

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**DESFECHOS DAS GESTAÇÕES EXPOSTAS AO VÍRUS H1N1 E AO
OSELTAMIVIR NO RIO GRANDE DO SUL DURANTE A PANDEMIA DE 2009**

André Anjos da Silva

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

Orientadora: Profa. Dra. Lavínia Schüler Faccini
Co-orientadora: Dra. Maria Teresa Vieira Sanseverino

Porto Alegre, agosto de 2014.

Este trabalho foi desenvolvido no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA) com apoio do Sistema Nacional de Informações sobre Agentes Teratogênicos (SIAT-HCPA).

INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Lavínia Schuler Faccini pela confiança e por todo o apoio durante a realização desse e de outros projetos. Sua forma de trabalho será sempre para mim um modelo a ser seguido.

À minha co-orientadora, Dr^a. Maria Teresa Vieira Sanseverino, pela dedicação incansável para esse trabalho e para minha formação profissional. Sua atuação junto ao paciente será sempre um modelo de assistência. Além disso, agradeço imensamente o impulso para chegar cada vez mais longe.

Aos membros da banca avaliadora desse trabalho, Prof^a. Dr^a. Ida Vanessa D. Schwartz, Prof^a. Dr^a. Isabella Monlleo e Prof. Dr. Alberto M. Abeche, pela atenção dedicada à revisão técnica da tese.

Aos membros do Sistema Nacional de Informações sobre Agentes Teratogênicos (SIAT) do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA) e integrantes da equipe desse trabalho: Bruno Goldani, Camila Heck, Fernanda Duarte Torres, Graziella Rangel Paniz, Marta Haas Costa, Paula Baptista Sanseverino, Pietro Baptista de Azevedo e Tani Maria Schilling Ranieri.

À Fernanda Sales Luiz Vianna, grande amiga e incentivadora desse e de outros trabalhos desde a época de seu projeto inicial. Agradeço os conselhos e amizade dedicados.

Aos meus grandes amigos e colegas da Residência em Genética Médica: Cláudia Fernandes Lorea, Fabiano de Oliveira Poswar e Karina Donis. Agradeço, ainda, aos amigos e companheiros da Residência em Pediatria: Álvaro Durán, Cristina Midori, Denise Lima, Geanine Gobo, Júlia Victora, Juliana Seibert, Klerize A. de Souza, Leandra Rech, Luise Poitevin, Natália Lima, Patrícia Piccoli, Renata Kostin, Stefânia S. Vieira e Taciane Alegria.

Aos amigos muito especiais conquistados na Genética: Eduardo Mattos, Flávia Romariz Ferreira, Gabriel Furtado, Henrique Galvão, Karlla Jesuíno, Lucas Fraga, Luiza Emy Dorfman, Mariana Oliveira, Silvani Herber e Tássia Tonon.

Aos médicos do SGM-HCPA, pelo apoio e ensinamentos de sempre: Carolina F. M. Souza, Cristina Netto, Filippo Vairo, Jonas Saute, Júlio César L. Leite, Têmis M. Felix.

À minha grande amiga-irmã, Luciane Restelatto, pelo companheirismo de sempre; e aos demais amigos desde a época da faculdade: Amanda L. da Costa, Débora Götze, Gisele e Rafael Cristovam, Tatiana C. Moresco, Pablo Gustavo Oliveira.

Um agradecimento muito especial à minha família: aos meus pais, Rosana Anjos e José Roberto da Silva por terem me ensinado a base de tudo, o respeito e amor ao ser humano; à minha irmã, Joseane Anjos da Silva, por ser o meu presente da vida; à minha tia Eros Maria da Silva Veiga e dinda Rosane Veiga pelo apoio e carinho de sempre; às minhas avós, Altorina de Oliveira Silva e Maria Queiroz dos Anjos pelo amor dedicado sempre.

Ao Felipe Loposzinski, por ser parte maior e fundamental da minha história, por seu suporte diário.

E, por fim, aos pacientes, motivos pelos quais a ciência nos aproxima dos seres humanos.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	8
Lista de Figuras e Tabelas	9
Resumo	10
Abstract	12
Capítulo I – Introdução	14
1. Introdução.....	14
1.1. O Vírus Influenza e a Pandemia.....	15
1.1.1. Componentes do Virion.....	16
1.1.2. Ciclo de Replicação do Vírus Influenza.....	20
1.1.3. Pandemias de Influenza.....	22
1.1.4. Sistema de Classificação de Infecções.....	23
1.1.5. Surgimento do Vírus H1N1 da Pandemia de 2009.....	25
1.1.6. Vigilância Epidemiológica da Influenza no Rio Grande do Sul.....	26
1.2. Infectividade	28
1.3. Quadro clínico	28
1.4. Complicações	29
1.5. Influenza A (H1N1) em gestantes	31
1.5.1. Lactação.....	36
1.6. Tratamento	36
1.6.1. Fosfato de Oseltamivir	37
1.6.2. Efetividade e Segurança do Oseltamivir	37
1.6.3. Uso de Oseltamivir em gestantes	38
1.6.4. Uso do oseltamivir em crianças.....	39
Capítulo II - Justificativa	41
2. Justificativa.....	42
Capítulo III - Objetivos	43
3. Objetivo geral.....	44
3.1. Objetivos específicos	44

Capítulo IV - Artigo 1	45
Impact on Pregnancies in South Brazil from the Influenza A (H1N1) Pandemic: Cohort Study.	46
Capítulo V – Artigo 2	71
Influenza A (H1N1) Pandemic in South Brazil: Impact of the use of Oseltamivir in pregnant women.....	72
Capítulo VI – Artigo 3	89
Avaliação de efeitos do Oseltamivir nas crianças expostas intra-útero durante a Pandemia de Influenza A H1N1 de 2009: uma série de casos.....	90
Capítulo VII – Discussão	105
7. Discussão.....	106
Capítulo VIII – Perspectivas	109
8. Perspectivas.....	110
Capítulo IX – Referências Bibliográficas	111
9. Referências Bibliográficas.....	112
Capítulo X – Anexos	120
10.1. Anexo 1	
Carta de Aprovação do Projeto (GPPG – 09-579).....	121
10.2. Anexo 2	
Ficha de Seguimento das Gestações notificadas como suspeita de Influenza A H1N1.....	122
10.3. Anexo 3	
Ficha de Seguimento das Gestações notificadas como suspeita de Influenza A H1N1 e seus filhos.....	125
Capítulo XI – Apêndices	127
11.1 Apêndice 1	
Menção Honrosa de Apresentação Oral da 30ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.....	128
11.2 Apêndice 2	
Prêmio João Monteiro Pina Neto – XXIV Congresso Brasileiro de Genética Médica.....	129

11.3 Apêndice 3	
Artigo publicado na Revista HCPA (2010) – Plasmatic Von Willebrand Factor Measurement and Clinical Variables as Prognostic Factors of Breast Cancer.....	130
11.4 Apêndice 4	
Artigo publicado na Revista Research and Reports in Endocrine Disorders (2012) – Emerging Treatment options for the mucopolysaccharidoses.....	136
11.5 Apêndice 5	
Artigo publicado na Revista HCPA (2013) – Osler-Weber-Rendu Syndrome.....	148

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CDC: *Center for Disease Control*

CEVS: Centro Estadual de Vigilância em Saúde

HA: hemaglutinina

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

NA: neuraminidase

NP: nucleoproteína

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: *polymerase chain reaction*

SES-RS: Secretaria Estadual de Saúde – Rio Grande do Sul

SGM: Serviço de Genética Médica

SIAT: Serviço de Informações sobre Agentes Teratogênicos

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SNC: Sistema Nervoso Central

SRAG: Síndrome Respiratória Aguda Grave

SUS: Sistema Único de Saúde

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

WHO: *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Componentes do Virion do Vírus Influenza.

Tabela 1: Pandemias de Influenza ocorridas no século XX.

Tabela 2: Fases de alerta e risco de pandemia.

Figura 2: Distribuição dos casos notificados e confirmados de Influenza por novo subtipo viral (Influenza A H1N1 (2009)) por semana epidemiológica de início dos sintomas, RS, 2009, 2010 e 2011.

Quadro 1: Definição de caso de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG).

Tabela 3: Taxa de mortalidade e distribuição do total de óbitos confirmados laboratorialmente por região administrativa da OMS, 2009.

Figura 3: casos notificados e confirmados de H1N1 na pandemia de 2009, RS e Brasil.

Tabela 4: Estudos prévios de desfechos gestacionais em pacientes expostas ao vírus Influenza A (H1N1) 2009.

RESUMO

O presente trabalho aborda como questão central o desfecho das gestações expostas ao vírus Influenza A (H1N1) e, conseqüentemente, ao seu tratamento com o fármaco oseltamivir durante a pandemia do ano 2009.

O vírus influenza A H1N1 é produto de vários rearranjos genéticos entre cepas dos vírus influenza previamente circulantes, alguns destes exclusivos de suínos ou de aves, e que se tornaram capazes de infectar humanos. A epidemia de influenza A (H1N1) teve início no México, e expandiu-se rapidamente para países do mundo inteiro, sendo declarada pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente dois meses após o aparecimento dos primeiros casos.

As gestantes são consideradas um grupo de risco para complicações graves relacionadas ao vírus influenza H1N1, com grande morbidade e mortalidade observadas em epidemias anteriores do vírus Influenza. Quanto aos efeitos sobre o embrião-feto, os estudos a respeito do potencial teratogênico do vírus influenza ainda são limitados. A literatura não demonstrou, até o momento, efeitos adversos desse vírus sobre o embrião-feto.

O tratamento específico consiste no uso de inibidores da neuraminidase, zanamivir e oseltamivir, dos quais apenas o último está disponível no Brasil.

O objetivo geral da tese é avaliar as gestações expostas ao vírus H1N1 e submetidas ao tratamento com Fosfato de Oseltamivir. Os objetivos específicos são comparar gestantes expostas e não-expostas ao vírus Influenza A H1N1 quanto aos desfechos maternos e perinatais; avaliar os potenciais efeitos adversos da medicação em gestantes expostas ao oseltamivir; e avaliar a saúde e o desenvolvimento neuropsicomotor das crianças expostas durante a gravidez ao oseltamivir.

Foi realizado um estudo de coorte prospectivo não controlado que avaliou gestantes com exposição ao vírus H1N1 e ao tratamento com Fosfato de Oseltamivir. A amostra consistiu nas 589 gestantes com sintomas suspeitos de

Influenza A notificadas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Influenza (SINAN-Influenza banco de dados do estado do Rio Grande do Sul). Os seguimentos de 424 gestantes foram realizados por contato telefônico, visita domiciliar, dados de prontuário médico ou Declaração de Nascido Vivo, por uma equipe treinada.

. Foram obtidos 243 resultados de exames de PCR (*polymerase chain reaction*). Houve 163 (67%) casos confirmados de H1N1 e 80 (33%) Influenza não-H1N1. Houve 24 óbitos maternos, sendo 18 em H1N1. Houve 8 natimortos, sendo 5 filhos de gestantes expostas ao H1N1. Não houve diferença nos desfechos perinatais. Apenas um caso de malformação congênita (fenda palatina) foi observado em um bebe não exposto ao oseltamivir.

Uso de oseltamivir foi identificado em 221 pacientes. Dessas, 86 gestantes apresentaram PCR positivo para Influenza A (H1N1) e 51 estavam no grupo não-H1N1. Reações adversas foram relatadas em 92 (42%) gestantes. Houve um maior número de reações adversas relatadas em pacientes não-H1N1 após o uso do oseltamivir. Ocorreram menos óbitos maternos (7,2%) nas que receberam oseltamivir comparativamente a 34,7% das mulheres que não foram tratadas (OR: 0,14, IC95%: 0,04-0,42, $p=0,0003$). Da mesma forma a frequência de natimortos foi menor (2,2%) nas tratadas, em comparação a 13,0% das não tratadas (OR: 0,15, IC95%: 0,03-0,89, $p=0,03$).

Atrasos afetando dois ou mais marcos do desenvolvimento foram relatados em 10 (19,2%) de 52 crianças expostas ao oseltamivir durante o período gestacional e seguidas por no mínimo 36 meses. Essa frequência está acima do esperado para a população brasileira (15%).

Em conclusão, espera-se que o presente trabalho seja capaz de contribuir para um melhor entendimento a respeito do potencial teratogênico do vírus Influenza A (H1N1) e de seu tratamento com o fármaco oseltamivir. Estudos futuros serão decisivos no estabelecimento de condutas clínicas no que diz respeito ao tratamento e manejo geral dessa condição nesse grupo específico de pacientes.

ABSTRACT

The present investigation approaches as central issue the outcomes of pregnancies exposed to the Influenza A (H1N1) virus and, consequently, to its treatment with the drug oseltamivir during the pandemic in the year 2009.

The Influenza A H1N1 virus is the product of multiple genetic rearrangements among strains of influenza that had previously been circulating. Some of these were unique to swine and birds and became capable of infecting humans. The influenza A (H1N1) epidemic began in Mexico and rapidly spread to other countries around the world and was declared a pandemic by the World Health Organization (WHO) approximately two months after the first cases appeared.

Pregnant women are considered to be a group at risk of serious complications related to the H1N1 influenza virus, with high morbidity and mortality observed in previous Influenza virus epidemics. As for effects on the embryo/fetus, there are still few studies on the teratogenic potential of the influenza virus. The literature has not demonstrated, so far, adverse effects of this virus on the embryo/fetus.

The specific treatment is the use of the neuraminidase inhibitors, zanamivir and oseltamivir, of which only the latter is available in Brazil.

The general aim of this work is to evaluate pregnancies exposed to the Influenza A (H1N1) virus and submitted to treatment with Oseltamivir Phosphate. Specific objectives are to compare pregnant women exposed and not exposed to the Influenza A H1N1 virus as on maternal and perinatal outcomes; evaluate potential adverse effects of medication in pregnant women exposed to oseltamivir; and evaluate the health and neurodevelopment in children exposed during pregnancy to oseltamivir.

We performed an uncontrolled prospective cohort study that evaluated pregnancies with exposure to the H1N1 Influenza virus and its treatment with Oseltamivir Phosphate. The sample consisted of 589 pregnant women with

suspected symptoms of Influenza A who were reported in the Information System for Notifiable Diseases - Influenza (SINAN-Influenza, Rio Grande do Sul Database). Follow-up of 424 pregnancies was conducted via telephone, home visit, medical records or Live Birth Certificate, by a trained team.

PCR (*polymerase chain reaction*) was performed in 243 individuals. There were 163 (67%) confirmed cases of H1N1 and 80 (33%) non-H1N1 Influenza virus. There were twenty-four maternal deaths, 18 of these were H1N1+ patients. Eight stillbirths were reported, five of these were for H1N1+ pregnant women. There were no differences in perinatal outcomes. Only one cleft palate was reported in a newborn whose mother did not use oseltamivir.

Use of oseltamivir phosphate was identified in 221 patients. Of this, there were 86 confirmed cases of Influenza A (H1N1) and 51 non-H1N1 Influenza virus. Adverse reactions were reported in 92 (42%) pregnancies. There were a higher number of adverse effects reported in non-H1N1 patients after the use of oseltamivir. There were fewer maternal deaths (7.2%) in those who received oseltamivir compared to 34.7% of women who were not treated (OR: 0.14, CI95%: 0.04-0.42, $p=0.0003$). Similarly, the frequency of stillbirth was lower (2.2%) in treated as compared to 13.0% of the untreated women (OR: 0.15, CI95%: 0.03-0.89, $p=0.03$).

Developmental delay in two or more skills was reported in 10 (19.2%) of 52 children exposed prenatally to oseltamivir and followed for at least 36 months. This rate is above of expected for the Brazilian population (15%).

In conclusion, it is expected that this work can contribute to a better understanding towards the potential teratogenic effect of Influenza A (H1N1) virus and its treatment with oseltamivir. Future studies will be decisive to the establishment of clinical practices about treatment and general management of this condition in this specific group of patients.

1. INTRODUÇÃO

O surgimento de um novo subtipo do vírus influenza no final de março de 2009, chamou a atenção da comunidade médica internacional, da mídia e da população em geral. A epidemia de influenza A (H1N1) teve início no México, e expandiu-se rapidamente para países do mundo inteiro (*Morbidity and Mortality Weekly Report* - MMWR, 2009a; *World Health Organization* - WHO, 2009a), sendo declarada pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente dois meses após o aparecimento dos primeiros casos (WHO, 2009b). No Brasil, foi declarada transmissão sustentada em meados de julho de 2009. Até a primeira semana de agosto de 2009, foram notificados no Brasil 1586 casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) devido ao novo vírus, com confirmação laboratorial, dos quais 192 (12%) evoluíram para óbito. No Rio Grande do Sul, foram confirmados 204 casos somente na 31ª semana epidemiológica de 2009, com uma letalidade de 23% e mortalidade de 0,4 por 100 mil habitantes (Ministério da Saúde, 2009). O único tratamento específico conhecido, respaldado por evidências recentes, é o uso de inibidores da neuraminidase, zanamivir e oseltamivir, dos quais apenas o último está disponível no Brasil.

As gestantes são consideradas um grupo de risco para complicações graves relacionadas ao vírus influenza H1N1. Os estudos a respeito das consequências para a gestação e para o feto, tanto da gripe quanto do seu tratamento ou vacinação ainda são pouco conhecidos.

1.1. O Vírus Influenza e a Pandemia

Influenza é o paradigma de uma doença viral na qual a evolução continuada do vírus é de fundamental importância para as epidemias anuais e pandemias ocasionais da doença em humanos.

Essa evolução continuada é mais proeminente nas glicoproteínas de superfície do vírus Influenza, mas também ocorre em cada um dos oito segmentos de gene que existem no vírus Influenza A e B. A variabilidade resulta do acúmulo de alterações moleculares nos oito segmentos de RNA que podem

ocorrer por diferentes mecanismos incluindo: a) mutações de ponto; b) rearranjo gênico; c) partículas interferentes defeituosas; e d) recombinação do RNA. Cada um desses mecanismos pode contribuir para a evolução do vírus Influenza (Webster et al., 1992).

Os pássaros aquáticos são os reservatórios naturais de todos os subtipos de vírus influenza, mas alguns subtipos foram estabelecidos em outras espécies, como é o caso do H1 e H3 em suínos ou do H3 e H7 em equinos (Webster et al., 1992).

As pandemias por influenza podem ocorrer ao haver um rearranjo entre as glicoproteínas de algum destes subtipos com um vírus humano preexistente, ou por mutações que possibilitem uma transmissão entre humanos (Taubenberger et al., 2001). Tem sido proposto que os suínos podem agir como um hospedeiro intermediário nos quais tais modificações supostamente ocorreram (Scholtissek et al., 1998).

1.1.1. Componentes do Virion

O conhecimento a respeito da biologia molecular dos vírus Influenza foi extensamente revisada por Lamb (1989), Webster et. al (1992) e Medina & García-Sastre (2011) e essa seção apresenta essa revisão de forma sumarizada.

Os vírus Influenza A são membros da família Orthomyxoviridae. São diferenciados dos tipos Influenza B e C na base da identidade dos antígenos proteicos internos maiores, as proteínas nucleoproteína (NP) e matriz (M1).

O virion consiste em uma bicamada lipídica de onde partem espículas de glicoproteína de aproximadamente 16nm de comprimento que podem ser de dois tipos: **hemaglutinina**, predominante, e **neuraminidase**, que ocorre em alguns fragmentos. Dentro do envelope lipídico estão oito segmentos de RNA de cadeia simples, cada um codificando uma ou duas proteínas.

Os oito segmentos de RNA do vírus Influenza A codificam 10 produtos gênicos reconhecidos:

Polimerase PB2: é codificada pelo segmento 1 de RNA, a forma de RNA de migração mais lenta na eletroforese em gel. É um membro do complexo de

proteínas que fornece o RNA viral – dependente da atividade da RNA polimerase. Funciona durante a transcrição inicial do mRNA viral.

Polimerase PB1: é codificada pelo segmento 2 de RNA; funciona no complexo de polimerase de RNA como a proteína responsável pelo alongamento do mRNA viral nascente e também como proteína de alongamento para o molde de RNA e síntese de vRNA. A proteína PB1 localiza-se no núcleo das células infectadas.

Polimerase PA: é codificada pelo segmento 3 de RNA. Também fica localizada no núcleo das células infectadas e é um membro do RNA- dependente do complexo de RNA polimerase junto com PB1 e PB2, mas o seu papel na síntese do RNA viral permanece desconhecido.

Hemaglutinina (HA): é uma proteína de membrana integral e o maior antígeno de superfície do virion do Influenza vírus. É responsável pela ligação dos virions nos receptores das células hospedeiras e pela fusão entre o envelope do virion e a célula hospedeira. HA é codificada pelo segmento 4 de RNA. Ela sofre três tipos de processos pós-traducionais: clivagem proteolítica, glicosilação e acilação de ácidos graxos. A HA sintetizada é clivada para remover a sequência hidrofóbica amino-terminal de 14 a 18 aminoácidos, os quais são a sequência sinalizadora para o transporte para a membrana celular. Cadeias laterais de carboidrato são adicionadas em número e posição que variam conforme a cepa viral. O ácido palmítico é adicionado no resíduo cisteína próximo ao terminal carboxil da HA. A etapa final do processo é a clivagem da HA em duas subunidades, HA1 e HA2 (HA não clivada é chamada HA0) conectadas por ligações dissulfeto. Esta clivagem é acompanhada pela produção de proteases tipo tripsina pelo hospedeiro e é necessário para infectividade já que a fusão da célula viral é mediada pelo amino terminal livre da HA2. A HA totalmente processada consiste, então, de uma HA1 de aproximadamente 324 aminoácidos mais carboidratos variáveis, e de uma HA2 de aproximadamente 222 aminoácidos mais carboidratos variáveis mais três resíduos palmitato.

