas serão anotadas em formulário próprio pelo funcionário e levará em torno de 15 minutos.

O preenchimento do questionário não representará qualquer risco de ordem física ou psicológica para a senhora. Serão utilizados registros de assistência à saúde, tais como dados clínicos e vacinais da senhora e do (a) seu/sua filho(a).

A senhora ou o (a) seu/sua filho(a) não terão nenhum benefício no momento por participar desta pesquisa, mas estará contribuindo enormemente para o desenvolvimento de uma nova estratégia de vacinação, que trará futuros benefícios às crianças brasileiras.

Em nenhum momento o seu nome e do(a) seu/sua filho(a) serão divulgados em publicações, relatórios ou em quaisquer outros meios de comunicação, sendo, portanto, o resultado de seu questionário anônimo e confidencial.

Informamos que em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os pesquisadores responsáveis são: Dra Helena Sato, Telefone:30668781 e Dra Lourdes Rehder de Andrade Vaz de Lima, Telefone: (11)30682898. Se você tiver qualquer dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL) no telefone (11) 3068-2859.

Caso queira retirar o consentimento, ou seja, caso não concorde mais em responder ao questionário, a senhora poderá fazê-lo a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

Para participar desta pesquisa, não haverá qualquer custo ao participante, tampouco compensação financeira pela participação.

Assinatura do participante
da pesquisa/representante legal Data ____/____/____

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Termo de consentimento livre e esclarecido apresentado às parturientes que foram vacinadas com a dTpa na gestação.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CENTRO DE IMUNOLOGIA

ANEXO 3 (Estudo coorte/Mães vacinadas) TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CONVIDAMOS A SENHORA E O SEU/SUA FILHO (A) PARA PARTICIPAR DE UMA PESQUISA: “Avaliação da vacina tríplice acelular do adulto (dTpa) em gestantes na redução da ocorrência de coqueluche em lactentes” de responsabilidade dos seguintes pesquisadores: -Lourdes Rehder de Andrade Vaz de Lima e Helena Keico Sato. Esta pesquisa será conduzida no Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz-SP e terá a duração de 1 ano.

A Coqueluche é uma doença respiratória que causa uma forte tosse e é grave nos primeiros meses de vida das crianças. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar a sua proteção contra a vacina da Coqueluche e a proteção do seu filho(a). Para isto, convidamos a senhora a doar voluntariamente amostra de sangue da senhora e amostra de sangue do seu filho, para serem estudadas sobre como o sistema de defesa do seu organismo responde à vacina de coqueluche. Também convidamos a senhora para responder a um questionário de forma totalmente voluntária e a sua recusa não ocasionará nenhum prejuízo na assistência do (a) seu/sua filho(a).

A coleta de material

Se a senhora concordar em participar desta pesquisa, esta coleta será realizada uma única vez, no mesmo momento em que for obtido o sangue da senhora para a realização de exames de rotina, como sífilis e AIDS. Dessa forma, no momento da realização dos referidos exames obrigatórios, serão coletados 10ml a mais de sangue da veia de seu antebraço no hospital, no momento do parto (podendo ser 24 horas pré ou após parto). Para coleta de sangue, o material utilizado é totalmente estéril e descartável, e o procedimento será realizado por um funcionário devidamente qualificado.

Precisamos da sua permissão, também, para coletar sangue do seu filho em três momentos: 1º) momento-sangue do cordão umbilical do seu filho ao nascimento; 2º) momento- 5 ml, de sangue da veia do antebraço do seu filho(a) antes da primeira dose da vacina contra coqueluche aos 2 meses ; 3º) momento- 5 ml de sangue que será coletado 30 dias após a terceira dose, aos 7 meses. Estas coletas serão realizadas no hospital na melhor data para a senhora. Após a coleta, o material será enviado ao laboratório e será utilizado somente para pesquisa.

Como em qualquer coleta de sangue, é possível haver algum desconforto como, por exemplo, um pouco de dor ou mancha no local da punção. Já no caso da coleta de sangue do cordão umbilical, este não terá o mesmo risco, porque será coletado depois de cortado o cordão umbilical, do bebê. Vale lembrar que você pode desistir de participar desta pesquisa a qualquer momento sem prejuízo da sua assistência.

Da amostra de sangue será obtido o plasma que será enviado ao Laboratório do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, somente para pesquisa. Será necessário também que a senhora responda a um questionário sobre dados gerais sobre a sua saúde e do seu filho(a).

O excedente do seu plasma e do seu filho(a) poderá somente ser utilizado para esta pesquisa.

Por meio das respostas de exame de sangue do seu filho (a) realizado aos 7 meses, avaliaremos se houve resposta à vacina de coqueluche e a senhora será avisada por carta. Caso o resultado do exame for negativo, avisaremos por carta. O seu filho (a) receberá mais uma dose da vacina na mesma Unidade de Saúde onde já vacinado (a).

Continuação

O questionário

Antes de concordar em participar deste estudo e responder ao questionário, é muito importante que compreenda as informações e instruções contidas neste documento. Gostaríamos de pedir o seu consentimento para fazer algumas perguntas sobre a senhora e seu bebê. Gostaríamos de saber, também, os registros contidos na sua carteira de gestante, bem como na sua carteira de vacinação. Este questionário será aplicado por um funcionário devidamente qualificado e identificado em três momentos: no hospital (para coleta dos seus dados e do seu bebê) e em dois momentos no hospital (Quando seu filho (a) tiver dois e sete meses). As respostas serão anotadas em formulário próprio pelo funcionário e levará em torno de 15 minutos.

O preenchimento do questionário não representará qualquer risco de ordem física ou psicológica para a senhora. Serão utilizados registros de assistência à saúde, tais como dados clínicos e vacinais da senhora e do (a) seu/sua filho(a).

A senhora ou o (a) seu/sua filho(a) não terão nenhum benefício no momento por participar desta pesquisa, mas estará contribuindo enormemente para o desenvolvimento de uma nova estratégia de vacinação, que trará futuros benefícios às crianças brasileiras.

Em nenhum momento o seu nome e do (a) seu/sua filho (a) serão divulgados em publicações, relatórios ou em quaisquer outros meios de comunicação, sendo, portanto, o resultado de seu questionário anônimo e confidencial.

Informamos que em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os pesquisadores responsáveis são: Dra Helena Sato, Telefone:30668781 e Dra Lourdes Rehder de Andrade Vaz de Lima, Telefone: (11)30682898. Se você tiver qualquer dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL) no telefone (11) 3068-2859 .

Caso queira retirar o consentimento, ou seja, caso não concorde mais em responder ao questionário, a senhora poderá fazê-lo a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

Para participar desta pesquisa, não haverá qualquer custo ao participante, tampouco compensação financeira pela participação.

Assinatura do participante
da pesquisa/representante Data ____ / ____ / ____
legal

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável
pelo estudo Data ____ / ____ / ____