As moléculas de HA formam homotrímeros durante a maturação. A estrutura tridimensional de um trímero completo de HA já foi determinada. Cada molécula de HA consiste de uma cabeça globular em uma haste. A cabeça é

formada exclusivamente de HA1 e contém a cavidade de ligação ao receptor bem como a maioria dos sítios antigênicos da molécula. A haste consiste de toda a HA2 e parte da HA1. A região carboxi-terminal da HA2 contém a sequência transmembrana hidrofóbica e a sequência âncora citoplasmática terminal onde o palmitato é anexado.

Devido à atividade da polimerase RNA viral propensa a erros, a HA do Influenza vírus está sujeita a uma alta taxa de mutações, estimada em aproximadamente uma substituição de base no gene HA por geração de vírus. A seleção pelas substituições de aminoácidos é dirigida, ao menos em parte, pela pressão imune, já que a HA é o alvo principal da resposta imune do hospedeiro. Embora os aminoácidos que constituem o sítio de ligação ao receptor, bem como os resíduos de cisteína e a maioria dos resíduos de prolina, sejam altamente conservados, o restante da molécula de HA é altamente mutável. Na natureza estão presentes 16 reconhecidos subtipos de HA (chamados H1, H2, etc.), os quais diferem em pelo menos 30% da sequência de aminoácidos da HA1 e os quais são sorologicamente sem reação cruzada. Os subtipos podem incluir diversas cepas variantes que apresentam reação sorológica cruzada parcial.

Nucleoproteína (NP): é codificada pelo segmento 5 de RNA. É transportada para dentro do núcleo da célula infectada onde liga o RNA viral. Além desse papel estrutural, acredita-se que a NP desempenhe um papel na mudança da atividade da RNA polimerase viral de síntese de mRNA para síntese de cRNA e vRNA. A NP é abundantemente sintetizada nas células infectadas e é a segunda proteína mais abundante no virion do Influenza vírus. Ela é fosforilada; o padrão de fosforilação é dependente da célula hospedeira e pode estar relacionada à restrição viral a uma variedade de hospedeiros. A NP é também um alvo principal da resposta imune citotóxica de células T do hospedeiro.

Neuraminidase (NA): codificada pelo segmento 6 de RNA, é também uma glicoproteína integral de membrana e o segundo maior antígeno de superfície do virion. A NA cliva o ácido siálico terminal das glicoproteínas ou glicolípídios. Assim, ela funciona para livrar partículas de vírus dos receptores das células hospedeiras, para permitir aos virions descendentes escapar das células das quais se originam e então facilitar a propagação viral.

A NA é glicosilada e possui uma sequência hidrofóbica amino-terminal que funciona tanto como um sinal para transporte à membrana celular e como um domínio transmembrana. A distribuição da NA não tem sido conclusivamente esclarecida; mas experimentos imunológicos sugerem que os tetrâmeros de NA não estão distribuídos sobre todo o envelope do virion, como a HA, mas agregados em alguns trechos.

Assim como a HA, a NA é altamente mutável com seleção variante parcialmente em resposta à pressão imune do hospedeiro. Nove subtipos de NA (chamados N1, N2, etc.) tem sido identificados na natureza; eles não têm reação cruzada sorológica. Diferentes variantes de diversos subtipos são conhecidos.

Proteína M1: o segmento 7 de RNA do Influenza vírus codifica as proteínas M1 e M2. A M1 é a proteína mais abundante no virion Influenza. Na célula infectada está presente tanto no citoplasma quanto no núcleo. Não apresenta atividade enzimática conhecida, embora tenha sido especulado um importante papel no início da montagem dos produtos virais.

Proteína M2: é derivada do transcrito colinear (M1) por *splicing*. M2 é uma proteína integral de membrana, cujo domínio que abrange a membrana também serve como um sinalizador de transporte à superfície celular. Está presente como um tetrâmero em grande quantidade na superfície da célula infectada, e uma pequena quantidade é encontrada no virion. Acredita-se que sua ação seja como um canal de prótons para controlar o pH do Golgi durante a síntese de HA e permitir acidificação no interior do virion durante o desencapsulamento viral.

Proteínas não estruturais NS1 e NS2: o segmento 8 de RNA codifica essas duas proteínas não estruturais. O mRNA da NS1 é colinear com o vRNA, enquanto o mRNA da NS2 é derivado por *splicing*. Essas proteínas, particularmente NS1, são abundantes na célula infectada (NS1 primariamente no núcleo, e NS2 no citoplasma), mas não são incorporadas nos virions descendentes. Ambas as proteínas apresentam um papel ainda não bem definido na replicação viral.

Os componentes do virion do vírus Influenza estão representados na Figura 1.

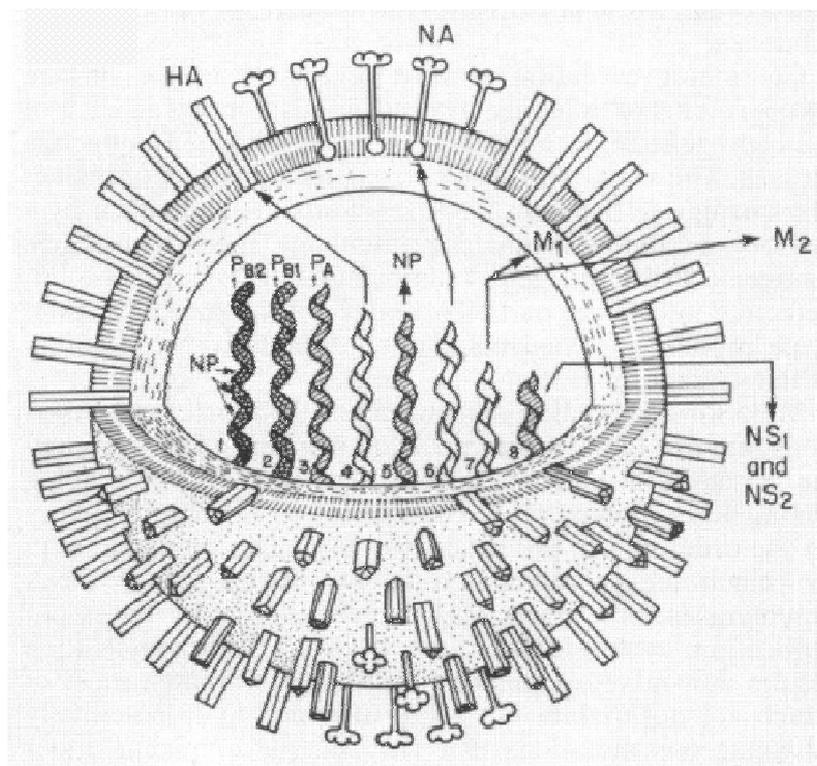


Figura 1: Componentes do virion do vírus Influenza. Diagrama do virion – as pontas de glicoproteínas têm aproximadamente 16nm de comprimento e são de dois tipos: a hemaglutinina (HA), predominante, e a neuraminidase (NA), que ocorre em ilhas. Dentro da bicamada lipídica estão os oito segmentos de RNA fita simples e cada um codifica uma (ou duas) proteínas.

Adaptado de Webster et al., 1992.

1.1.2. Ciclo de Replicação do Vírus Influenza

Uma partícula do vírus Influenza com HA ativada por clivagem liga-se às células pela interação entre o sítio da HA que se liga ao receptor e o ácido siálico terminal do glicolípido ou glicoproteína da superfície celular do receptor. As proteínas HA preferencialmente reconhecem o ácido siálico ligado à galactose por uma ligação $\alpha 2,6$ (Sia $\alpha 2,6$ Gal) que é predominante nas células epiteliais no trato respiratório superior humano. Em contraste, proteínas HA de vírus aviários preferencialmente ligam-se à Sia $\alpha 2,3$ Gal, que é predominantemente encontrada nas células epiteliais do intestino de patos (onde o vírus influenza aviário replica-se). Essas diferenças na especificidade do receptor de HA são um determinante crítico da variedade de hospedeiros para o Influenza vírus (Matsuoka et al., 2013).

Após a ligação, o virion anexado é endocitado pela célula. O pH baixo da vesícula endocítica induz uma alteração conformacional na HA clivada que facilita a inserção dos amino terminais livres hidrofóbicos da HA2 para dentro da membrana vesicular, iniciando a fusão das membranas vesiculares e virais. A fusão libera os conteúdos do virion dentro do citoplasma da célula.

Os nucleocapsídeos do vírus migram para dentro do núcleo da célula hospedeira e seus complexos de polimerase associados iniciam a transcrição primária do mRNA. Os transcritos primários são usados para tradução de proteínas virais, as quais no estágio inicial da infecção são predominantemente NP e NS1. A tradução dos mRNAs do hospedeiro é bloqueada. As recém sintetizadas NP e NS1 migram ao núcleo. Acredita-se que a concentração aumentada de NP livre inicia o desvio da síntese de mRNA para síntese de cRNA e vRNA pelo genoma viral infectante. Os novos vRNA sintetizados são encapsulados em NP dentro do núcleo e funcionam como modelos para transcrição secundária de mRNAs virais. Na continuidade da infecção, os principais produtos traduzidos são as proteínas M1, HA e NA. As proteínas HA e NA são processadas pós-traducionalmente e transportadas à superfície celular, onde são integradas na membrana celular.

Evidências sugerem que o acúmulo de proteína M1 no núcleo é associado com a migração de nucleocapsídeos para fora do núcleo para montagem de partículas virais descendentes no citoplasma. Geralmente, um centro viral de nucleocapsídeos torna-se envolto em uma concha de proteína M1 e brota para fora através da membrana celular, cercado a si mesmo dentro de uma bolha de membrana como o seu próprio envelope, completo com as glicoproteínas de superfície viral. Interações entre M1 e os domínios citoplasmáticos de HA, NA ou M2 tem sido propostos como sinais para o brotamento. A atividade da NA dos virions descendentes libera-os para a célula hospedeira (Medina & García-Sastre, 2011; Matsuoka et al., 2013).

A etapa final na maturação viral é extracelular; esta é a clivagem de HA0 em HA1 e HA2 pelas proteases do hospedeiro. A HA clivada é relativamente instável em pH baixo; então, com os vírus Influenza aviários, que são transmitidos primariamente por via fecal-oral, a clivagem provavelmente ocorre após os virions

excretados ter entrado em seu novo hospedeiro e ultrapassado o estômago. As HAs dos vírus Influenza aviários altamente virulentos são provavelmente clivados intracelularmente. As HAs dos vírus Influenza de mamíferos são provavelmente clivados por proteases extracelulares do trato respiratório tanto no original quanto no novo hospedeiro.

1.1.3. Pandemias de Influenza

Ao longo do século XX, houve quatro grandes pandemias de Influenza: a pandemia de 1918-1919, conhecida como gripe espanhola, provocada pelo vírus influenza A subtipo H1N1, com estimativa do número de mortes acima de vinte milhões de pessoas; a pandemia de 1957-1958, conhecida como gripe asiática, causada pelo vírus influenza A subtipo H2N2; a pandemia de 1968, conhecida como gripe de Hong Kong, provocada pelo vírus influenza A subtipo H3N2; e a pandemia de 1977, conhecida como gripe russa, provocada também pelo vírus influenza A subtipo H1N1 (Kilbourne, 2006).

Quando um vírus influenza A subtipo H5N1 de origem aviária começou a comprometer pessoas em países asiáticos no ano de 2003, acreditou-se que este seria o agente da nova pandemia. No entanto, o vírus limitou-se a ser transmitido de aves para humanos e não foi descrita nenhuma transmissão inter-humana (Kilbourne, 2006; Medina & García-Sastre, 2011).

As características das pandemias de Influenza ocorridas no século XX estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: pandemias de Influenza ocorridas no século XX.

Pandemia	Gripe espanhola	Gripe asiática	Gripe de Hong Kong	Gripe Russa
Cepa do vírus Influenza	A (H1N1)	A (H2N2)	A (H3N2)	A (H1N1)
Ano	1918-1919	1957-1958	1968-1969	1977
Origem provável	Não conhecida (primeiros casos na Europa e EUA)	China	China	China
Mortes estimadas globalmente	20-40 milhões	1 milhão	1-4 milhões	Não conhecido

Adaptado de Kilbourne et al., 2006.

1.1.4. Sistema de Classificação de Infecções

A OMS desenvolveu um sistema de classificação das infecções de caráter epidêmico em fases sequenciais, sendo que nem todas as infecções evoluem para todas as fases (Tabela 2).

A Fase 1 de alerta pandêmico é definida pela existência de um vírus de circulação predominante entre os animais, sem registro de causar infecção em humanos. Na Fase 2, é referida a infecção em humanos por um vírus circulante entre animais domésticos ou selvagens, sendo então considerada como uma cepa potencialmente pandêmica. Na Fase 3, um vírus Influenza animal ou recombinante animal/humano, desencadeia casos esporádicos ou pequenos surtos da doença em humanos, mas sem haver transmissão comunitária. A Fase 4 é caracterizada pela transmissão de humanos para humanos de um vírus animal ou recombinante animal/humano capaz de provocar a transmissão sustentada na comunidade. Essa habilidade denota um significativo aumento no risco de ocorrência de uma pandemia, mas ainda não significa que haja uma pandemia. A Fase 5 é caracterizada pela transmissão entre humanos difundida em pelo menos dois países. A declaração dessa fase é um forte indício de que uma pandemia é eminente e que o tempo para organizar, comunicar e

implementar as medidas de um plano de mitigação é curto. A última fase, a Fase 6, é caracterizada pela transmissão comunitária em mais de dois países de diferentes regiões mundiais. A designação desta fase irá indicar que uma pandemia global está prestes a ocorrer. Quando a atividade pandêmica começar a decrescer em relação aos níveis mundiais, é definido o Período Pós-Pico. Entretanto, é incerto que novas ondas poderão ocorrer, e, portanto, os países deverão preparar-se para a possibilidade de uma segunda onda pandêmica, cuja gravidade não pode ser prevista em relação ao primeiro episódio. O término da pandemia é designado como Período Pós-Pandêmico. A partir deste momento, os níveis de atividade da doença influenza retornam aos observados na influenza sazonal (Sullivan et al, 2010).

Tabela 2: Fases de alerta e risco de pandemia.

Fase de Alerta	Definição	Previsão de Pandemia
1	Ausência de doença no ser humano por vírus que circula entre animais.	Incerta
2	Doença no ser humano provocada por vírus Influenza que circula em animais selvagens ou domésticos, capaz de provocar pandemia.	Incerta
3	Doença esporádica ou em pequenos surtos, sem evidência de transmissão inter-humana suficiente para manter surtos, risco potencial de pandemia.	Incerta
4	Pequeno (s) foco (s) de transmissão inter-humana com localização limitada, com risco potencial de provocar pandemia.	Média
5	Maior expansão inter-humana, restrita a dois ou mais países de uma região do planeta, com risco de provocar pandemia.	Alta

Tabela 2: Fases de alerta e risco de pandemia. (continuação)

6	Transmissão inter-humana sustentada e atingindo mais de duas regiões mundiais.	Pandemia em andamento
Pós-Pandêmica	Nível em que a transmissão inter-humana retorna aos níveis vistos para a infecção pelo vírus Influenza Sazonal em muitos países que possuem vigilância epidemiológica.	

Fonte: Bercini et al., 2011.

1.1.5. Surgimento do vírus H1N1 da pandemia de 2009

Os Influenza vírus similares à pandemia de 1918 se estabeleceram em suínos domésticos entre 1918 e 1920; essa linhagem é referida como a linhagem suína clássica. Em 1979, um vírus H1N1 distinto, “tipo-aviário” da Eurásia, surgiu em suínos europeus e, desde então, co-circularam com o H1N1 suíno clássico. Vírus Influenza de origem suína triplo-recombinante de diferentes cepas H1 e de outros subtipos (por exemplo, H3N2 e H1N2) emergiram e tornaram-se predominantes entre os rebanhos suínos norte-americanos na década de 1990. Todos esses vírus forneceram o *pool* genético para a gênese do vírus H1N1 pandêmico de 2009, possivelmente devido a novos rearranjos em suínos (Medina & García-Sastre, 2011).

Assim, o vírus H1N1 da pandemia de 2009 é composto dos segmentos PB2 e PA dos vírus aviários norte-americanos; do segmento PB1 do vírus humano H3N2; segmentos HA (do subtipo H1), NP e NS derivados do vírus H1N1 suíno clássico; e segmentos NA (do subtipo N1) e M dos vírus suínos “tipo-aviários” da Eurásia. O sequenciamento e análises antigênicas do vírus pandêmico de 2009 mostram que há semelhanças entre a HA desse vírus e aquela de 1918 e de vírus H1N1 humanos que circularam em algum momento entre 1918 e 1950 (Medina & García-Sastre, 2011).

Esse tipo de influenza não havia sido reconhecido anteriormente em suínos ou humanos, representando um rearranjo quádruplo entre duas cepas suínas,

uma humana e uma aviária (Dawood et al., 2009; Garten et al., 2009; Trifonov et al., 2009; Neumann et al., 2009). Sua composição é na grande maioria de cepas suínas (30,6% de suínos da América do norte e 17,5% da Europa e Ásia), e em menor quantidade, 34,4% e 17,5% respectivamente, de aves norte americanas e de humanos (Kohen, 2009; Smith et al., 2009).

Em suma, o atual vírus influenza A H1N1 é produto de vários rearranjos genéticos entre cepas dos vírus influenza previamente circulantes, alguns destes exclusivos de suínos ou de aves, e que se tornam capazes de infectar humanos. A grande tendência do vírus Influenza a modificações em sua estrutura possibilita que formas novas, como a atual, causem surtos da doença ou até mesmo pandemias. Entretanto, não existem, até o momento, evidências moleculares de uma maior transmissibilidade ou virulência nesta nova forma (Garten et al., 2009).

1.1.6. Vigilância Epidemiológica da Influenza no Rio Grande do Sul

A vigilância epidemiológica no Estado do Rio Grande do Sul, com foco no vírus Influenza, tem sido extensamente revisada por Bercini et al. (2011), em conjunto com a equipe do Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS) e essa seção apresenta essa revisão de forma sumarizada.

No Rio Grande do Sul, a vigilância da Influenza iniciou sua estruturação no começo de 2000, baseada em três unidades-sentinela e na investigação da Síndrome Gripal. Com a questão da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) e da ameaça do vírus da Influenza Aviária A (H5N1), a preparação para o enfrentamento de uma possível pandemia ganhou impulso e se materializou no Plano Estadual de Enfrentamento da Influenza, finalizado em 2006.

A importância da Influenza como questão de Saúde Pública cresceu após 2009, quando se registrou a primeira pandemia do século XXI. O Rio Grande do Sul, assim como outros estados das regiões sul e sudeste do Brasil, foi bastante afetado pelo evento, o que representou carga adicional aos serviços de saúde.

Apesar de se configurar como uma situação de crise para o Sistema Único de Saúde (SUS), a pandemia trouxe ganhos importantes para o enfrentamento da Influenza, tais como o aumento da capacidade de detecção dos vírus,

implantação do diagnóstico laboratorial específico, implementação da vigilância e integração vigilância/assistência.

A vigilância epidemiológica do vírus Influenza implantada nas cinco regiões do país tem como objetivos: identificar e monitorar a propagação de variantes antigênicas do vírus Influenza; subsidiar a composição da vacina por meio da identificação e seleção de cepas emergentes; monitorar epidemiologicamente a doença com vigilância contínua; detectar, de maneira adequada e oportuna, situações inusitadas (surtos, epidemias e pandemias).

O trabalho da vigilância epidemiológica resulta na análise dos casos notificados e confirmados de Influenza A (H1N1) por semana epidemiológica de início dos sintomas, no Rio Grande do Sul, no ano de 2009 e anos subsequentes (Figura 2).

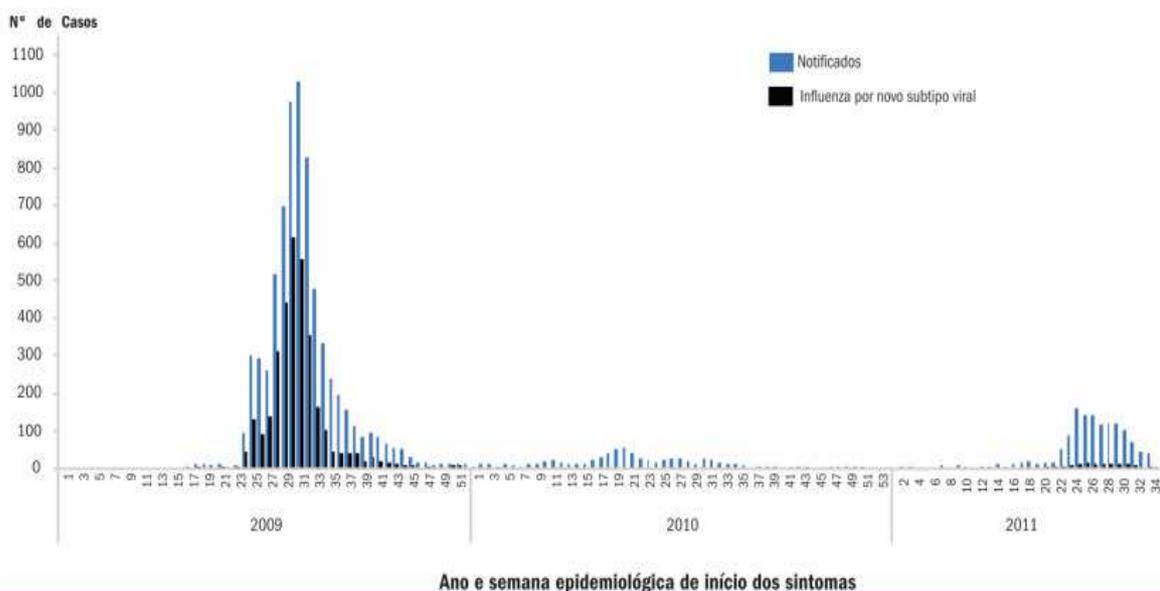


Figura 2: Distribuição dos casos notificados e confirmados de Influenza por novo subtipo viral (Influenza A H1N1 (2009)) por semana epidemiológica de início dos sintomas, RS, 2009, 2010 e 2011.

Fonte: Bercini et al., 2011.

1.2. Infectividade

O período de incubação para a influenza A H1N1 ainda não está claramente definido, mas pode variar de 1 a 7 dias e, mais provavelmente, de 1 a 4 dias (*Centers for Disease Control and Prevention - CDC, 2009a*).

O período de contágio ocorre desde o primeiro dia antes dos sinais e sintomas até a resolução da febre (*CDC, 2009b*). Entretanto, como o período não está ainda bem definido, os indivíduos devem ser considerados infectantes até 7 dias depois do começo dos sintomas.

Períodos maiores podem ocorrer em crianças, idosos, pacientes com doenças crônicas e imunocomprometidos. Existe a expectativa de que o tratamento precoce possa reduzir a infectividade do vírus em até 80% (*Halloran et al., 2007*).

1.3. Quadro Clínico

Os sinais e sintomas da influenza A H1N1 são similares aos causados pelas influências sazonais (*CDC, 2009c*), e a gravidade da doença parece ser menor do que a da pandemia de 1918 (*Fraser et al., 2009*).

Os achados mais frequentes são: febre, tosse, irritação na garganta, mal-estar e dor de cabeça. Vômitos e diarreia são frequentes, mas são incomuns na influenza sazonal. Outros sintomas comuns são: calafrios, mialgias e artralgias. Entretanto, a apresentação dos quadros pode variar desde uma síndrome gripal até um resfriado comum (*CDC, 2009c; Dawood et al., 2009; WHO, 2009c*).

O quadro clínico pode se apresentar de modo diferente de acordo com a faixa etária, visto que crianças pequenas têm menor probabilidade de ter sintomas bem definidos, podendo apresentar febre e letargia, ou até nenhum sintoma respiratório. Em bebês e crianças pequenas, os preditores de doença grave são: apneia, taquipneia, cianose, desidratação, irritabilidade e alteração da consciência (*CDC, 2009d*) (Quadro 1).

Em adultos, os fatores de risco mais associados a complicações da influenza A H1N1 têm sido, em ordem decrescente, doença pulmonar (37%), pessoas em imunossupressão, com doenças cardíacas ou grávidas (17% de complicação, cada) e diabéticos e obesos (13%) (*MMWR, 2009b*).

Os idosos, mesmo sendo considerado um grupo de risco para complicações, parecem ter uma menor chance de contrair a doença, atribuível a certa imunidade em decorrência de um vírus semelhante que circulou antes de 1957 (CDC, 2009e). Um estudo documentou que, aproximadamente, 33% dos indivíduos com mais de 60 anos têm anticorpos suficientes para reduzir em até 50% o risco de infecção pelo novo vírus (MMWR, 2009c).

O quadro clínico pode ou não ser acompanhado de alterações laboratoriais como leucocitose, leucopenia ou neutrofilia. Do ponto de vista radiológico, pode ocorrer infiltrado intersticial localizado ou difuso ou presença de área de consolidação (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2009).

QUADRO 1: Definição de caso de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG)

Indivíduo de qualquer idade com doença respiratória aguda caracterizada por febre superior a 38°C, tosse e dispneia, acompanhada ou não de manifestações gastrointestinais ou dos sinais e sintomas abaixo:

- a) Aumento da frequência respiratória (> 25 IRPM - Incursões Respiratórias por Minuto);
- b) Hipotensão em relação à pressão arterial habitual do paciente;
- c) Em crianças, além dos itens acima, observar também: batimentos de asa de nariz, cianose, tiragem intercostal, desidratação e inapetência.

1.4. Complicações

Aproximadamente 2% a 5% dos casos no Canadá e EUA apresentaram complicações com necessidade de hospitalização. Esse dado é variável, tendo atingido taxas maiores (6%) no México (WHO, 2009c; MMWR, 2009b; MMWR, 2009d). As causas mais comuns de internação foram pneumonia e desidratação (MMWR, 2009b).

As taxas de morbidade e mortalidade são particularmente altas em indivíduos com certas condições médicas de alto risco, incluindo adultos e crianças com condições cardiovasculares (ex: insuficiência cardíaca), pulmonares (ex: asma), doença metabólica crônica (ex: diabetes *mellitus*), disfunção renal, hemoglobinopatias, imunodeficiências (ex: AIDS) e doenças neurológicas que

comprometem a eliminação de secreções respiratórias. Também são mais graves e com maior mortalidade em mulheres no segundo e terceiro trimestres de gestação e crianças com idade inferior a dois anos (Treanor, 2010).

No Brasil, o fator de risco mais associado com a ocorrência de óbito foi cardiopatia (9%), seguido de doença metabólica (8%) e doença respiratória (7%) (Ministério da Saúde, 2009).

No Rio Grande do Sul, a Secretaria Estadual de Saúde (SES) contabilizou somente na fase inicial da pandemia, até o dia 14 de agosto de 2009, 70 óbitos de etiologia confirmada (SES-RS, 2009a-n). Análise dos casos demonstrou equivalência entre os sexos e média de idade de aproximadamente 39 anos (entre os adultos). Vinte e duas vítimas (37,29%) não apresentavam nenhuma comorbidade. A condição mais associada foi a gestação, em 5 das atingidas (17,24% das mulheres). Outras doenças relatadas em mais de uma vítima foram pneumopatia, cardiopatia, HAS, diabete mellitus, obesidade, pós-parto e síndrome de Down. Cinco das vítimas fatais no RS eram crianças, com idade entre 1 mês e 12 anos. Apenas uma das vítimas era previamente hígida. Duas crianças apresentavam pneumopatia, uma apresentava síndrome de Down e outra, doença neurológica.

As complicações decorrentes do vírus influenza A (H1N1) são provavelmente semelhantes às causadas pela influenza sazonal, tais como:

- Exacerbação de doença crônica subjacente;
- Doença de vias aéreas superiores (sinusite, otite média, crupe);
- Doença de vias aéreas inferiores (pneumonia, bronquiolite, estado asmático);
- Cardíacas (miocardite, pericardite);
- Neurológicas (encefalopatia aguda e pós-infecciosa, encefalite, convulsões febris, estado epiléptico);
- Síndrome do choque tóxico;
- Pneumonia bacteriana secundária com ou sem sepse.

A maioria dos países membros da OMS foi atingido pela pandemia de 2009, com alta taxa de complicações e mortalidade, como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Taxa de mortalidade e distribuição do total de óbitos por Influenza A (H1N1) confirmados laboratorialmente por região administrativa da OMS, 2009.

Regiões da OMS	Nº países	População (milhões)	Taxa de mortalidade (10.000 hab.)	Óbitos (nº)	Óbitos (%)
América	35	894.944	76,9	6.880	53,8
Europa	53	887.456	28,8	2.554	20,0
Sudeste asiático	11	1.721.048	6,8	1.165	9,1
Pacífico ocidental	27	1.763.400	7,7	1.361	10,6
Mediterrâneo oriental	21	540.283	13,1	708	5,5
África	46	772.791	1,7	131	1,0
Mundo	193	6.580.923	19,4	12.799	100

Fonte: Bercini et al., 2011.

1.5. Influenza A (H1N1) em gestantes

Observando-se as pandemias e epidemias anteriores, e até mesmo a influenza sazonal, identificam-se as gestantes como grupo de risco, apresentando maior morbidade e mortalidade. Durante a epidemia de 1957-58, 10% das mortes por influenza em Nova Iorque (EUA) ocorreram em gestantes e, em Minnessota (EUA), 50% das mortes de mulheres em idade fértil ocorreram durante a gestação (Greenberg et al., 1958; Freeman et al., 1959).

Na pandemia por influenza A (H1N1) de 2009, as gestantes estavam entre os primeiros casos e primeiros óbitos notificados, representando 13% da mortalidade reportada aos centros de controle e prevenção de doenças dos EUA (Jamieson et al., 2009). Portanto, a gestação é considerada um fator de risco para as complicações graves relacionadas à infecção por Influenza A (H1N1).

A suscetibilidade da gestante às infecções virais reside no fato de a gestação estar associada com um desvio imunológico da imunidade mediada por células para a imunidade humoral. Essa alteração fisiológica é necessária para a tolerância à porção paterna dos antígenos fetais, mas causa à gestante uma maior vulnerabilidade aos patógenos intracelulares, como os vírus (Jamieson et al., 2006; Raj et al., 2014).

A progesterona e os glicocorticoides, os quais aumentam durante a gestação, podem ter um efeito anti-inflamatório. Isso também poderia explicar o aumento na gravidade de infecções como a Influenza, que requer pronta resposta inflamatória para iniciar a limpeza e controle dos patógenos (Raj et al., 2014).

Durante a gestação, há diversos sistemas protegendo o feto. Esses sistemas incluem defesas mecânicas (fluido amniótico, membranas fetais, a placenta e a decídua materna) e defesas imunológicas (incluindo os sistemas humoral e complemento, e a imunidade celular). O vírus Influenza tem sido isolado da placenta e do líquido amniótico tanto em casos fatais quanto não fatais, embora infecção direta ao feto tenha sido raramente reportada. Placentite induzida por Influenza tem sido caracterizada por hiperplasia e degeneração de células amnióticas, trofoblastos placentários, células deciduais e células endoteliais vasculares. Os antígenos virais podem ser detectados em células afetadas e em infiltrados de células linfoides. A decídua humana parece fornecer um ambiente mais favorável para a replicação viral do que os tecidos placentários. Estudos sugerem que o vírus Influenza é capaz de se espalhar a partir da corrente sanguínea à decídua materna para se replicar dentro do tecido e então infectar o corion e o âmnio fetais. Outros estudos têm sugerido que a infecção e replicação viral tem um efeito citopático direto pela indução da apoptose em células coriônicas, um processo que pode contribuir para as perdas gestacionais associadas à Influenza (Jamieson et al., 2006; Raj et al., 2014).

Em gestantes, o quadro clínico costuma ser o mesmo que o apresentado pela população adulta em geral. Um estudo (Lim et al., 2010) descreveu as características das gestantes infectadas com o vírus influenza A H1N1 atendidas em um hospital terciário asiático cujos principais sintomas apresentados foram febre, tosse, rinorreia, dor de garganta, cefaleia, mialgias e dispneia. Ainda que o

quadro clínico em gestantes seja semelhante ao da população geral, é reconhecido que a infecção adquirida no terceiro trimestre, início tardio do tratamento antiviral e a presença de comorbidades são fatores de alto risco para o desenvolvimento de um quadro clínico grave (Singhal et al., 2014).

No Brasil, somente até agosto de 2009, quando foi publicado o primeiro informe do Ministério da Saúde com dados a respeito da pandemia de Influenza, das 135 gestantes com casos confirmados, 21% evoluíram para óbito (Ministério da Saúde, 2009).

No total, durante a pandemia de Influenza A (H1N1) de 2009, houve 44.544 casos confirmados no Brasil e 2.051 mortes relatadas. No Rio Grande do Sul, houve 8.314 casos notificados, 3.576 casos confirmados (8% do total de casos do país), e 297 mortes (14,5% das mortes nacionais). Quanto às gestantes, houve 589 casos notificados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN – Influenza, base de dados do Rio Grande do Sul), dos quais 24 resultaram em óbito (Yokota et al., 2011; Bercini et al., 2011). (Figura 3)

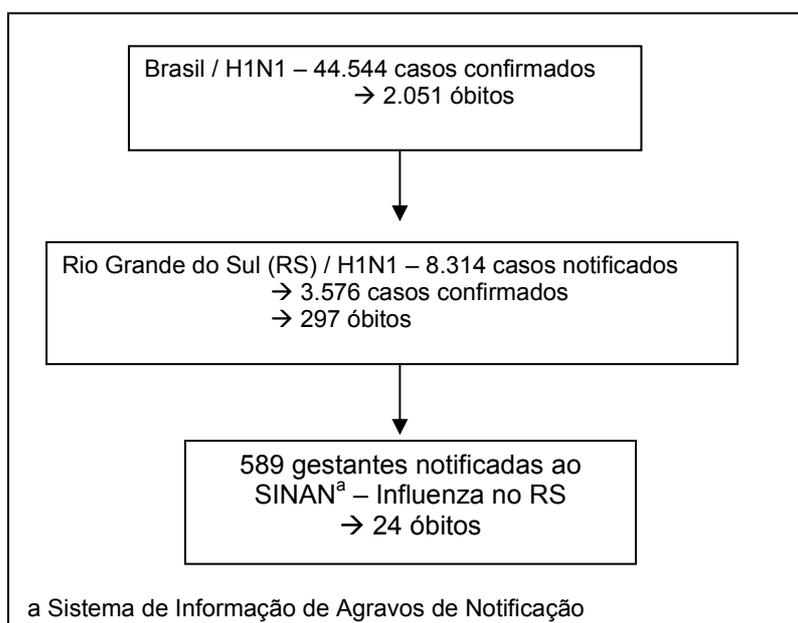


Figura 3: casos notificados e confirmados de H1N1 na pandemia de 2009, RS e Brasil.

Quanto aos efeitos sobre o embrião-feto, os estudos a respeito do potencial teratogênico do vírus influenza ainda são limitados. A literatura não demonstrou, até o momento, efeitos desse vírus sobre o embrião-feto. No entanto, ainda são poucos os dados específicos relativos à teratogenicidade do vírus influenza A (H1N1) (Raj et al., 2014).

É sugerido um aumento potencial no risco de defeitos de fechamento de tubo neural relacionado à hipertermia materna (Tanaka et al., 2009). Nesse contexto, um estudo (Lim et al., 2010) demonstrou que a taxa de admissão hospitalar de gestantes infectadas apresentou aumento linear associada à temperatura corporal, subindo quase duas vezes para cada 1°C aumentado.

Análises dos efeitos da Influenza A H1N1 nas gestações durante a pandemia de 2009 focaram primariamente na morbidade e mortalidade maternas, em parte devido ao imediatismo com que as primeiras séries de casos foram publicadas (Pierce et al., 2011). Alguns desses estudos confirmaram os piores desfechos em mulheres gestantes infectadas com o vírus Influenza A H1N1 e comprovaram os benefícios da vacinação e adequado tratamento dessa condição (Haberg et al., 2013; Pasternak et al., 2012; Rojas-Suarez et al., 2014).

Entre os estudos realizados a respeito dessa pandemia, alguns poucos se dedicaram também a explorar os desfechos das gestações e as informações sobre os recém-nascidos. Os estudos de maior impacto na literatura médica estão sumariamente descritos na Tabela 4.

Na América do Sul, somente um estudo brasileiro, conduzido com 57 mulheres hospitalizadas, mostrou as características clínicas e os desfechos gestacionais de mulheres infectadas com Influenza A (H1N1) durante a pandemia de 2009 (Jiménez et al., 2010).

Estudos de seguimento de longo prazo são necessários para verificar os desfechos gestacionais, bem como para caracterizar plenamente o impacto na mortalidade infantil no período perinatal. Estudos de coorte populacional, derivados de dados de certificação de nascimento, podem permitir estimativas de risco mais precisas através de grupos de comparação de base populacional e melhor controle de fatores confundidores (Doyle et al., 2013).

Tabela 4: Estudos prévios de desfechos gestacionais em pacientes expostas ao vírus Influenza A (H1N1) 2009.

Estudo	Nº de gestantes reportadas	Nº e (%) de gestantes infectadas	Desfecho gestacional	Nº	Mortes maternas	Tratamento antiviral
LOUIE et al., 2010 (EUA)	94	32 (34)	Aborto	02	06	81%
ANZIC, 2010 (AUS/NZ)	64	61 (95)	Aborto	02	06	81%
			Natimorto	04		
			Parto prematuro	22		
HEWAGAMA et al., 2010 (AUS)	43	15 (35) 24 (56)	Baixo peso	18	01	77%
			Parto prematuro	06		
			Natimorto / morte neonatal	03		
SISTON et al., 2010 (EUA)	788	169 (21) 200 (25)	Parto prematuro	51	30	84%
			Aborto	08		
CREANGA et al., 2010 (EUA)	62	40 (65)	Parto prematuro	06	02	50%
			Morte neonatal	02		
			Natimorto	02		
DUBAR et al., 2010 (FRA)	314	146 (46)	Perda gestacional (<24 semanas)	04	03	95%
			Parto prematuro	26		
			Baixo peso	22		
GÉRARDIN et al., 2010 (FRA)	271	139 (51)	Parto prematuro	17	-	86%
			Anomalias congênicas	01		
			Natimorto	07		
PIERCE et al., 2011 (RU)	272	256 (94)	Perda gestacional (<24 semanas)	05	-	-
			Parto prematuro	58		
			Anomalias congênicas	08		

Abreviações: EUA = Estados Unidos da América; AUS = Austrália;
 NZ = Nova Zelândia; FRA = França; RU = Reino Unido.

1.5.1. Lactação

Não é totalmente conhecido se o vírus Influenza passa através do leite materno; entretanto, as gotículas respiratórias são, basicamente, os principais modos de transmissão viral. Devido aos já conhecidos benefícios do leite materno para os bebês, recomenda-se a continuidade do aleitamento mesmo nos casos em que a mãe esteja recebendo tratamento antiviral (Tanaka et al., 2009).

1.6. Tratamento

O tratamento da síndrome gripal envolve, na maioria dos casos, uso de fármacos para alívio sintomático (Dolin, 2002; Mossad, 1998). Na prática clínica não é habitual a terapia diretamente ao agente etiológico, geralmente o vírus da influenza (subtipo A ou B), tendo em vista o elevado custo da medicação e a falta de análises de custo-efetividade para seu uso indiscriminado. Além disso, o tratamento antiviral específico é obviamente precedido pelo diagnóstico do vírus influenza. Estes testes são caros e não amplamente disponíveis, tendo, portanto, limitada utilidade.

Nesse contexto, inibidores da neuroaminidase como oseltamivir e zanamivir ocuparam prateleiras em grande número de países, estocados para situações de epidemia, como na ocasião do surto de influenza aviária em 2007 (Abdel-Ghafar et al., 2008). Com a recente instalação da pandemia pelo vírus Influenza A (H1N1), os fármacos antivirais receberam grande atenção, sendo amplamente utilizados nos últimos anos.

A atual recomendação do Ministério de Saúde é de que qualquer paciente portador de SRAG deve receber o medicamento oseltamivir o mais cedo possível, dentro das primeiras 48 horas após o início de sintomas. O fármaco deve ser administrado na dose de 75 mg, duas vezes ao dia, por cinco dias, para adultos. A dosagem deve ser ajustada para crianças e pacientes sondados. No caso de gestantes, o medicamento só deve ser prescrito se os benefícios superarem o risco sob julgamento médico (ANVISA, 2009), uma vez que o prejuízo ao feto não é bem definido (Tanaka et al., 2009).

Casos de SRAG podem ser submetidos à avaliação clínica minuciosa, coleta de secreções nasofaríngeas e sangue até o 7º dia de doença e, se

possível, internados (ANVISA, 2009). A confirmação laboratorial é tardia, portanto não pode determinar a conduta a ser tomada, uma vez que o tratamento antiviral deve ser iniciado precocemente.

Vacinas de fração viral apresentam boa imunogenicidade, com efetividade de cerca de 80%, sendo a melhor medida para prevenir a Influenza (Red Book, 2006).

1.6.1. Fosfato de oseltamivir

O fosfato de oseltamivir é um pró-fármaco éster etil que não possui atividade antiviral, e que, após metabolização pelo fígado e trato gastrointestinal, é transformado em carboxilato de oseltamivir e assim torna-se seletivo contra o vírus influenza dos tipos A e B. A principal característica do seu modo de ação é a inibição seletiva de neuraminidase, glicoproteína de liberação dos vírions, ou seja, ele impede a saída do vírus de uma célula para outra. O metabólito é eliminado pela via renal, dessa forma, deve-se observar pacientes com insuficiência renal com ajuste de dose. Em idosos a dose não necessita ser ajustada. Em grávidas, o uso do medicamento deve ser feito a critério do médico. Crianças menores de um ano devem ser observadas de 30 a 48 horas.

O Fosfato de oseltamivir pode ser encontrado comercialmente como Tamiflu® (Laboratório Roche) nas apresentações cápsulas de 75 mg ou suspensão oral 30g. Devido às propriedades do metabólito de mínimas ligações às proteínas plasmáticas, as interações medicamentosas para este fármaco são improváveis de acontecer (WHO, 2009d).

1.6.2. Efetividade e Segurança do Oseltamivir

Previamente ao surgimento da pandemia de 2009, fármacos antivirais como oseltamivir eram raramente prescritos no tratamento da influenza, motivo pelo qual informações de farmacovigilância e segurança do medicamento são limitadas e recentes. Wallensten et al. (2009), descreve náusea (31%), cefaleia (24%) e dor abdominal (21%) em crianças usando o medicamento como profilaxia para influenza A (H1N1). Kitching et al. (2009), encontrou eventos adversos gastrointestinais (40%) e neuropsiquiátricos (18%), em circunstâncias semelhantes.

Os efeitos adversos mais frequentes do fosfato de oseltamivir no tratamento de adultos com gripe sazonal são náusea, cefaleia, diarreia, sintomas nasais e tosse, mas sem diferença significativa com relação a placebo (Jefferson et al., 2006). Esses efeitos adversos ocorrem principalmente após a primeira dose do medicamento.

Estudos mais abrangentes realizados com influenza sazonal e pandêmica foram válidos ao determinar modesto benefício do medicamento, mas as análises de eventos adversos permanecem controversas (Shun-Shin et al., 2009; Khazeni et al., 2009). Revisão sistemática demonstrou que em crianças de até 12 anos de idade com diagnóstico clínico, o oseltamivir reduz tempo mediano de resolução da doença em 0,9 dia (IC 95% 0,2 – 1,9) (Shun-Shin et al., 2009). Oseltamivir na dose de 150 mg/dia foi efetivo na prevenção de complicações respiratórias inferiores em casos de influenza sazonal (OR 0,32, IC: 0,18–0,57) (Jefferson et al., 2006). Os trabalhos publicados carecem de poder amostral para detectar efeitos adversos raros, ao passo que a grande maioria dos estudos é financiada pela indústria farmacêutica e com declarado conflito de interesse (Khazeni et al., 2009).

1.6.3. Uso do oseltamivir em gestantes

A utilização do produto em gestantes requer cuidados, uma vez que não existem dados suficientes nessas pacientes para permitir uma avaliação mais adequada quanto ao potencial do medicamento em causar malformações ou toxicidade fetal em humanos. Há poucos dados gerais a respeito da farmacocinética e farmacodinâmica específicas das drogas durante a gestação comparadas com a população geral. Alterações nos processos fisiológicos e metabólicos durante a gestação provavelmente afetam a farmacocinética das drogas e estudos recentes mostram que as doses padrão utilizadas nessa população podem ser incorretas (Reshet'ko OV et. al, 2014).

Como as mulheres grávidas estão incluídas nos grupos de risco de morte com o vírus H1N1, a ANVISA ratificou a informação do Ministério da Saúde de que o medicamento deve ser utilizado apenas se o benefício justificar o risco potencial para o feto. O risco - benefício deverá ser avaliado pelo médico. Além

disso, a Agência recomenda que a gestante deva ter a gravidez monitorada até o nascimento da criança (Ministério da Saúde, 2009).

Existia na literatura, à época da pandemia de 2009, somente um estudo, que utilizou dados de serviços japoneses de informações sobre teratógenos, avaliando 90 gestantes de primeiro trimestre que utilizaram doses terapêuticas de oseltamivir (75 mg, duas vezes ao dia, por 5 dias) cujo único achado foi uma malformação congênita (1,1%), o que se encontra dentro do esperado para malformações maiores na população em geral (Tanaka et al., 2009).

Apenas recentemente uma grande revisão (Wollenhaupt et al., 2014), incluindo mais de 2.000 mulheres expostas ao oseltamivir durante o período gestacional, a maioria durante ou após a pandemia de 2009, apresentou dados de seguimento das gestações. Essa revisão demonstrou efeitos adversos gestacionais (abortos e partos prematuros) em uma taxa menor que na população em geral (com ou sem Influenza).

1.6.4 Uso do oseltamivir em crianças

O Oseltamivir é liberado para uso na profilaxia e tratamento da Influenza em crianças maiores de um ano de idade. Seu uso em crianças abaixo de 12 meses é ainda motivo de preocupação. Informações do próprio fabricante contra-indicam o uso nessa faixa etária, baseado em estudos pré-clínicos realizados em ratos.

Uma única dose de Oseltamivir de 1.000mg/kg (cerca de 250 vezes a dose recomendada em crianças) em ratos com 7 dias de vida resultou em um excesso de mortes associadas com a exposição ao pró-fármaco e ao metabólito ativo do fármaco. A concentração do pró-fármaco em ratos juvenis foi aproximadamente 1500 vezes maior do que a observada em animais adultos, sugerindo que esses efeitos adversos possam estar relacionados à imaturidade da barreira hemato-encefálica ou ao sistema imaturo de conversão do pró-fármaco em metabólito ativo nos animais jovens (Okamoto et al., 2005).

A despeito das informações apresentadas pelo fabricante, o uso desse medicamento em pacientes menores de um ano é realizado particularmente em bebês gravemente doentes ou considerados como de alto risco para

complicações da infecção pelo vírus Influenza. Estudos realizados até então não comprovam associação do uso do Oseltamivir com efeitos neurológicos em crianças menores de um ano de idade. No entanto, o número limitado e o tamanho amostral pequeno desses estudos mantêm a necessidade de melhor avaliação dos efeitos desse fármaco nessa população (Kimberlin et al., 2010).

Capítulo II – Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a gestação é um fator de risco para complicações graves relacionadas ao vírus influenza sazonal e ao vírus A (H1N1). Portanto, é importante acompanhar as gestantes e os seus recém-nascidos para avaliar os efeitos do vírus para a gestação e para o feto.

Em consequência, o tratamento com oseltamivir está indicado a todas as gestantes com manifestações clínicas da doença, mas os estudos conclusivos sobre a segurança desse fármaco quando utilizado durante a gestação ainda são limitados.

Diversos relatos foram descritos reportando os desfechos adversos maternos e neonatais entre gestantes infectadas com H1N1. Muitos desses relatos, no entanto, clamavam por estudos adicionais com maiores amostras de pacientes, comparações robustas entre os grupos, maiores períodos de seguimento e controles para possíveis fatores confundidores.

Em resumo, o esclarecimento dos potenciais riscos tanto da gripe A (H1N1) quanto do seu tratamento com o fármaco oseltamivir pode justificar a terapêutica e a imunização das gestantes e elucidar a relação risco-benefício dessas condutas.

Capítulo III - Objetivos

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar os desfechos das gestações expostas ao vírus H1N1 na pandemia de influenza A de 2009, e submetidas ao tratamento com Fosfato de Oseltamivir, no estado do Rio Grande do Sul.

3.1 Objetivos Específicos

a) Avaliar a frequência de abortos, partos prematuros (antes de 37 semanas), baixo peso ao nascimento (<2.500g) e malformações congênitas nas gestações notificadas.

b) Comparar a frequência de desfechos desfavoráveis em gestantes com infecção confirmada por H1N1 com dados de gestantes infectadas por vírus não-H1N1 do RS no mesmo período.

c) Avaliar os potenciais efeitos adversos da medicação em gestantes expostas ao oseltamivir.

d) Avaliar a saúde e o desenvolvimento neuropsicomotor das crianças expostas durante a gravidez ao oseltamivir.

Capítulo IV – Artigo 1

Impact on Pregnancies in South Brazil from the Influenza A (H1N1) Pandemic: Cohort Study. PLoS One 2014; Feb 18;9(2):e88624

**Impact on Pregnancies in South Brazil from the Influenza A (H1N1)
Pandemic: Cohort Study**

André Anjos da Silva,^{1,2} Tani Maria Schilling Ranieri,³ Fernanda Duarte Torres,¹
Fernanda Sales Luiz Vianna,¹ Graziella Rangel Paniz,¹ Paula Baptista
Sanseverino,¹ Paulo Dornelles Picon,⁴ Pietro Baptista de Azevedo,¹ Marta Haas
Costa,¹ Lavinia Schuler-Faccini,^{1,2} Maria Teresa Vieira Sanseverino.¹

(1) Teratogen Information Service, Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

(2) Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology at the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

(3) Epidemiological Surveillance, Department of Health, Rio Grande do Sul, Brazil

(4) Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Corresponding author:

Lavinia Schuler-Faccini

Genetics Department – Federal University of Rio Grande do Sul

Caixa Postal 15053 – Agencia CAMPUS UFRGS

CEP 91501-970, Porto Alegre – RS

Brazil

ABSTRACT

Introduction The emergence of a new subtype of the influenza virus in 2009 generated interest in the international medical community, the media, and the general population. Pregnant women are considered to be a group at risk of serious complications related to the H1N1 influenza virus. The aim of this study was to evaluate the outcomes and teratogenic effects of pregnancies exposed to the H1N1 virus during the Influenza A epidemic that occurred in the state of Rio Grande do Sul in 2009. **Methods** This is an uncontrolled prospective cohort study of pregnant women with suspected symptoms of Influenza A who were reported in the Information System for Notifiable Diseases – Influenza (SINAN-Influenza) during the epidemic of 2009 (database from the state of Rio Grande do Sul, Brazil). There were 589 cases of pregnant women with suspected infection. Among these, 243 were tested by PCR and included in the analysis. The main outcome measures were: maternal deaths, pregnancy outcome, stillbirths, premature births, low birth weight, congenital malformations, and odds ratios for H1N1+ and non-H1N1 pregnant women. **Results** There were one hundred and sixty-three (67%) confirmed cases of H1N1, 34 cases (14%) of seasonal Influenza A and 46 (19%) who were negative for Influenza A. There was no difference between the three groups in clinical parameters of the disease. There were 24 maternal deaths — 18 of them had H1N1. There were 8 stillbirths — 5 were children of H1N1 infected mothers. There were no differences in perinatal outcomes. **Conclusions** The present data do not indicate an increase in teratogenic risk from exposure to the influenza A (H1N1) virus. These results will help to strengthen the data and clarify the health issues that arose after the pandemic.

Introduction

The emergence of a new subtype of the influenza virus at the end of March 2009 generated interest in the international medical community, the media, and the general population. The influenza A (H1N1) epidemic began in Mexico and rapidly spread to other countries around the world [1] and was declared a pandemic by the World Health Organization (WHO) approximately two months after the first cases appeared [2]. In Brazil, it was declared pandemic in mid-July 2009.

The Influenza A H1N1 virus is the product of multiple genetic rearrangements among strains of influenza that had previously been circulating. Some of these were unique to swine and birds and became capable of infecting humans[3].

Pregnant women are considered to be a group at risk of serious complications related to the H1N1 influenza virus, with high morbidity and mortality observed in both previous [4-6] and recent [7,8] epidemics. Studies of the consequences for pregnancy and the fetus, both for the influenza and its treatment, are also important in the context of public health.

The only known specific treatment, which is supported by recent evidence, is the use of the neuraminidase inhibitors zanamivir and oseltamivir, of which only the latter is available in Brazil.

Rio Grande do Sul is the southernmost state of Brazil. It occupies 3% of the national territory and has a population of 10,914,128 inhabitants (2009), which corresponds to about 6% of the national population. The climate in this state has specific characteristics that are different from the rest of the country. For example, it has the lowest temperatures for the Brazilian winter (humid subtropical climate with average temperatures between 15°C and 18°C) [9].

During the Influenza A (H1N1) pandemic in 2009 there were 44,544 cases confirmed in Brazil and 2,051 deaths recorded. In Rio Grande do Sul, there were 8,314 reported cases, 3,576 confirmed cases (8% of total cases in Brazil), and 297 deaths (14.5% of national deaths)[10,11].

As for effects on the embryo/fetus, there are still few studies on the teratogenic potential of the influenza virus. It has been suggested that there is a

potential increase in the risk of defects in neural tube closure associated with maternal hyperthermia[12]. Few studies focus on the teratogenic effects of this virus on the embryo/fetus[13-17].

Analyses of the effects of Influenza A H1N1 on pregnancies during the pandemic of 2009 have focused primarily on maternal mortality and morbidity, in part due to the immediacy of the pandemic and the speed with which the series of cases were published [15]. The follow-up of women after hospital admission, with a focus on pregnancy outcomes, has now been further investigated[15,16,18]. Some of these studies confirm the worse outcomes in pregnant women infected with H1N1 Influenza virus and proved the benefits of vaccination and treatment for this condition [18,19].

In South America, only one Brazilian study, which was conducted with 57 hospitalized women, has shown the clinical characteristics and pregnancy outcomes of pregnant women infected with Influenza A (H1N1) during the 2009 pandemic [20].

The aim of this study was to evaluate the outcomes, including teratogenic effects, of pregnancies exposed to the H1N1 virus during the Influenza A epidemic that occurred in the state of Rio Grande do Sul in 2009.

Materials and Methods

This is an uncontrolled prospective cohort study that evaluated pregnancies with exposure to the 2009 H1N1 Influenza virus. The sample consisted of pregnant women with suspected symptoms of Influenza A who were reported in the Information System for Notifiable Diseases - Influenza (SINAN-Influenza) during the epidemic of 2009 (database from the state of Rio Grande do Sul).

SINAN is maintained by the reporting and investigation of cases of diseases and conditions that appear on the national list of diseases for which notification is compulsory. Besides the Individual Notification Form (FIN), the system also provides an Individual Investigation Form (FII), which is a research guideline that enables the identification of the source of infection and the mechanisms of disease transmission. Most of the information about the patient and his clinical symptoms are collected at the time of notification [21].

Confirmation of the infection and detection of the viral subtype was done (when possible) through a biological sample (nasopharyngeal swab) in order to perform the real time polymerase chain reaction (RT-PCR), in accordance with the RT-PCR protocol for the detection and characterization of Swine Influenza from the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [22].

Pregnancy follow-up was conducted by a trained team via telephone, between July 2009 and June 1, 2011. If three phone calls were unsuccessful and a visit to a patient's home could not be arranged, a follow-up was considered to be lost. Data from medical records or the Live Birth Certificate (LBC) would then be used to verify the pregnancy outcome data. The LBC is the standard document of the Ministry of Health and its use is mandatory in Brazil. It includes data to be filled in about the mother (age, gravidity), the pregnancy (gestational age), type of delivery, and the newborn child (birth weight, Apgar score, congenital malformations, etc.). The LBC does not include information about pregnancy complications or comorbidities like pregnancy-related hypertension/preeclampsia, gestational diabetes, etc.).

A home visit, when possible, was performed by a team member who used a questionnaire identical to that used in the phone interviews. This follow-up by

personal contact received direct support from the State Center for Health Surveillance (CEVS).

Participants

During the Influenza A H1N1 epidemic in 2009, there were 589 cases of pregnant women suspected of infection that were reported to the SINAN-Influenza database for Rio Grande do Sul.

Patients were excluded from this study if they did not have a confirmed pregnancy, if it was not possible to contact them after notification, or if they did not have a PCR performed.

For data analysis, we included only patients with infection confirmed by PCR laboratory analysis. Follow-ups were done either by phone, home visit, assessment of medical records, or via the LBC information.

Case Ascertainment

An influenza-like illness (ILI) was defined as the presence of at least one of the common flu symptoms (rhinorrhea, conjunctivitis, sore throat, cough, shortness of breath, headache, backache, muscle ache, joint pain, fever, nausea, vomiting, diarrhea, or asthenia), in accordance with the widely used definition, and this was reported to the SINAN-Influenza database.

A confirmed case was defined as an ILI with a positive Influenza A (H1N1) PCR, and is denoted as H1N1+. Non-H1N1 Influenza cases were those that were seasonal Influenza A or that were negative for Influenza A (see Figure 1). Considering that the PCR techniques were specific for H1N1 and seasonal Influenza A, it was not possible to identify other agents among the Influenza A negative subgroup.

Statistical Methods

We evaluated clinical parameters related to the pregnancy (gestational age in the notification, pharmaceutical form of the oseltamivir phosphate used, other medications taken, outcome of pregnancy: miscarriage or birth, and type of birth) and the newborn child (prematurity, low weight, presence of congenital malformations, and neonatal complications). A descriptive analysis was done of

the samples, with means and standard deviations for both the quantitative variables of the clinical parameters and the frequency of the categorical variables. The analyses were done using Fisher's exact test followed by the Z-test with Bonferroni correction, One-way ANOVA, or the Kruskal-Wallis test, as appropriate. The level of significance was set at 5% for all variables and the program used for the analyses was SPSS for Windows, version 18.0.

Ethics Statement

The research was approved by the Research Ethics Committee of the Research and Post-Graduate Group at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (CEP/GPPG-HCPA).

At the beginning of the telephone interview, consent was requested for confirmation of the information available in the records of SINAN-Influenza or for collection of new data, if necessary. Informed consent was conducted verbally, since most of the interviews were conducted via telephone. The patient answered "Yes, I authorize" or "No" to the question "Do you consent to talk by phone with a medical team and provide some data about your flu syndrome episode and your pregnancy?". The same verbal informed consent was applied to cases of personal interviews. All procedures were approved by GPPG and the clinical investigation was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

Results

During the Influenza A H1N1 epidemic in 2009, there were 589 cases of pregnant women suspected of infection who reported to the SINAN-Influenza database for Rio Grande do Sul.

From the follow-ups done, 243 PCR test results were obtained. There were one hundred and sixty three (67%) confirmed cases of Influenza A H1N1, 34 cases (14%) of seasonal Influenza A, and 46 (19%) negative for Influenza A (Figure 1). Contact was made directly in about 40% of cases. The remaining follow-ups were facilitated by medical records or Live Birth Certificates.

The accurate gestational age at the time of infection was obtained in 83 follow-ups. Three women (1.2%) were in the first trimester (0–11 weeks), 27 (11%) were in the second trimester (12–23 weeks) and 53 (21.8%) patients were in the third trimester (≥ 24 weeks).

Use of oseltamivir phosphate was identified in 137 patients (56.3%). Adverse reactions such as vomiting, nausea, abdominal pain, diarrhea, drowsiness, confusion, dizziness, headache, and irritability were reported. There were no serious adverse events in this study population. There was no difference when comparing the three groups in terms of adverse reactions presented. In the analysis of symptoms reported after use of the medication, in comparison with the H1N1+ subgroup only nausea was more frequent in patients without H1N1 confirmed by PCR (OR: 0.36, 95% CI: 0.15–0.86, $p < 0.01$).

Hospitalization was required for 107 of the patients. In the H1N1+ subgroup, 70 (42.9%) patients required hospitalization. The other 37 admissions consisted of 6 (17.6%) in the seasonal Influenza A subgroup and 31 (67.4%) in the Influenza A negative subgroup. The proportion of hospitalizations is significantly different for each group; in other words, there was a predominance of hospitalizations in the Influenza A negative subgroup, followed by the H1N1+ subgroup, and finally the seasonal Influenza A subgroup ($p < 0.05$, see Table 1). Of these 107 patients, 58 (54.2%) were in the third trimester of pregnancy (38 H1N1+).

The clinical parameters are presented in Table 1 and show no differences between the subgroups.

Twenty-four maternal deaths (5.6%) were recorded, 18 of these (75%) were H1N1+ patients. Two deaths were in the seasonal Influenza A subgroup and 2 deaths in the Influenza A negative subgroup (Table 1). The remaining two deaths were recorded for pregnant women for whom a PCR was not done. Only two of these 24 patients were not admitted to the intensive care unit and did not require mechanical ventilation (both were from the H1N1+ subgroup). Fifteen of these women (13 were H1N1+) had received oseltamivir and there was an average of 3.8 days between the onset of symptoms and treatment. Case-fatalities did not differ between the subgroups. The total number of deaths from Influenza (ICD-10 J09 [Influenza due to certain identified influenza viruses], J10 [Influenza due to other identified influenza virus], and J11 [Influenza due to unidentified influenza virus] for women of childbearing age (15–49 years) in 2009 in the state of Rio Grande do Sul was 117. Of these, 97 were attributed to ICD-10 J09 (Influenza due to a certain identified influenza virus). In 2008 and 2010 there were no deaths in this subgroup of women that could be attributed to the ICDs mentioned above. In 2011, there were 4 deaths in this age group (2 due to ICD-10 J09).²¹ These ICDs were used for comparison purposes of the maternal deaths between the years with and without H1N1 pandemic.

Regarding pregnancy outcomes, we obtained 236 live births. Eight stillbirths were reported — five of these were for H1N1+ pregnant women, one was from the seasonal Influenza A subgroup, and the other two were for pregnant women for whom research about the virus was not done. There were three miscarriages — one occurred in the Influenza A negative subgroup and two in pregnant women without PCR, so there was no difference between the subgroups (Table 2). Information regarding the type of delivery was obtained in 232 follow-ups. There was no difference between the subgroups when comparing vaginal birth and elective cesarean sections. However, differences were observed regarding the need for an emergency cesarean section (Table 2).

Gestational age at birth was obtained in 222 follow-ups. The mean gestational age did not differ between the subgroups. The weight of the newborns was, on average, 3128 grams (\pm 643) for those born to H1N1+ mothers, 2893

grams (± 493) for the seasonal Influenza A subgroup, and 2998 grams (± 598) for the Influenza A negative subgroup.

There were no reports of major complications or malformations for the newborns.

Discussion

By observing the previous pandemics and epidemics, as well as seasonal influenza, pregnant women have been identified as a group at risk of higher morbidity and mortality. During the epidemic of 1957–58, 10% of deaths from influenza in New York (USA) occurred in pregnant women. In Minnesota (USA), 50% of deaths among women of reproductive age occurred during pregnancy [5,6].

In the influenza A (H1N1) pandemic of 2009, pregnant women were among the first cases and first deaths reported, representing 13% of deaths reported to the centers for control and prevention of diseases in the USA.⁷ The first studies of this pandemic revealed a hospitalization rate among pregnant women that was approximately four times higher than for the general population [7]. Therefore, pregnancy is considered a risk factor for severe complications related to infection with Influenza A (H1N1). Despite this, there are few studies focusing on the teratogenic effects of this infection.

In this study, the gestational and maternal outcomes were almost the same when correlated with the Influenza A H1N1 virus. These results differ from other studies which show poor pregnancy outcomes, such as increased perinatal mortality and prematurity [15], and low birth weight [16], in the presence of infection by the H1N1 virus during maternity. The study of Pierce et al. [15] suggests that, in comparison with uninfected pregnancies, there is an increased risk of poor pregnancy outcomes for women infected with 2009/H1N1. Different from those previous studies showing worse outcomes on H1N1 infected pregnant women compared to healthy pregnant controls, our investigation compared the H1N1 infection with pregnant women with ILI, and we did not find differences in outcomes among the groups. This apparently contradictory results might be explained by the use of different control groups. Another study has also

suggested equal severe effects resulting from H1N1 infection both in pregnant compared to non-pregnant women [17].

The present study may have been unable to detect poor outcomes due to the sample sizes and the severity of maternal disease in the three subgroups used for comparison. It should be noted that in the H1N1 exposed group in our sample the prevalence of deaths (18/163, 11%), although statistically non-significant, was almost the double of the non-H1N1 influenza groups (2/34, 5.8% and 2/46, 4.3%) (Table 2). In the same line of thought, we cannot discard possible differential effects on maternal mortality related to H1N1, since in 2009, the year of the H1N1 pandemic, there were 117 deaths attributed to influenza in women of childbearing age (15–49 years) in the state of Rio Grande do Sul, compared to none in the years 2008 and 2010. This is not a direct evidence, but should be considered that potentially much more deaths had occurred due to H1N1.

Additional information was obtained about the safety of oseltamivir, given that there had been no report of any major complication or abnormality among the outcomes for pregnant women who had used this drug. These data are very important due to the large number of outcomes that could be assessed in this study and they reinforce safety data already published in other papers [23, 24].

It is important to emphasize that the follow-ups of 424 pregnant women were done from a sample of 589 pregnant women reported to SINAN-Influenza in 2009. This represents a follow-up rate of 72%, an average that is much higher than for many other studies published on this subject, which have among their limitations a small number of follow-ups (Table 3) [15,25-29]. Of these follow-ups, we included in the analysis 243 patients who performed PCR in order to confirm or rule out infection.

One limitation of our study is that we did not collect some clinical information about the respiratory symptoms exhibited by the pregnant women, such as the presence of hyperthermia (and maximum temperature) and viral load, which could account for some of the adverse outcomes reported. However, this limitation is also present in other recent studies on this subject [15].

The difficulty in performing follow-ups is due to the number of mobile phones used as the main contact — phone numbers change and phones are lost.

Moreover, at the time of the Influenza A (H1N1) pandemic, the consultations were mostly conducted in places adapted for high patient demand, thus it was more difficult and there was a greater margin of error at the time of completing the personal data of the pregnant woman being treated.

Previous experience with pregnant women exposed to Influenza A suggests that the maternal outcomes are worse in this subgroup of women. This justified the use of antiviral treatment and vaccinations against the Influenza A H1N1 virus for these patients. Regardless, our results were not sufficient to support this; therefore, it is important to emphasize that more studies are needed, especially ones that correlate maternal exposure to the H1N1 virus with neonatal outcomes, so that we can further clarify the health issues that arose after this pandemic.

Acknowledgements: The completion of this study would not have been possible without the collaboration of the Teratogen Information Service at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (SIAT-HCPA); the Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology at the Federal University of Rio Grande do Sul (PPGBM-UFRGS); the State Center for Health Surveillance/Department of Health of Rio Grande do Sul (CEVS/SES-RS); and the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul* (FAPERGS) and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES).

REFERENCES

- [1] *Morbidity and Mortality Weekly Report* – MMWR. (2009) *World Health Organization* - WHO, 2009 - MMWR (2009) - Outbreak of swine-origin influenza A(H1N1) virus infection-Mexico, march-april 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009;58:467.
- [2] *Morbidity and Mortality Weekly Report* - MMWR (2009) *World Health Organization* - WHO, 2009 - MMWR (2009) - Hospitalized patients with novel influenza A(H1N1) virus infection – California, April-May 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009;58:536.
- [3] Garten RJ, Daves CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S., et al. (2009) Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325:197-201.
- [4] Harris. (1919) Influenza occurring in pregnant women. *JAMA* 72:978-80.
- [5] Greenberg M, Jacobziner H, Pakter J, Weisl BAG. (1958) Maternal mortality in the epidemic of Asian influenza, New York City, 1957. *Am J Obstet Gynecol* 76:897-902.
- [6] Freeman DW, Barno A. (1959) Deaths from Asian influenza associated with pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 78:1172-5.
- [7] Jamieson DK, Honein MA, Rasmussen SA, Williams JL, Swerdlow DL, et al. (2009) H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA. *Lancet* 451-58.
- [8] Jamieson DJ, Theiler RN, Rasmussen SA. (2006) Emerging infections and pregnancy. *Emerg Infect Dis* 12:1638-43.
- [9] Governo do Estado do Rio Grande do Sul. (2012) Atlas socioeconômico do Rio Grande do Sul. Available: www.scp.rs.gov.br/atlas/atlas.asp?menu=633. Accessed 2012 Jan 10.
- [10] Yokota RTC, Skalinski LM, Igansi CN, Souza LRO, Iser BPM, et al. (2011). Risk Factors for Death from Pandemic (H1N1) 2009, Southern Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 17: 1467-71.
- [11] Bercini M, Ranieri T, Porto MA, Müller DP, Mohrdieck R. (2011) Medidas de Enfrentamento, Prevenção e Controle da Influenza no Estado do Rio Grande do Sul. Secretaria da Saúde. Governo do Estado do Rio Grande do Sul. *Boletim Epidemiológico* 13: 1-4.
- [12] Tanaka T, Nakajima K, Murashima A, MD, Garcia-Bournissen F, Koren G, et al.. (2009) Safety of neuraminidase inhibitors against novel influenza A (H1N1) in pregnant and breastfeeding women. *Canadian Medical Association Journal* 181:55-8.
- [13] Gérardin P, El Amrani R, Cyrille B, Gabrièle M, Guillermin P, et al. (2010) Low clinical Burden of 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Infection during Pregnancy on the Island of La Réunion. *PLoS ONE* 5: e10896.
- [14] Dubar G, Azria E, Tesniere A, Dupont H, Le Ray C, et al. (2010) French experience of 2009 A/H1N1v influenza in pregnant women. *Plos One* 5 :e13112..
- [15] Pierce M, Kurinczuk JJ, Spark P, Brocklehurst P, Knight M. (2011) Perinatal outcomes after maternal 2009/H1N1 infection: national cohort study. *British Medical Journal* 342:d3214.
- [16] Mendez-Figueroa H, Raker C, Anderson BL. (2011) Neonatal characteristics and outcomes of pregnancies complicated by influenza infection during the 2009 pandemic. *American Journal of Obstetrics & Gynecology – Supplement* S58-63.

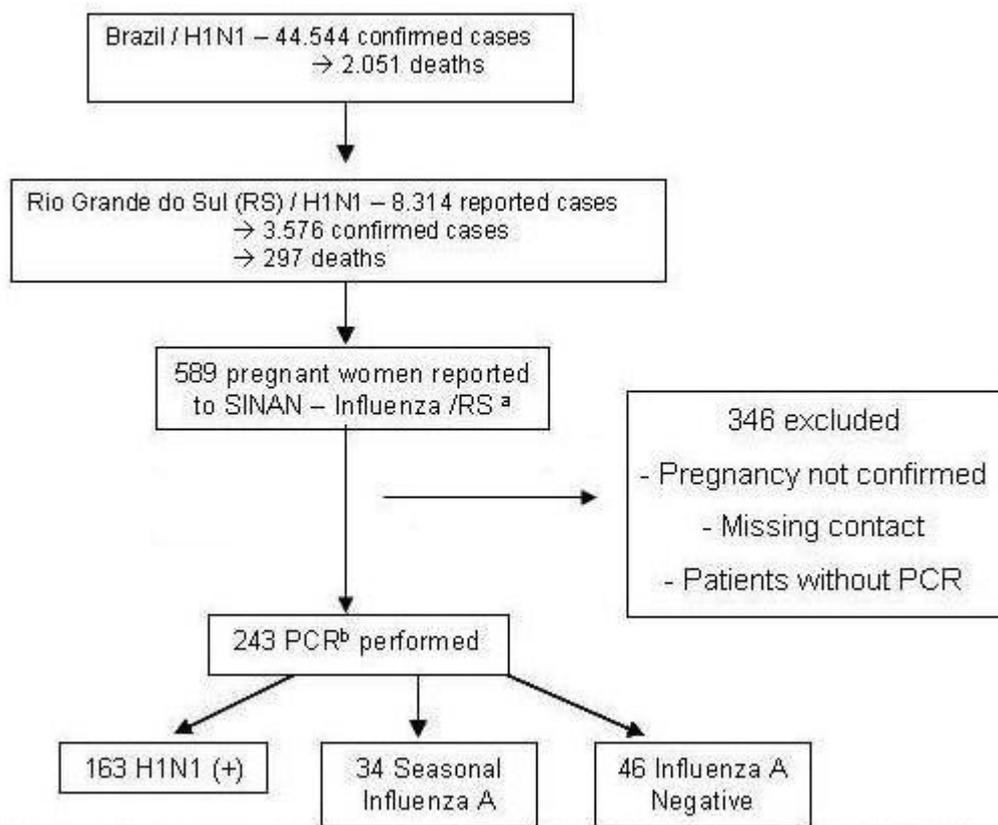
- [17] Dolan GP, Myles PR, Brett SJ, Enstone JE, Read RC, et al. (2012) The Comparative Clinical Course of Pregnant and Non-Pregnant Women Hospitalised with Influenza A(H1N1)pdm09 Infection. *PLoS ONE* 7: e41638.
- [18] Haberg SE, Trogstad L, Gunnes N, Wilcox AJ, Gjessing HK, et al. (2013) Risk of fetal death after pandemic influenza infection or vaccination during pregnancy. *N Engl J Med* 368: 333-340.
- [19] Pasternak B, Svanström H, Molgaard-Nielsen D, Krause TG, Emborg HD, et al. (2012) Risk of Adverse Fetal Outcomes Following Administration of a Pandemic Influenza A (H1N1) Vaccine During Pregnancy. *JAMA* 308(2): 165-174.
- [20] Jiménez MF, El Beitune P, Salcedo MP, Ameln AVV, Mastalir FP, et al. (2010) Outcomes for pregnant women infected with the influenza A (H1N1) virus during the 2009 pandemic in Porto Alegre, Brazil. *Int J Gynecol Obstet* 111:217-19.
- [21] Brasil. (2011) Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Available: www.portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21383. Accessed 2011 Nov 26.
- [22] World Health Organization (2009a). CDC Protocol of Realtime RTPCR for Swine Influenza A (H1N1). World Health Organization, Geneva. Available: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimeRTPCRprotocol_20090428.pdf. Accessed 2011 Nov 26.
- [23] European Medicines Agency. (2011) CHMP Assessment Report on Novel Influenza (H1N1) outbreak Tamiflu (oseltamivir) Relenza (zanamivir). <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/tamiflu/28766209en.pdf> [Acessado em 02/10/2011]
- [24] Greer LG, Sheffield JS, Rogers VL, Roberts SW, McIntire DD, et al. (2010) Maternal and Neonatal outcomes after antepartum treatment of influenza with antiviral medications. *Obstet Gynecol* 115:711-6.
- [25] Siston AM, Rasmussen SA, Honein MA, Fry AM, Seib K, et al. (2010) Pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus illness among pregnant women in the United States. *JAMA* 115:717-26.
- [26] Louie JK, Acosta M, Jamieson DJ, Honein MA. (2010) Severe 2009 H1N1 influenza in pregnant and postpartum women in California. *N Engl J Med* 362:27-35.
- [27] Creanga AA, Johnson TF, Graitcer SB, Hartman LK, Al-Samarrai T, et al. (2010) Severity of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in pregnant women. *Obstet Gynecol* 115:717-26.
- [28] Hewagama S, Walker SP, Stuart RL, Gordon C, Johnson PD, et al. (2010) 2009 H1N1 Influenza A and pregnancy outcomes in Victoria, Australia. *Clin Infect Dis* 50:686-90.
- [29] Australian and New Zealand Intensive Care Influenza Investigators, Australasian Maternity Outcomes Surveillance System (2010) Critical illness due to 2009 A/H1N1 influenza in pregnant and postpartum women: population based cohort study. *BMJ* 340:c1279.

Figure 1: H1N1 cases reported, confirmed, and with a PCR performed, in Rio Grande do Sul.

Footnote:

- a. Information System for Notifiable Diseases-Influenza (SINAN-Influenza): database for the state of Rio Grande do Sul
- b. Polymerase chain reaction

Figure 1 – H1N1 cases reported, confirmed and with PCR performed in Rio Grande do Sul, Brazil.



a System for Notifiable Diseases - Influenza - database from the state of Rio Grande do Sul.
b *polymerase chain reaction*

Table 1: Clinical parameters presented by pregnant women with influenza-like illness in south Brazil.

	H1N1+ (n=163)		Seasonal Influenza A (n=34)		Influenza A negative (n=46)	
	n	%	n	%	n	%
Hospitalization^a	70	42.9*	6	17.6*	31	67.4*
Mechanical ventilation^a	27	16.6	4	11.7	10	21.7
Antibiotic use^a	50	30.7	7	20.5	21	45.6
Maternal deaths^a	18	11	2	5.8	2	4.3

^a Fisher's exact test followed by Z-test with Bonferroni correction

*Significance level was set at $p < 0.05$.

Table 2: Pregnancy outcomes in H1N1 confirmed cases and non-H1N1 influenza cases in south Brazil.

	H1N1+ (n=163)		Seasonal Influenza A (n=34)		Influenza A negative (n=46)	
	N	%	n	%	n	%
Live births^a	158	97.0	33	97.0	45	97.8
Stillbirths^a	5	3.0	1	3.0	0	0
Miscarriages^a	0	0	0	0	1	2.2
Delivery method						
Vaginal births^a	50	30.7	11	32.3	10	21.7
Elective cesarean sections^a	67	41.1	14	41.1	11	23.9
Emergency cesarean sections^a	39	23.9*	9	26.4	21	45.6*
Gestational age at birth						
Mean age in weeks (±SD)^b	37.0 (±4.5)	-	37.2 (±4.2)	-	36.8 (±3.8)	-
< 37 weeks^a	38	23.3	9	26.4	15	32.6
APGAR score (mean)						
1st minute^c	7.6	-	8.2	-	8.3	-
5th minute^c	8.8	-	9.1	-	8.9	-
Birth weight in grams (mean±SD)^b	3128 (±643)	-	2893 (±493)	-	2998 (±598)	-

^aFisher's exact test followed by Z-test with Bonferroni correction

^bOne-way ANOVA

^cKruskal-Wallis test

*Significance level was set at p<0.05 for all tests.

Table 3: Previous studies of pregnancy outcomes among women infected with the 2009 H1N1

Study	No. of pregnant women reported	No. and (%) actually infected`	Pregnancy outcome	No. affected	Maternal deaths	Antiviral treatment
LOUIE, 2010 (USA) [26]	94	32 (34)	Miscarriage	02	06	81%
ANZIC, 2010 (AUS/NZ) [29]	64	61 (95)	Miscarriage	02	06	81%
			Stillbirth	04		
			Premature delivery	22		
			Low birth weight	18		
HEWAGAMA, 2010 (AUS)[28]	43	15 (35)	Premature delivery	06	01	77%
		24 (56)	Stillbirth/neonatal death	03		
SISTON, 2010 (USA) [25]	788	169 (21)	Premature delivery	51	30	84%
		200 (25)	Miscarriage	08		
CREANGA, 2010 (USA) [27]	62	40 (65)	Premature delivery	06	02	50%
			Neonatal death	02		
			Stillbirth	02		
DUBAR, 2010 (FRA) [14]	314	146 (46)	Loss of pregnancy (<24weeks)	04	03	95%
			Premature delivery	26		
			Low birth weight	22		
GÉRARDIN, 2010 (FRA) [13]	271	139 (51)	Premature delivery	17	-	86%
			Congenital anomalies	01		
PIERCE, 2011 (UK) [15]	272	256 (94)	Stillbirth	07	-	-
			Loss of pregnancy (<24weeks)	05		
			Premature delivery	58		
			Congenital anomalies	08		
PRESENT STUDY, 2012 (BRA)	589	243 (41)	Stillbirth	08	24	56%
			Loss of pregnancy (<24weeks)	03		
			Congenital anomalies	01		

Impact on Pregnancies in South Brazil from the Influenza A (H1N1) Pandemic: Cohort Study

André Anjos da Silva^{1,2}, Tani Maria Schilling Ranieri³, Fernanda Duarte Torres¹, Fernanda Sales Luiz Vianna¹, Graziella Rangel Paniz¹, Paula Baptista Sanseverino¹, Paulo Dornelles Picon⁴, Pietro Baptista de Azevedo¹, Marta Haas Costa¹, Lavinia Schuler-Faccini^{1,2*}, Maria Teresa Vieira Sanseverino¹

1 Teratogen Information Service, Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil, **2** Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology at the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, **3** Epidemiological Surveillance, Department of Health, Rio Grande do Sul, Brazil, **4** Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Abstract

Introduction: The emergence of a new subtype of the influenza virus in 2009 generated interest in the international medical community, the media, and the general population. Pregnant women are considered to be a group at risk of serious complications related to the H1N1 influenza virus. The aim of this study was to evaluate the outcomes and teratogenic effects of pregnancies exposed to the H1N1 virus during the Influenza A epidemic that occurred in the state of Rio Grande do Sul in 2009.

Methods: This is an uncontrolled prospective cohort study of pregnant women with suspected symptoms of Influenza A who were reported in the Information System for Notifiable Diseases – Influenza (SINAN-Influenza) during the epidemic of 2009 (database from the state of Rio Grande do Sul, Brazil). There were 589 cases of pregnant women with suspected infection. Among these, 243 were tested by PCR and included in the analysis. The main outcome measures were: maternal deaths, pregnancy outcome, stillbirths, premature births, low birth weight, congenital malformations, and odds ratios for H1N1+ and non-H1N1 pregnant women.

Results: There were one hundred and sixty-three (67%) confirmed cases of H1N1, 34 cases (14%) of seasonal Influenza A and 46 (19%) who were negative for Influenza A. There was no difference between the three groups in clinical parameters of the disease. There were 24 maternal deaths — 18 of them had H1N1. There were 8 stillbirths — 5 were children of H1N1 infected mothers. There were no differences in perinatal outcomes.

Conclusions: The present data do not indicate an increase in teratogenic risk from exposure to the influenza A (H1N1) virus. These results will help to strengthen the data and clarify the health issues that arose after the pandemic.

Citation: Silva AA, Ranieri TMS, Torres FD, Vianna FSL, Paniz GR, et al. (2014) Impact on Pregnancies in South Brazil from the Influenza A (H1N1) Pandemic: Cohort Study. PLoS ONE 9(2): e88624. doi:10.1371/journal.pone.0088624

Editor: Julian W. Tang, Alberta Provincial Laboratory for Public Health/University of Alberta, Canada

Received: April 1, 2013; **Accepted:** January 15, 2014; **Published:** February 18, 2014

Copyright: © 2014 Silva et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Funding was provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), n. 007/2009. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: lavinia.faccini@ufrgs.br

Introduction

The emergence of a new subtype of the influenza virus at the end of March 2009 generated interest in the international medical community, the media, and the general population. The influenza A (H1N1) epidemic began in Mexico and rapidly spread to other countries around the world [1] and was declared a pandemic by the World Health Organization (WHO) approximately two months after the first cases appeared [2]. In Brazil, it was declared pandemic in mid-July 2009.

The Influenza A H1N1 virus is the product of multiple genetic rearrangements among strains of influenza that had previously been circulating. Some of these were unique to swine and birds and became capable of infecting humans [3].

Pregnant women are considered to be a group at risk of serious complications related to the H1N1 influenza virus, with high

morbidity and mortality observed in both previous [4–6] and recent [7,8] epidemics. Studies of the consequences for pregnancy and the fetus, both for the influenza and its treatment, are also important in the context of public health.

The only known specific treatment, which is supported by recent evidence, is the use of the neuraminidase inhibitors zanamivir and oseltamivir, of which only the latter is available in Brazil.

Rio Grande do Sul is the southernmost state of Brazil. It occupies 3% of the national territory and has a population of 10,914,128 inhabitants (2009), which corresponds to about 6% of the national population. The climate in this state has specific characteristics that are different from the rest of the country. For example, it has the lowest temperatures for the Brazilian winter (humid subtropical climate with average temperatures between 15°C and 18°C) [9].

During the Influenza A (H1N1) pandemic in 2009 there were 44,544 cases confirmed in Brazil and 2,051 deaths recorded. In Rio Grande do Sul, there were 8,314 reported cases, 3,576 confirmed cases (8% of total cases in Brazil), and 297 deaths (14.5% of national deaths) [10,11].

As for effects on the embryo/fetus, there are still few studies on the teratogenic potential of the influenza virus. It has been suggested that there is a potential increase in the risk of defects in neural tube closure associated with maternal hyperthermia [12]. Few studies focus on the teratogenic effects of this virus on the embryo/fetus [13–17].

Analyses of the effects of Influenza A H1N1 on pregnancies during the pandemic of 2009 have focused primarily on maternal mortality and morbidity, in part due to the immediacy of the pandemic and the speed with which the series of cases were published [15]. The follow-up of women after hospital admission, with a focus on pregnancy outcomes, has now been further investigated [15,16,18]. Some of these studies confirm the worse outcomes in pregnant women infected with H1N1 Influenza virus and proved the benefits of vaccination and treatment for this condition [18,19].

In South America, only one Brazilian study, which was conducted with 57 hospitalized women, has shown the clinical characteristics and pregnancy outcomes of pregnant women infected with Influenza A (H1N1) during the 2009 pandemic [20].

The aim of this study was to evaluate the outcomes, including teratogenic effects, of pregnancies exposed to the H1N1 virus during the Influenza A epidemic that occurred in the state of Rio Grande do Sul in 2009.

Materials and Methods

This is an uncontrolled prospective cohort study that evaluated pregnancies with exposure to the 2009 H1N1 Influenza virus. The sample consisted of pregnant women with suspected symptoms of Influenza A who were reported in the Information System for Notifiable Diseases - Influenza (SINAN-Influenza) during the epidemic of 2009 (database from the state of Rio Grande do Sul).

SINAN is maintained by the reporting and investigation of cases of diseases and conditions that appear on the national list of diseases for which notification is compulsory. Besides the Individual Notification Form (FIN), the system also provides an Individual Investigation Form (FII), which is a research guideline that enables the identification of the source of infection and the mechanisms of disease transmission. Most of the information about the patient and his clinical symptoms are collected at the time of notification [21].

Confirmation of the infection and detection of the viral subtype was done (when possible) through a biological sample (nasopharyngeal swab) in order to perform the real time polymerase chain reaction (RT-PCR), in accordance with the RT-PCR protocol for the detection and characterization of Swine Influenza from the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [22].

Pregnancy follow-up was conducted by a trained team via telephone, between July 2009 and June 1, 2011. If three phone calls were unsuccessful and a visit to a patient's home could not be arranged, a follow-up was considered to be lost. Data from medical records or the Live Birth Certificate (LBC) would then be used to verify the pregnancy outcome data. The LBC is the standard document of the Ministry of Health and its use is mandatory in Brazil. It includes data to be filled in about the mother (age, gravidity), the pregnancy (gestational age), type of delivery, and the newborn child (birth weight, Apgar score, congenital malformations, etc.). The LBC does not include

information about pregnancy complications or comorbidities like pregnancy-related hypertension/preeclampsia, gestational diabetes, etc.).

A home visit, when possible, was performed by a team member who used a questionnaire identical to that used in the phone interviews. This follow-up by personal contact received direct support from the State Center for Health Surveillance (CEVS).

Participants

During the Influenza A H1N1 epidemic in 2009, there were 589 cases of pregnant women suspected of infection that were reported to the SINAN-Influenza database for Rio Grande do Sul.

Patients were excluded from this study if they did not have a confirmed pregnancy, if it was not possible to contact them after notification, or if they did not have a PCR performed.

For data analysis, we included only patients with infection confirmed by PCR laboratory analysis. Follow-ups were done either by phone, home visit, assessment of medical records, or via the LBC information.

Case Ascertainment

An influenza-like illness (ILI) was defined as the presence of at least one of the common flu symptoms (rhinorrhea, conjunctivitis, sore throat, cough, shortness of breath, headache, backache, muscle ache, joint pain, fever, nausea, vomiting, diarrhea, or asthenia), in accordance with the widely used definition, and this was reported to the SINAN-Influenza database.

A confirmed case was defined as an ILI with a positive Influenza A (H1N1) PCR, and is denoted as H1N1+. Non-H1N1 Influenza cases were those that were seasonal Influenza A or that were negative for Influenza A (see Figure 1). Considering that the PCR techniques were specific for H1N1 and seasonal Influenza A, it was not possible to identify other agents among the Influenza A negative subgroup.

Statistical Methods

We evaluated clinical parameters related to the pregnancy (gestational age in the notification, pharmaceutical form of the oseltamivir phosphate used, other medications taken, outcome of pregnancy: miscarriage or birth, and type of birth) and the newborn child (prematurity, low weight, presence of congenital malformations, and neonatal complications). A descriptive analysis was done of the samples, with means and standard deviations for both the quantitative variables of the clinical parameters and the frequency of the categorical variables. The analyses were done using Fisher's exact test followed by the Z-test with Bonferroni correction, One-way ANOVA, or the Kruskal-Wallis test, as appropriate. The level of significance was set at 5% for all variables and the program used for the analyses was SPSS for Windows, version 18.0.

Ethics Statement

The research was approved by the Research Ethics Committee of the Research and Post-Graduate Group at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (CEP/GPPG-HCPA).

At the beginning of the telephone interview, consent was requested for confirmation of the information available in the records of SINAN-Influenza or for collection of new data, if necessary. Informed consent was conducted verbally, since most of the interviews were conducted via telephone. The patient answered "Yes, I authorize" or "No" to the question "Do you consent to talk by phone with a medical team and provide some data about your flu syndrome episode and your pregnancy?". The

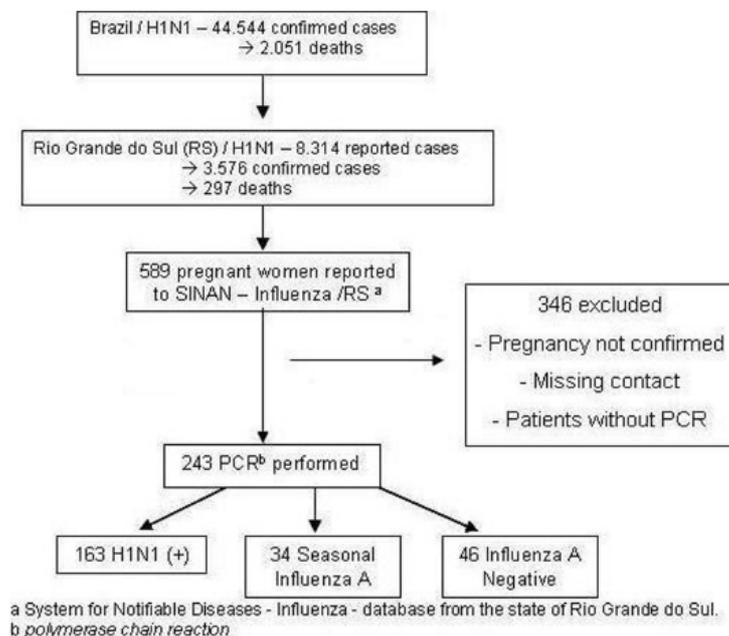


Figure 1. H1N1 cases reported, confirmed, and with a PCR performed, in Rio Grande do Sul. Footnote: a. Information System for Notifiable Diseases-Influenza (SINAN-Influenza): database for the state of Rio Grande do Sul. b. Polymerase chain reaction. doi:10.1371/journal.pone.0088624.g001

same verbal informed consent was applied to cases of personal interviews. All procedures were approved by GPPG and the clinical investigation was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

Results

During the Influenza A H1N1 epidemic in 2009, there were 589 cases of pregnant women suspected of infection who reported to the SINAN-Influenza database for Rio Grande do Sul.

From the follow-ups done, 243 PCR test results were obtained. There were one hundred and sixty three (67%) confirmed cases of Influenza A H1N1, 34 cases (14%) of seasonal Influenza A, and 46 (19%) negative for Influenza A (Figure 1). Contact was made directly in about 40% of cases. The remaining follow-ups were facilitated by medical records or Live Birth Certificates.

The accurate gestational age at the time of infection was obtained in 83 follow-ups. Three women (1.2%) were in the first trimester (0–11 weeks), 27 (11%) were in the second trimester (12–23 weeks) and 53 (21.8%) patients were in the third trimester (≥ 24 weeks).

Use of oseltamivir phosphate was identified in 137 patients (56.3%). Adverse reactions such as vomiting, nausea, abdominal pain, diarrhea, drowsiness, confusion, dizziness, headache, and irritability were reported. There were no serious adverse events in this study population. There was no difference when comparing the three groups in terms of adverse reactions presented. In the analysis of symptoms reported after use of the medication, in comparison with the H1N1+ subgroup only nausea was more frequent in patients without H1N1 confirmed by PCR (OR: 0.36, 95% CI: 0.15–0.86, $p < 0.01$).

Hospitalization was required for 107 of the patients. In the H1N1+ subgroup, 70 (42.9%) patients required hospitalization.

The other 37 admissions consisted of 6 (17.6%) in the seasonal Influenza A subgroup and 31 (67.4%) in the Influenza A negative subgroup. The proportion of hospitalizations is significantly different for each group; in other words, there was a predominance of hospitalizations in the Influenza A negative subgroup, followed by the H1N1+ subgroup, and finally the seasonal Influenza A subgroup ($p < 0.05$, see Table 1). Of these 107 patients, 58 (54.2%) were in the third trimester of pregnancy (38 H1N1+).

The clinical parameters are presented in Table 1 and show no differences between the subgroups.

Twenty-four maternal deaths (5.6%) were recorded, 18 of these (75%) were H1N1+ patients. Two deaths were in the seasonal Influenza A subgroup and 2 deaths in the Influenza A negative subgroup (Table 1). The remaining two deaths were recorded for pregnant women for whom a PCR was not done. Only two of these 24 patients were not admitted to the intensive care unit and did not require mechanical ventilation (both were from the H1N1+ subgroup). Fifteen of these women (13 were H1N1+) had received oseltamivir and there was an average of 3.8 days between the onset of symptoms and treatment. Case-fatality did not differ between the subgroups. The total number of deaths from Influenza (ICD-10 J09 [Influenza due to certain identified influenza viruses], J10 [Influenza due to other identified influenza virus], and J11 [Influenza due to unidentified influenza virus] for women of childbearing age (15–49 years) in 2009 in the state of Rio Grande do Sul was 117. Of these, 97 were attributed to ICD-10 J09 (Influenza due to a certain identified influenza virus). In 2008 and 2010 there were no deaths in this subgroup of women that could be attributed to the ICDs mentioned above. In 2011, there were 4 deaths in this age group (2 due to ICD-10 J09) [21].

Table 1. Clinical parameters presented by pregnant women with influenza-like illness in south Brazil.

	H1N1+ (n = 163)		Seasonal Influenza A (n = 34)		Influenza A negative (n = 46)	
	n	%	n	%	n	%
Hospitalization ^a	70	42.9*	6	17.6*	31	67.4*
Mechanical ventilation ^a	27	16.6	4	11.7	10	21.7
Antibiotic use ^a	50	30.7	7	20.5	21	45.6
Maternal deaths ^a	18	11	2	5.8	2	4.3

^aFisher's exact test followed by Z-test with Bonferroni correction.

*Significance level was set at $p < 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0088624.t001

These ICDs were used for comparison purposes of the maternal deaths between the years with and without H1N1 pandemic.

Regarding pregnancy outcomes, we obtained 236 live births. Eight stillbirths were reported — five of these were for H1N1+ pregnant women, one was from the seasonal Influenza A subgroup, and the other two were for pregnant women for whom research about the virus was not done. There were three miscarriages — one occurred in the Influenza A negative subgroup and two in pregnant women without PCR, so there was no difference between the subgroups (Table 2). Information regarding the type of delivery was obtained in 232 follow-ups. There was no difference between the subgroups when comparing vaginal birth and elective cesarean sections. However, differences were observed regarding the need for an emergency cesarean section (Table 2).

Gestational age at birth was obtained in 222 follow-ups. The mean gestational age did not differ between the subgroups. The weight of the newborns was, on average, 3128 grams (± 643) for those born to H1N1+ mothers, 2893 grams (± 493) for the

seasonal Influenza A subgroup, and 2998 grams (± 598) for the Influenza A negative subgroup.

There were no reports of major complications or malformations for the newborns.

Discussion

By observing the previous pandemics and epidemics, as well as seasonal influenza, pregnant women have been identified as a group at risk of higher morbidity and mortality. During the epidemic of 1957–58, 10% of deaths from influenza in New York (USA) occurred in pregnant women. In Minnesota (USA), 50% of deaths among women of reproductive age occurred during pregnancy [5,6].

In the influenza A (H1N1) pandemic of 2009, pregnant women were among the first cases and first deaths reported, representing 13% of deaths reported to the centers for control and prevention of diseases in the USA [7]. The first studies of this pandemic revealed a hospitalization rate among pregnant women that was approximately four times higher than for the general population

Table 2. Pregnancy outcomes in H1N1 confirmed cases and non-H1N1 influenza cases in south Brazil.

	H1N1+ (n = 163)		Seasonal Influenza A (n = 34)		Influenza A negative (n = 46)	
	N	%	n	%	n	%
Live births ^a	158	97.0	33	97.0	45	97.8
Stillbirths ^a	5	3.0	1	3.0	0	0
Miscarriages ^a	0	0	0	0	1	2.2
<i>Delivery method</i>						
Vaginal births ^a	50	30.7	11	32.3	10	21.7
Elective cesarean sections ^a	67	41.1	14	41.1	11	23.9
Emergency cesarean sections ^a	39	23.9*	9	26.4	21	45.6*
<i>Gestational age at birth</i>						
Mean age in weeks (\pm SD) ^b	37.0 (± 4.5)	-	37.2 (± 4.2)	-	36.8 (± 3.8)	-
<37 weeks ^a	38	23.3	9	26.4	15	32.6
<i>APGAR score (mean)</i>						
1 st minute ^c	7.6	-	8.2	-	8.3	-
5 th minute ^c	8.8	-	9.1	-	8.9	-
Birth weight in grams (mean \pm SD) ^b	3128 (± 643)	-	2893 (± 493)	-	2998 (± 598)	-

^aFisher's exact test followed by Z-test with Bonferroni correction.

^bOne-way ANOVA.

^cKruskal-Wallis test.

*Significance level was set at $p < 0.05$ for all tests.

doi:10.1371/journal.pone.0088624.t002

Table 3. Previous studies of pregnancy outcomes among women infected with the 2009 H1N1.

Study	No. of pregnant women reported	No. and (%) actually infected'	Pregnancy outcome	No. affected	Maternal deaths	Antiviral treatment
LOUIE, 2010 (USA) [26]	94	32 (34)	Miscarriage	02	06	81%
ANZIC, 2010 (AUS/NZ) [29]	64	61 (95)	Miscarriage	02	06	81%
			Stillbirth	04		
			Premature delivery	22		
HEWAGAMA, 2010 (AUS) [28]	43	15 (35)	Premature delivery	06	01	77%
			Stillbirth/neonatal death	03		
			Low birth weight	18		
SISTON, 2010 (USA) [25]	788	169 (21)	Premature delivery	51	30	84%
			Miscarriage	08		
CREANGA, 2010 (USA) [27]	62	40 (65)	Premature delivery	06	02	50%
			Neonatal death	02		
DUBAR, 2010 (FRA) [14]	314	146 (46)	Stillbirth	02	03	95%
			Loss of pregnancy (<24weeks)	04		
			Premature delivery	26		
			Low birth weight	22		
GÉRARDIN, 2010 (FRA) [13]	271	139 (51)	Premature delivery	17	-	86%
			Congenital anomalies	01		
PIERCE, 2011 (UK) [15]	272	256 (94)	Stillbirth	07	-	-
			Loss of pregnancy (<24weeks)	05		
			Premature delivery	58		
			Congenital anomalies	08		
PRESENT STUDY, 2012 (BRA)	589	243 (41)	Stillbirth	08	24	56%
			Loss of pregnancy (<24weeks)	03		
			Congenital anomalies	01		

doi:10.1371/journal.pone.0088624.t003

[7]. Therefore, pregnancy is considered a risk factor for severe complications related to infection with Influenza A (H1N1). Despite this, there are few studies focusing on the teratogenic effects of this infection.

In this study, the gestational and maternal outcomes were almost the same when correlated with the Influenza A H1N1 virus. These results differ from other studies which show poor pregnancy outcomes, such as increased perinatal mortality and prematurity [15], and low birth weight [16], in the presence of infection by the H1N1 virus during maternity. The study of Pierce et al. [15] suggests that, in comparison with uninfected pregnancies, there is an increased risk of poor pregnancy outcomes for women infected with 2009/H1N1. Different from those previous studies showing worse outcomes on H1N1 infected pregnant women compared to healthy pregnant controls, our investigation compared the H1N1 infection with pregnant women with ILI, and we did not find differences in outcomes among the groups. This apparently contradictory results might be explained by the use of different control groups. Another study has also suggested equal severe effects resulting from H1N1 infection both in pregnant compared to non-pregnant women [17].

The present study may have been unable to detect poor outcomes due to the sample sizes and the severity of maternal disease in the three subgroups used for comparison. It should be noted that in the H1N1 exposed group in our sample the prevalence of deaths (18/163, 11%), although statistically non-

significant, was almost the double of the non-H1N1 influenza groups (2/34, 5.8% and 2/46, 4.3%) (Table 2). In the same line of thought, we cannot discard possible differential effects on maternal mortality related to H1N1, since in 2009, the year of the H1N1 pandemic, there were 117 deaths attributed to influenza in women of childbearing age (15–49 years) in the state of Rio Grande do Sul, compared to none in the years 2008 and 2010. This is not a direct evidence, but should be considered that potentially much more deaths had occurred due to H1N1.

Additional information was obtained about the safety of oseltamivir, given that there had been no report of any major complication or abnormality among the outcomes for pregnant women who had used this drug. These data are very important due to the large number of outcomes that could be assessed in this study and they reinforce safety data already published in other papers [23,24].

It is important to emphasize that the follow-ups of 424 pregnant women were done from a sample of 589 pregnant women reported to SINAN-Influenza in 2009. This represents a follow-up rate of 72%, an average that is much higher than for many other studies published on this subject, which have among their limitations a small number of follow-ups (Table 3) [15,25–29]. Of these follow-ups, we included in the analysis 243 patients who performed PCR in order to confirm or rule out infection.

One limitation of our study is that we did not collect some clinical information about the respiratory symptoms exhibited by

the pregnant women, such as the presence of hyperthermia (and maximum temperature) and viral load, which could account for some of the adverse outcomes reported. However, this limitation is also present in other recent studies on this subject [15].

The difficulty in performing follow-ups is due to the number of mobile phones used as the main contact — phone numbers change and phones are lost. Moreover, at the time of the Influenza A (H1N1) pandemic, the consultations were mostly conducted in places adapted for high patient demand, thus it was more difficult and there was a greater margin of error at the time of completing the personal data of the pregnant woman being treated.

Previous experience with pregnant women exposed to Influenza A suggests that the maternal outcomes are worse in this subgroup of women. This justified the use of antiviral treatment and vaccinations against the Influenza A H1N1 virus for these patients. Regardless, our results were not sufficient to support this; therefore, it is important to emphasize that more studies are needed, especially ones that correlate maternal exposure to the

H1N1 virus with neonatal outcomes, so that we can further clarify the health issues that arose after this pandemic.

Acknowledgments

The completion of this study would not have been possible without the collaboration of the Teratogen Information Service at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SIAT-HCGPA); the Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology at the Federal University of Rio Grande do Sul (PPGBM-UFRGS); the State Center for Health Surveillance/ Department of Health of Rio Grande do Sul (CEVS/SES-RS); and the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)* and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AAS TMR FT FSLV GP PS PP PA MC LSF MTS. Analyzed the data: AAS TMR FT FSLV GP PS PP PA MC LSF MTS. Contributed reagents/materials/analysis tools: AAS TMR FSLV PP PA MC LSF MTS. Wrote the paper: AAS FSLV LSF MTS.

References

- Morbidity and Mortality Weekly Report – MMWR (2009) *World Health Organization - WHO*, 2009 - MMWR (2009) - Outbreak of swine-origin influenza A(H1N1) virus infection-Mexico, march–april 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009;58:467.
- Morbidity and Mortality Weekly Report – MMWR (2009) *World Health Organization - WHO*, 2009 - MMWR (2009) - Hospitalized patients with novel influenza A(H1N1) virus infection – California, April–May 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009;58:536.
- Garten RJ, Daves CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, et al. (2009) Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325:197–201.
- Harris (1919) Influenza occurring in pregnant women. *JAMA* 72:978–80.
- Greenberg M, Jacobziner H, Pakter J, Weis BAG (1958) Maternal mortality in the epidemic of Asian influenza, New York City, 1957. *Am J Obstet Gynecol* 76:897–902.
- Freeman DW, Barno A (1959) Deaths from Asian influenza associated with pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 78:1172–5.
- Jamieson DK, Honcin MA, Rasmussen SA, Williams JL, Swerdlow DI, et al. (2009) H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA. *Lancet* 451–58.
- Jamieson DJ, Theiler RN, Rasmussen SA (2006) Emerging infections and pregnancy. *Emerg Infect Dis* 12:1638–43.
- Governo do Estado do Rio Grande do Sul (2012) Atlas socioeconômico do Rio Grande do Sul. Available: www.scp.rs.gov.br/atlas/atlas.asp?menu=633. Accessed 2012 Jan 10.
- Yokota RTC, Skalinski LM, Igansi CN, Souza LRO, Iser BPM, et al. (2011). Risk Factors for Death from Pandemic (H1N1) 2009, Southern Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 17: 1467–71.
- Bercini M, Ranieri T, Porto MA, Muller DP, Mohrdieck R (2011) Medidas de Enfrentamento, Prevenção e Controle da Influenza no Estado do Rio Grande do Sul. Secretaria da Saúde. Governo do Estado do Rio Grande do Sul. *Boletim Epidemiológico* 13: 1–4.
- Tanaka T, Nakajima K, Murashima A, MD, Garcia-Bourneissen F, Koren G, et al. (2009) Safety of neuraminidase inhibitors against novel influenza A (H1N1) in pregnant and breastfeeding women. *Canadian Medical Association Journal* 181:55–8.
- Gérardin P, El Amrani R, Cuyille B, Gabrièle M, Guillermin P, et al. (2010) Low clinical Burden of 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Infection during Pregnancy on the Island of La Réunion. *PLoS ONE* 5: e10896.
- Dubar G, Azria E, Tesnière A, Dupont H, Le Ray C, et al. (2010) French experience of 2009 A/H1N1v influenza in pregnant women. *Plos One* 5: e13112.
- Pierce M, Kurinczuk JJ, Spark P, Brocklehurst P, Knight M (2011) Perinatal outcomes after maternal 2009/H1N1 infection: national cohort study. *British Medical Journal* 342:d3214.
- Mendez-Figueroa H, Raker C, Anderson BL (2011) Neonatal characteristics and outcomes of pregnancies complicated by influenza infection during the 2009 pandemic. *American Journal of Obstetrics & Gynecology – Supplement* S58–63.
- Dolan GP, Myles PR, Brett SJ, Eastone JE, Read RC, et al. (2012) The Comparative Clinical Course of Pregnant and Non-Pregnant Women Hospitalised with Influenza A(H1N1)pdm09 Infection. *PLoS ONE* 7: e41638.
- Haberg SE, Trostjad L, Gunnes N, Wilcox AJ, Gjessing HK, et al. (2013) Risk of fetal death after pandemic influenza infection or vaccination during pregnancy. *N Engl J Med* 368: 333–340.
- Pasternak B, Svanström H, Molgaard-Nielsen D, Krause TG, Emborg HD, et al. (2012) Risk of Adverse Fetal Outcomes Following Administration of a Pandemic Influenza A (H1N1) Vaccine During Pregnancy. *JAMA* 308(2): 165–174.
- Jiménez MF, El Beïtine P, Salcedo MP, Ameln AVV, Mastalir FP, et al. (2010) Outcomes for pregnant women infected with the influenza A (H1N1) virus during the 2009 pandemic in Porto Alegre, Brazil. *Int J Gynecol Obstet* 111:217–19.
- Brasil (2011) Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Available: www.portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21383. Accessed 2011 Nov 26.
- World Health Organization (2009a). CDC Protocol of Realtime RTPCR for Swine Influenza A (H1N1). World Health Organization, Geneva. Available: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimeRTPCR_protocol_20090428.pdf. Accessed 2011 Nov 26.
- European Medicines Agency (2011) CHMP Assessment Report on Novel Influenza (H1N1) outbreak Tamiflu (oseltamivir) Relenza (zanamivir). <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/tamiflu/28766209en.pdf> [Accessed em 02/10/2011]
- Greer LG, Sheffield JS, Rogers VL, Roberts SW, McIntire DD, et al. (2010) Maternal and Neonatal outcomes after antepartum treatment of influenza with antiviral medications. *Obstet Gynecol* 115:711–6.
- Siston AM, Rasmussen SA, Honcin MA, Fry AM, Seib K, et al. (2010) Pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus illness among pregnant women in the United States. *JAMA* 115:717–26.
- Louie JK, Acosta M, Jamieson DJ, Honcin MA (2010) Severe 2009 H1N1 influenza in pregnant and postpartum women in California. *N Engl J Med* 362:27–35.
- Creanga AA, Johnson TF, Grainger SB, Hartman LK, Al-Samarrai T, et al. (2010) Severity of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in pregnant women. *Obstet Gynecol* 115:717–26.
- Hewagama S, Walker SP, Stuart RL, Gordon C, Johnson PD, et al. (2010) 2009 H1N1 Influenza A and pregnancy outcomes in Victoria, Australia. *Clin Infect Dis* 50:686–90.
- Australian and New Zealand Intensive Care Influenza Investigators, Australasian Maternity Outcomes Surveillance System (2010) Critical illness due to 2009 A/H1N1 influenza in pregnant and postpartum women: population based cohort study. *BMJ* 340:e1279.

Capítulo V – Artigo 2

Influenza A (H1N1) Pandemic in South Brazil: Impact of the use of Oseltamivir in pregnant women.

Artigo submetido à Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia

Pandemia de Influenza A (H1N1) no sul do Brasil: impacto do uso do Oseltamivir em gestantes.

Influenza A (H1N1) Pandemic in South Brazil: impact of the use of Oseltamivir in pregnant women.

André Anjos da Silva^{1,2}*, Pietro Baptista de Azevedo^{1*}, Tani Maria Schilling Ranieri³,
Fernanda Sales Luiz Vianna^{1,4}, Paulo Dornelles Picon⁵, Maria Teresa Vieira
Sanseverino^{1,2}, Lavinia Schuler Faccini^{1,2}

(1) Sistema Nacional de Informações sobre Agentes Teratogênicos, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

(2) Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

(3) Vigilância Epidemiológica, Secretaria da Saúde do Rio Grande do Sul.

(4) Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

(5) Departamento de Medicina Interna, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

* Ambos autores contribuíram igualmente para este manuscrito

Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Porto Alegre (RS), Brasil.

Autor correspondente:

Maria Teresa Vieira Sanseverino

Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

Bairro Bom Fim

Porto Alegre - RS

CEP 90690-420

E-mail: msanseverino@hcpa.ufrgs.br

RESUMO

INTRODUÇÃO: o surgimento de um novo subtipo do vírus influenza em 2009 gerou interesse mundial. As gestantes são consideradas um grupo de risco para complicações relacionadas ao vírus Influenza H1N1. O único tratamento específico conhecido é o uso de inibidores da neuraminidase, dos quais apenas o oseltamivir está disponível no Brasil.

OBJETIVO: avaliar os potenciais efeitos adversos do oseltamivir em gestantes durante a pandemia de Influenza A H1N1 de 2009 no Rio Grande do Sul.

MÉTODOS: estudo de coorte prospectivo não controlado em gestantes com sintomas de Influenza A reportadas ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Influenza (SINAN-Influenza), durante a epidemia de 2009 no Rio Grande do Sul. Houve 589 casos de gestantes com suspeita de infecção. Os principais desfechos medidos foram desfechos maternos e gestacionais e reações adversas ao uso do oseltamivir e suas diferenças entre os grupos H1N1+ e não-H1N1.

RESULTADOS: Uso de oseltamivir foi identificado em 221 pacientes. Houve um maior número de reações adversas relatadas em pacientes não-H1N1 (OR: 0,45; IC 95%: 0,21-0,97; p=0,02). Ocorreram menos óbitos maternos (7,2%) nas que receberam oseltamivir comparativamente a 34,7% das mulheres que não foram tratadas (OR: 0,14, IC95%: 0,04-0,42, p=0,0003). Da mesma forma a frequência de natimortos foi menor (2,2%) nas tratadas, em comparação a 13,0% das não tratadas (OR: 0,15, IC95%: 0,03-0,89, p=0,03).

CONCLUSÃO: O presente estudo indica que o oseltamivir não aumenta a taxa de efeitos adversos em gestantes e, por outro lado, reduz significativamente desfechos materno-fetais graves.

Palavras-chave: oseltamivir; gestação; vírus H1N1

ABSTRACT

INTRODUCTION: The emergence of a new subtype of the influenza virus in 2009 generated interest in the general population. Pregnant women are considered to be a group at risk of complications related to the H1N1 influenza virus. The only known specific treatment is the use of the neuraminidase inhibitors, of which only the oseltamivir is available in Brazil.

AIM: to evaluate potential adverse effects of oseltamivir in pregnancy during the 2009 Influenza A epidemic in Rio Grande do Sul.

METHODS: uncontrolled prospective cohort study of pregnant women with symptoms of Influenza A who were reported in the Information System for Notifiable Diseases – Influenza (SINAN-Influenza) during the epidemic of 2009 in Rio Grande do Sul. There were 589 cases of pregnant women with suspected infection. The main outcome measures were maternal and gestational outcomes and oseltamivir adverse reactions and odds ratios for H1N1+ and non-H1N1 pregnant women.

RESULTS: Use of oseltamivir was identified in 221 patients. There were a higher number of adverse reactions in non-H1N1 patients (OR: 0.45; CI 95%: 0.21-0.97; $p=0.02$). There were fewer maternal deaths (7.2%) in those who received oseltamivir compared to 34.7% of women who were not treated (OR: 0.14, CI95%: 0.04-0.42, $p=0.0003$). Similarly, the frequency of stillbirth was lower (2.2%) in treated as compared to 13.0% of the untreated women (OR: 0.15, CI95%: 0.03-0.89, $p=0.03$).

CONCLUSIONS: The present study indicates that oseltamivir does not increase the adverse effects during pregnancy and, on the other hand, significantly reduces severe maternal and fetal outcomes.

Keywords: oseltamivir; pregnancy; Influenza A Virus, H1N1 subtype

Pandemia de Influenza A (H1N1) no sul do Brasil: impacto do uso do Oseltamivir em gestantes.

Influenza A (H1N1) Pandemic in South Brazil: impact of the use of Oseltamivir in pregnant women.

Introdução

Influenza é o paradigma de uma doença viral na qual a evolução continuada do vírus é de fundamental importância para as epidemias anuais e pandemias ocasionais da doença em humanos.

O surgimento de um novo subtipo do vírus influenza no final de março de 2009, chamou a atenção da comunidade médica internacional, da mídia e da população em geral. A epidemia de influenza A (H1N1) teve início no México, e expandiu-se rapidamente para países do mundo inteiro¹, sendo declarada pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente dois meses após o aparecimento dos primeiros casos². No Brasil, foi declarada transmissão sustentada em meados de julho de 2009.

No total, durante a pandemia de Influenza A (H1N1) de 2009, houve 44.544 casos confirmados no Brasil e 2.051 mortes relatadas. No Rio Grande do Sul, houve 8.314 casos notificados, 3.576 casos confirmados (8% do total de casos do país), e 297 mortes (14,5% das mortes nacionais)³.

As gestantes são consideradas um grupo de risco para complicações graves relacionadas ao vírus influenza H1N1. Os estudos a respeito das consequências para a gestação e para o feto, tanto da gripe quanto do seu tratamento ou vacinação ainda são pouco conhecidos.

A suscetibilidade da gestante às infecções virais reside no fato de a gestação estar associada com um desvio imunológico da imunidade mediada por células para a imunidade humoral. Essa alteração fisiológica é necessária para a tolerância à porção paterna dos antígenos fetais, mas causa à gestante uma maior vulnerabilidade aos patógenos intracelulares, como os vírus^{4, 5}.

Ainda que o quadro clínico em gestantes seja semelhante ao da população geral, é reconhecido que a infecção adquirida no terceiro trimestre, início tardio do tratamento

antiviral e a presença de comorbidades são fatores de alto risco para o desenvolvimento de um quadro clínico grave⁶.

O único tratamento específico conhecido é o uso de inibidores da neuraminidase, zanamivir e oseltamivir, dos quais apenas o último está disponível no Brasil³.

O fosfato de oseltamivir é um pró-fármaco éster etil que não possui atividade antiviral, e que, após metabolização pelo fígado e trato gastrointestinal, é transformado em carboxilato de oseltamivir e assim torna-se seletivo contra o vírus influenza dos tipos A e B. A principal característica do seu modo de ação é a inibição seletiva de neuraminidase, glicoproteína de liberação dos vírions, ou seja, ele impede a saída do vírus de uma célula para outra.

Previamente ao surgimento da pandemia de 2009, fármacos antivirais como oseltamivir eram raramente prescritos no tratamento da influenza, motivo pelo qual informações de farmacovigilância e segurança do medicamento são limitadas e recentes.⁷⁻¹³

Os efeitos adversos mais frequentes do fosfato de oseltamivir no tratamento de adultos com gripe sazonal são náusea, cefaleia, diarreia, sintomas nasais e tosse, mas sem diferença significativa com relação a placebo¹⁴. Esses efeitos adversos ocorrem principalmente após a primeira dose do medicamento.

A utilização do produto em gestantes requer cuidados, uma vez que não existem dados suficientes nessas pacientes para permitir uma avaliação mais adequada quanto ao potencial do medicamento em causar malformações ou toxicidade fetal em humanos¹⁵. Há poucos dados gerais a respeito da farmacocinética e da farmacodinâmica específicas das drogas durante a gestação comparadas com a população geral. Alterações nos processos fisiológicos e metabólicos durante a gestação provavelmente afetam a farmacocinética das drogas e estudos recentes mostram que as doses padrão utilizadas nessa população podem ser incorretas¹⁶.

Como as mulheres grávidas estão incluídas nos grupos de risco de morte com o vírus H1N1, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ratificou a informação do Ministério da Saúde de que o medicamento deve ser utilizado apenas se o benefício justificar o risco potencial para o feto. O risco - benefício deve ser avaliado pelo médico. Além disso, a Agência recomenda que a gestante deva ter a gravidez monitorada até o nascimento da criança³.

Existia na literatura, à época da pandemia de 2009, somente um estudo, que utilizou dados de serviços japoneses de informações sobre teratógenos, avaliando 90

gestantes de primeiro trimestre que utilizaram doses terapêuticas de oseltamivir (75 mg, duas vezes ao dia, por 5 dias) cujo único achado foi uma malformação congênita (1,1%), o que se encontra dentro do esperado para malformações maiores na população em geral¹⁷.

Recentemente, alguns estudos têm investigado os potenciais efeitos adversos no feto do uso de inibidores de neuraminidase durante a gestação. Esses estudos não encontraram aumento no risco de bebês pequenos para a idade gestacional, baixo peso ao nascimento, parto prematuro, malformações congênitas e natimortos. Entretanto, considerando os pequenos números relativos de mulheres expostas às drogas antivirais, mais estudos são necessários para avaliar a segurança do seu uso durante a gestação⁷⁻¹².

O objetivo desse estudo é avaliar os potenciais efeitos adversos da medicação em gestantes expostas ao oseltamivir durante a pandemia de Influenza A H1N1 de 2009 no estado do Rio Grande do Sul.

Métodos

Trata-se de estudo de coorte prospectivo não controlado que avaliou gestantes com exposição ao vírus H1N1 e ao tratamento com Fosfato de Oseltamivir. A amostra consistiu nas gestantes com sintomas suspeitos de Influenza A notificadas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Influenza (SINAN-Influenza), durante a epidemia de 2009, banco de dados do estado do Rio Grande do Sul.

O Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN é mantido pela notificação e investigação de casos de doenças e agravos que constam da lista nacional de doenças de notificação compulsória. Além da Ficha Individual de Notificação (FIN), o Sistema ainda disponibiliza a Ficha Individual de Investigação (FII), que é um roteiro de investigação, que possibilita a identificação da fonte de infecção e os mecanismos de transmissão da doença. No momento da notificação já são coletados a grande maioria das informações a respeito do paciente e de seu quadro clínico¹⁸.

A confirmação da infecção e detecção de subtipo viral foi realizada, quando possível, através de amostra biológica única (swab nasofaríngeo) para realização de RT-PCR (*real time – polymerase chain reaction*), conforme o Protocolo RTPCR para detecção e caracterização da Influenza Suína do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)¹⁹.

O seguimento das gestações foi realizado via telefone, entre julho de 2009 e 01 de junho de 2011, por uma equipe treinada. No início da entrevista telefônica, foi solicitado consentimento para a confirmação das informações disponíveis no cadastro do SINAN-Influenza ou coleta de novos dados, se necessário. Depois de realizados três contatos telefônicos sem sucesso e na impossibilidade de visita domiciliar à paciente, o seguimento foi considerado perdido. Foram, então, utilizados dados de prontuário médico ou a Declaração de Nascido Vivo (DNV) para averiguar os dados de desfecho gestacional. A DNV é o documento padrão do Ministério da Saúde, de uso obrigatório em todo o território nacional, com preenchimento de dados a respeito da mãe, gestação, parto e recém-nascido²⁰.

A visita domiciliar, quando possível, foi realizada por um membro da equipe que aplicou um questionário idêntico ao que se utilizou nos contatos telefônicos. Esse seguimento por contato pessoal recebeu apoio direto do Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS).

Foram avaliados parâmetros clínicos relativos à gestação e ao recém-nascido.

O nível de significância foi definido como 5% para todas as variáveis.

O programa utilizado para as análises foi o SPSS para Windows, versão 18.0.

Foi realizada análise descritiva das amostras com médias e desvios-padrão das variáveis quantitativas dos parâmetros clínicos e frequência das variáveis categóricas. Na análise bivariada, foram feitas comparações entre as proporções (através do chi-quadrado ou de testes não paramétricos, quando necessário).

Detalhamento adicional da metodologia e da amostra pode ser consultado em publicação anterior do nosso grupo²¹.

Resultados

Durante a epidemia de Influenza A H1N1, em 2009, foram informados ao SINAN – Influenza, banco de dados do estado do Rio Grande do Sul, 589 casos de gestantes com suspeita de infecção pelo vírus.

Entre essas, foram realizados 424 seguimentos (72%). O contato foi realizado de forma direta em cerca de 40% dos casos. O restante dos seguimentos ocorreu através do prontuário médico ou via DNV.

Dos seguimentos realizados, foram obtidos 243 resultados de exames de PCR (*polymerase chain reaction*). Cento e sessenta e três (67%) casos confirmados de

Influenza A H1N1 e 80 (33%) casos de Influenza não-H1N1 (34 Influenza A Sazonal e 46 negativos para Influenza A) (Figura 1).

Uso de fosfato de oseltamivir foi identificado em 221 pacientes. Dessas, 86 gestantes apresentaram PCR positivo para Influenza A (H1N1) e 51 estavam no grupo não-H1N1 (Figura 1). Vinte e três gestantes não utilizaram essa medicação. Nos demais seguimentos realizados, não houve informação a respeito do uso de fármaco antiviral.

Entre as gestantes que utilizaram a medicação, 92 (42%) relataram reações adversas como vômitos, náusea, dor abdominal, diarreia, sonolência, confusão, tonturas, cefaleia ou irritabilidade.

Houve um maior número de reações adversas relatadas em pacientes não-H1N1 (OR: 0,45; IC 95%: 0,21-0,97; $p=0,02$). Na análise por sintoma relatado após o uso da medicação, apenas náusea foi mais frequente nas pacientes não-H1N1 (OR: 0,36; IC 95%: 0,15-0,86; $p<0,01$). Não houve diferença significativa nos demais efeitos adversos relatados (Tabela 1).

Características relativas ao quadro clínico apresentado pelas gestantes estão na Tabela 2. Ocorreram óbitos maternos em 7,2% das que receberam oseltamivir, comparativamente a 34,7% das mulheres que não foram tratadas (OR: 0,14, IC95%: 0,04-0,42, $p=0,0003$). Da mesma forma, a frequência de natimortos foi menor (2,2%) nas tratadas, em comparação a 13,0% das não tratadas (OR: 0,15, IC95%: 0,03-0,89, $p=0,03$). Outros desfechos como necessidade de ventilação mecânica e uso de antibiótico também foram significativamente maiores nas mulheres que não receberam fármaco anti-viral.

Não houve relato de complicações maiores ou malformações congênitas nos recém-nascidos entre os seguimentos realizados nas gestantes que utilizaram o fármaco oseltamivir.

Discussão

Observando-se as pandemias e epidemias anteriores, e até mesmo a influenza sazonal, identificam-se as gestantes como grupo de risco, apresentando maior morbidade e mortalidade. Durante a epidemia de 1957-58, 10% das mortes por influenza em Nova Iorque (EUA) ocorreram em gestantes²² e, em Minnessota (EUA), 50% das mortes de mulheres em idade fértil ocorreram durante a gestação²³. Na pandemia por influenza A (H1N1) de 2009, as gestantes estavam entre os primeiros

casos e primeiros óbitos notificados, representando 13% da mortalidade reportada aos centros de controle e prevenção de doenças dos EUA²⁴. A taxa de hospitalização entre as gestantes chegou a ser cerca de quatro vezes maior que na população em geral²⁴. Portanto, a gestação é considerada um fator de risco para as complicações graves relacionadas à infecção por Influenza A (H1N1).

Em gestantes, o quadro clínico costuma ser o mesmo que o apresentado pela população adulta em geral. Um estudo²⁵ descreveu as características das gestantes infectadas com o vírus influenza A H1N1 atendidas em um hospital terciário asiático cujos principais sintomas apresentados foram febre, tosse, rinorreia, dor de garganta, cefaleia, mialgias e dispneia.

Estudos mais abrangentes realizados com influenza sazonal e pandêmica foram válidos ao determinar benefício do medicamento oseltamivir, mas as análises de eventos adversos permanecem controversas. Um estudo²⁶ descreve náusea (31%), cefaleia (24%) e dor abdominal (21%) em crianças usando o medicamento como profilaxia para influenza A (H1N1). Outro grupo²⁷ encontrou eventos adversos gastrointestinais (40%) e neuropsiquiátricos (18%), em circunstâncias semelhantes.

Uma revisão sistemática realizada em crianças comprovou diminuição na duração dos sintomas gripais sem, no entanto, diminuir a taxa de exacerbações asmáticas ou uso de antibióticos. Quanto aos efeitos adversos, essa revisão demonstrou aumento no risco de vômitos em pacientes que utilizaram oseltamivir²⁸. Outra revisão sistemática que incluiu pacientes de todas as faixas etárias em uso de oseltamivir como profilaxia contra Influenza também demonstrou eficácia desse fármaco. Não houve aumento na taxa de efeitos adversos nos pacientes que utilizaram a medicação; no entanto, náusea e vômitos foram mais comumente relatados nos pacientes que realizaram terapia de duração estendida.²⁹

No presente estudo, houve um maior número de reações adversas relatadas em pacientes não-H1N1 após o uso do oseltamivir. Na análise por sintoma específico, apenas náusea foi significativamente mais frequente nas pacientes sem H1N1 confirmado por PCR.

Nos últimos anos, alguns estudos têm investigado os potenciais efeitos adversos no feto do uso de inibidores de neuraminidase durante a gestação sem demonstrar aumento no risco de desfechos adversos⁷⁻¹³.

Em nosso estudo, os desfechos maternos (incluindo óbitos) e gestacionais (frequência de natimortos) mostraram-se mais graves em pacientes que não utilizaram o

fármaco oseltamivir, provavelmente pela gravidade do quadro clínico apresentado sem tratamento adequado. Esses achados diferem dos encontrados em dois estudos ^{7,15} que não observaram diferença nos desfechos gestacionais entre grupos expostos e não expostos. No entanto, em uma recente revisão sistemática do uso de oseltamivir em gestantes, desfechos gestacionais adversos como abortos e partos pré-termos foram encontrados em uma taxa menor que na população geral nas pacientes que utilizaram a medicação, sugerindo o benefício do tratamento adequado do quadro gripal.¹³

Além disso, informações adicionais foram obtidas a respeito da segurança do oseltamivir tendo em vista que não houve relato de nenhuma complicação maior ou malformação entre os desfechos das gestantes que utilizaram esse fármaco.

Uma possível limitação do presente estudo é o pequeno número amostral das gestantes não tratadas para as quais estavam disponíveis informações de evolução da gravidez.

Esses dados são muito importantes devido ao grande número de desfechos que puderam ser avaliados nesse estudo e reforçam dados de segurança já publicados em outros trabalhos. Entretanto, considerando os pequenos números relativos de mulheres expostas às drogas antivirais, trabalhos adicionais são necessários para avaliar a segurança do seu uso durante a gestação.

Agradecimentos

A realização desse estudo não teria sido possível sem a colaboração do Sistema Nacional de Informações sobre Agentes Teratogênicos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SIAT-HCPA); Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBM-UFRGS); Centro Estadual de Vigilância em Saúde / Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul (CEVS / SES - RS); e sob financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – CEP/GPPG - HCPA.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

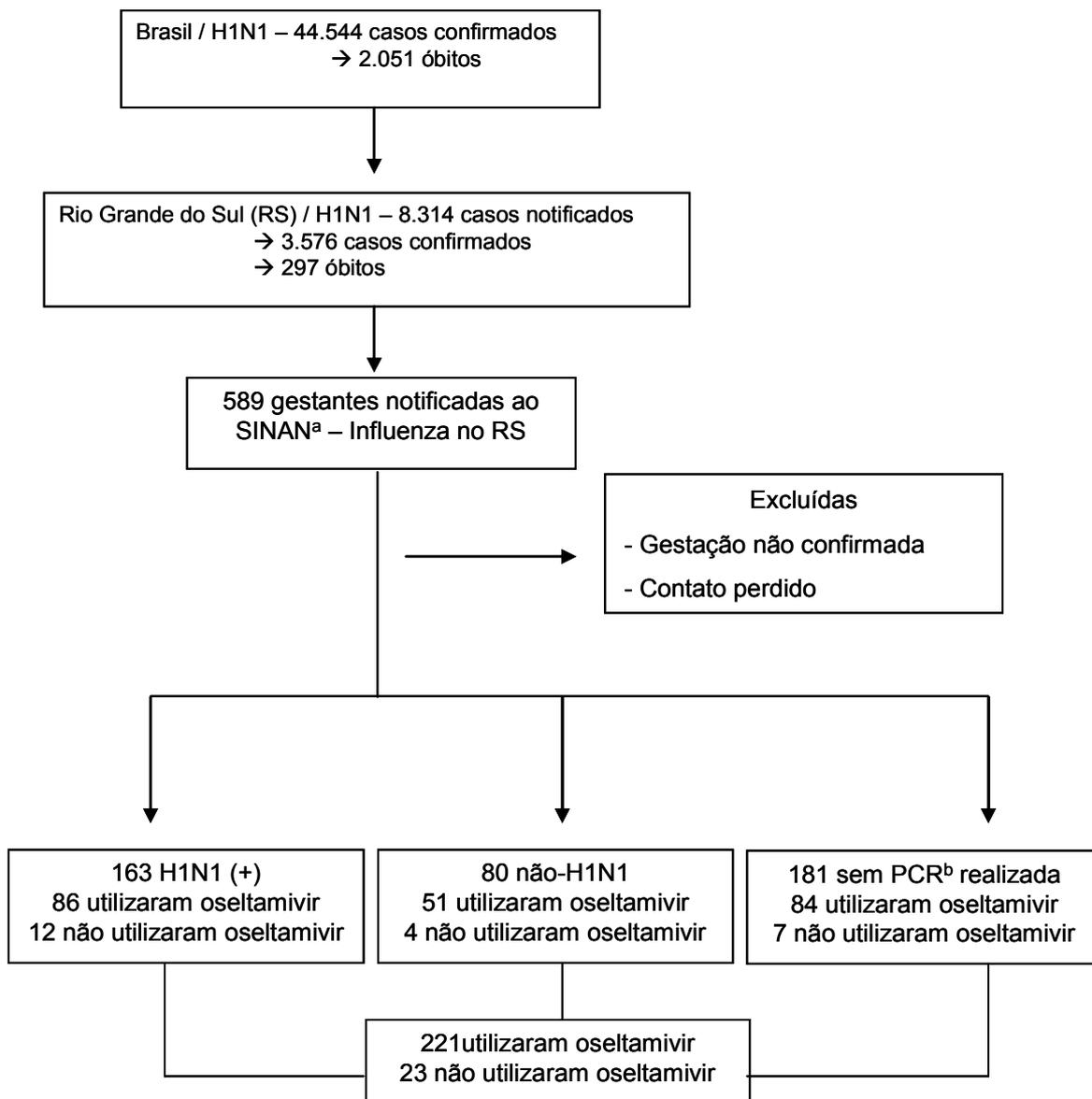
Referências

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of swine-origin influenza A(H1N1) virus infection-Mexico, march-april 2009. *MMWR - Morbidity and Mortality Weekly Report* 2009;58(17):467-70.
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Hospitalized patients with novel influenza A(H1N1) virus infection – California, April-May 2009. *MMWR - Morbidity and Mortality Weekly Report* 2009;58(19):536-41.
3. Bercini M, Ranieri T, Porto MA, Müller DP, Mohrdieck R. Medidas de Enfrentamento, Prevenção e Controle da Influenza no Estado do Rio Grande do Sul. *Boletim Epidemiológico. Secretaria da Saúde. Governo do Estado do Rio Grande do Sul.* 2011;13:1-4.
4. Jamieson DJ, Theiler RN, Rasmussen SA. Emerging infections and pregnancy. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1638-43.
5. Raj RS, Bonney EA, Phillippe M. Influenza, Immune System, and Pregnancy. *Reprod Sci.* 2014 Jun 4:1-18.
6. Singhal S, Sarda N, Arora R, Punia N, Jain A. Clinical profile & outcome of H1N1 infected pregnant women in a tertiary care teaching hospital of northern India. *Indian J Med Res* 2014;139:454-8.
7. Beau A-B, Hurault-Delarue C, Vial T, Montastruc J-L, Damase-Michel C, Lacroix I. Safety of oseltamivir during pregnancy: a comparative study using the EFEMERIS database. *BJOG.* 2014 Jun;121(7):895-900.
8. Svensson T, Granath F, Stephansson O, Kieler H. Birth outcomes among women exposed to neuraminidase inhibitors during pregnancy. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2011;20:1030–4.
9. Greer LG, Sheffield JS, Rogers VL, Roberts SW, McIntire DD, Wendel GD Jr. Maternal and neonatal outcomes after antepartum treatment of influenza with antiviral medications. *Obstet Gynecol* 2010;115:711–16.
10. Xie H, Yasseen AS III, Xie R, Fell DB, Sprague AE, Liu N, et al. Infant outcomes among pregnant women who used oseltamivir for treatment of influenza during the H1N1 epidemic. *Am J Obstet Gynecol* 2013;208:293.e1–7.

11. Saito S, Minakami H, Nakai A, Unno N, Kubo T, Yoshimura Y. Outcomes of infants exposed to oseltamivir or zanamivir in utero during pandemic (H1N1) 2009. *Am J Obstet Gynecol* 2013;209:130.e1–9.
12. Nieto-Pascual L, Arjona-Berral JE, Marín-Martín EM, Munoz-Gomariz E, Ilich I, Castelo-Branco C. Early prophylactic treatment in pregnant women during the 2009–2010 H1N1 pandemic: obstetric and neonatal outcomes. *J Obstet Gynaecol* 2013;33:128–34
13. Wollenhaupt M, Chandrasekaran A, Tomianovic D. The safety of oseltamivir in pregnancy: an update review of post-marketing data. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2014;doi: 10.1002/pds.3673
14. Jefferson T, Demicheli V, Rivetti D, Jones M, Di Pietrantonj C, Rivetti A. Antivirals for influenza in healthy adults: systematic review. *Lancet* 2006;367(9507):303-13.
15. Dunstan HJ, Mill AC, Stephens S, Yates LM, Thomas SHL. Pregnancy outcome following maternal use of zanamivir or oseltamivir during the 2009 influenza A/H1N1 pandemic: a national prospective surveillance study. *BJOG.* 2014 Jun;121(7):901-6.
16. Reshet'ko OV, Lutsevich KA, Sanina II. Peculiarities and clinical significance of drug pharmacokinetics and pharmacodynamics during pregnancy. *Eksp Klin Farmakol.* 2014;77(2):35-43.
17. Tanaka T, Nakajima K, Murashima A, Garcia-Bournissen F, Koren G, Ito S. Safety of neuraminidase inhibitors against novel influenza A (H1N1) in pregnant and breastfeeding women. *Canadian Medical Association Journal.* 2009;181(1-2):55-8.
18. Ministério da Saúde do Brasil [internet]. Portal da Saúde. [Acesso em 2011 Nov 26] Disponível em: www.portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21383
19. WHO [internet]. World Health Organization, 2009a. CDC Protocol of Realtime RTPCR for Swine Influenza A (H1N1). [Acesso em 2011 Nov 26] Disponível em http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimeRTPCRprotocol_20090428.pdf

20. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Instruction Manual for completing the Certificate of Live Birth. 2009. p.: il. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
21. Silva AAd, Ranieri TMS, Torres FD, Vianna FSL, Paniz GR, et al. Impact on Pregnancies in South Brazil from the Influenza A (H1N1) Pandemic: Cohort Study. PLoS ONE 2014;9(2): e88624.
22. Greenberg M, Jacobziner H, Pakter J, Weisl BAG. (1958) Maternal mortality in the epidemic of Asian influenza, New York City, 1957. Am J Obstet Gynecol 76:897-902.
23. Freeman DW, Barno A. (1959) Deaths from Asian influenza associated with pregnancy. Am J Obstet Gynecol 78:1172-5.
24. Jamieson DK, Honein MA, Rasmussen SA, Williams JL, Swerdlow DL, Biggerstaff MS et al. H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA. Lancet 2009 Aug 8;374(9688):451-8.
25. Lim ML, Chong CY, Tee WSN, Lim WY, Chee JJ. Influenza A/H1N1 (2009) infection in pregnancy – an Asian perspective. BJOG. 2010 Apr;117(5):551-6.
26. Wallensten A, Oliver I, Lewis D, Harrison S. Compliance and side effects of prophylactic oseltamivir treatment in a school in South West England. Eurosurveillance 2009;14(30):1-4.
27. Kitching A, Roche A, Balasegaram S, Heathcock R, Maguire H. Oseltamivir adherence and side effects among children in three London schools affected by influenza A(H1N1)v, May 2009 – an internet-based cross-sectional survey. Eurosurveillance 2009;14(30):5-9.
28. Shun-Shin M, Thompson M, Heneghan C, Perera R, Harnden A, Mant D. Neuraminidase inhibitors for treatment and prophylaxis of influenza in children: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. British Medical Journal 2009;339:b3172.
29. Khazeni N, Bravata DM, Holty JC, Uyeki TM, Stave CD, Gould MK. Safety and efficacy of extended duration antiviral chemoprophylaxis against pandemic and seasonal influenza. Annals of Internal Medicine 2009;151(7).

Figura 1 – Influenza A (H1N1) no Rio Grande do Sul: casos reportados, confirmados, uso de oseltamivir e seguimentos realizados.



a Sistema de Informação de Agravos de Notificação

b *polymerase chain reaction*

Tabela 1 - Reações adversas ao oseltamivir em gestantes com H1N1 confirmada e com H1N1 descartada

	H1N1 + (n = 86)		Não-H1N1 (n = 51)		OR (IC 95%) ¹
	n	%	n	%	
Reações Adversas	37	43,0	32	62,7	0,45 (0,21-0,97) ²
Vômitos	16	43,2	13	40,6	0,78 (0,32-1,94)
Náuseas	14	37,8	20	62,5	0,36 (0,15-0,86) ³
Dor abdominal	12	32,4	10	31,2	0,77 (0,28-2,12)
Diarreia	16	43,2	08	25,0	1,42 (0,52-3,99)
Sonolência	15	40,5	16	50,0	0,55 (0,23-1,32)
Confusão	08	21,6	05	15,6	1,08 (0,30-4,07)
Tonturas	20	54,0	10	31,2	1,45 (0,58-3,71)
Cefaleia	20	54,0	18	56,2	0,66 (0,29-1,51)
Irritabilidade	12	32,4	05	15,6	1,71 (0,52-6,00)
Comportamento estranho	02	5,4	01	3,0	1,35 (0,09-38,62)
Outras reações ⁴	05	13,5	01	3,0	3,51 (0,38-81,6)

1 Teste exato de Fisher 2 p = 0,02 3 p<0,01

4 Outras reações incluíram relatos de tremores ou edema de extremidades, insônia epistaxe, dor lombar, alucinações, tosse e hepatite medicamentosa

Tabela 2 – Características clínicas apresentadas pelas gestantes com sintomas suspeitos de Influenza A e desfechos gestacionais em relação ao uso de Oseltamivir no Rio Grande do Sul.

	Uso de Oseltamivir		Sem oseltamivir		OR (IC 95%) ¹	P
	(n = 221)		(n = 23)			
	N	%	N	%		
Internação hospitalar	120	54,3	16	69,5	0,52 (0,19-1,41)	-
Ventilação mecânica	39	17,6	10	43,5	0,17 (0,06-0,51)	0,0006
Uso de antibiótico	79	35,7	14	60,7	0,16 (0,04-0,54)	<0,005
Óbitos maternos	16	7,2	8	34,8	0,14 (0,04-0,42)	0,0003
Abortos	2	0,9	1	4,3	0,21 (0,01-6,10)	-
Partos pré-termo (<37 sem)	38	17,1	7	30,4	0,47 (0,17-1,37)	-
Natimortos	5	2,2	3	13,0	0,15 (0,03-0,89)	0,03

¹Teste exato de Fisher

Capítulo VI – Artigo 3

Avaliação de efeitos do Oseltamivir nas crianças expostas intra-útero durante a pandemia de Influenza A H1N1 de 2009: uma série de casos.

Manuscrito em elaboração

Avaliação de efeitos do Oseltamivir nas crianças expostas intra-útero durante a pandemia de Influenza A H1N1 de 2009: uma série de casos.

André Anjos da Silva^{1,2}, Camila Heck¹, Fernanda Duarte Torres¹, Fernanda Sales Luiz Vianna^{1,3}, Graziella Rangel Paniz¹, Paula Baptista Sanseverino¹, Pietro Baptista de Azevedo¹, Bruno Goldani¹, Maria Teresa Vieira Sanseverino^{1,2}, Lavinia Schuler Faccini^{1,2}

(1) Serviço de Informação sobre Agentes Teratogênicos, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

(2) Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

(3) Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RESUMO

INTRODUÇÃO: as gestantes são consideradas um grupo de risco para complicações relacionadas ao vírus Influenza H1N1. O único tratamento específico conhecido é o uso do oseltamivir, um inibidor da neuraminidase. Estudos em modelos animais demonstraram neurotoxicidade provavelmente relacionada à imaturidade da barreira hemato-encefálica, gerando preocupação sobre possíveis efeitos neuro-comportamentais em fetos humanos expostos durante a gravidez.

OBJETIVO: descrever o desenvolvimento neuropsicomotor e possíveis comorbidades existentes nas crianças expostas durante a gravidez ao oseltamivir na pandemia de Influenza A H1N1 de 2009, no Rio Grande do Sul.

MÉTODOS: série de casos com o seguimento de filhos de gestantes com exposição ao vírus H1N1 e ao tratamento com Fosfato de Oseltamivir durante a pandemia de Influenza A H1N1 de 2009 e notificadas ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Influenza (SINAN-Influenza). Foram avaliados fatores maternos, gestacionais e de desenvolvimento neuropsicomotor das crianças expostas.

RESULTADOS: Cinquenta e dois seguimentos com crianças expostas ao oseltamivir no período intrauterino foram incluídos nesse estudo. Trinta e uma crianças eram do sexo masculino e as idades variaram entre 36 e 47 meses. Atrasos afetando dois ou mais marcos do desenvolvimento foram relatados em 10 (19,2%) crianças. Não houve diferença entre crianças com e sem atraso do desenvolvimento quanto aos fatores investigados.

CONCLUSÃO: esse estudo demonstrou taxa de atraso do desenvolvimento em crianças expostas durante a gravidez ao oseltamivir acima da esperada para a população geral. No entanto, análises futuras são necessárias para melhorar a solidez desses achados.

PALAVRAS-CHAVE: oseltamivir, gestação, neurodesenvolvimento.

INTRODUÇÃO

O surgimento de um novo subtipo do vírus influenza, no final de março de 2009, chamou a atenção da comunidade médica internacional, da mídia e da população em geral. A epidemia de influenza A (H1N1) teve início no México, e expandiu-se rapidamente para países do mundo inteiro¹.

As gestantes são consideradas um grupo de risco para complicações graves relacionadas ao vírus influenza H1N1. Os estudos a respeito das consequências para a gestação e para o feto, tanto da gripe quanto do seu tratamento ainda são pouco conhecidos.

Ainda que o quadro clínico em gestantes seja semelhante ao da população geral, é reconhecido que a infecção adquirida no terceiro trimestre, início tardio do tratamento antiviral e a presença de comorbidades são fatores de alto risco para o desenvolvimento de um quadro clínico grave².

O tratamento da síndrome gripal envolve, na maioria dos casos, uso de fármacos para alívio sintomático^{3,4}. Na prática clínica não é habitual a terapia diretamente ao agente etiológico, tendo em vista o elevado custo da medicação e a falta de análises de custo-efetividade para seu uso indiscriminado.

O fosfato de oseltamivir é um pró-fármaco éster etil que não possui atividade antiviral, e que, após metabolização pelo fígado e trato gastrointestinal, é transformado em carboxilato de oseltamivir e assim torna-se seletivo contra o vírus influenza dos tipos A e B. A principal característica do seu modo de ação é a inibição seletiva de neuraminidase, glicoproteína de liberação dos vírions, ou seja, ele impede a saída do vírus de uma célula para outra.

A atual recomendação do Ministério de Saúde é de que qualquer paciente portador de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) deve receber o medicamento oseltamivir o mais cedo possível, dentro das primeiras 48 horas após o início de sintomas. O fármaco deve ser administrado na dose de 75 mg, duas vezes ao dia, por cinco dias, para adultos. No caso de gestantes, o medicamento deve ser prescrito se os benefícios superarem o risco sob julgamento médico⁵.

Recentemente, alguns estudos têm investigado os potenciais efeitos adversos no feto do uso de inibidores de neuraminidase durante a gestação. Esses estudos não encontraram aumento no risco de bebês pequenos para a idade gestacional, baixo peso ao nascimento, parto prematuro, malformações congênitas e natimortos⁶⁻¹¹.

O Oseltamivir é liberado para uso na profilaxia e tratamento da Influenza em crianças maiores de um ano de idade. Seu uso em crianças abaixo de 12 meses é ainda motivo de preocupação. Informações do próprio fabricante contra-indicam o uso nessa faixa etária, baseado em estudos pré-clínicos realizados em ratos, que observaram neurotoxicidade¹².

A despeito das informações apresentadas pelo fabricante, o uso desse medicamento em pacientes menores de um ano é realizado em bebês gravemente doentes, ou considerados como de alto risco para complicações da infecção pelo vírus Influenza. Estudos realizados até o momento não comprovam associação do uso do Oseltamivir com efeitos neurológicos em crianças menores de um ano de idade. No entanto, o número limitado e o tamanho amostral pequeno desses estudos mantêm a necessidade de melhor avaliação dos efeitos desse fármaco nessa população¹³.

O objetivo desse estudo foi descrever o desenvolvimento neuropsicomotor e possíveis comorbidades existentes nas crianças expostas durante a gravidez ao oseltamivir na pandemia de Influenza A H1N1 de 2009, no Rio Grande do Sul.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de uma série de casos que avaliou filhos de gestantes com exposição ao vírus H1N1 e ao tratamento com Fosfato de Oseltamivir durante a pandemia de Influenza A H1N1 de 2009. A amostra inicial consistiu nas gestantes com sintomas suspeitos de Influenza A notificadas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Influenza (SINAN-Influenza), durante a epidemia de 2009, banco de dados do estado do Rio Grande do Sul.

A confirmação da infecção e detecção de subtipo viral foi realizada, quando possível, através de amostra biológica única (swab nasofaríngeo) para realização de RT-PCR (real time – polymerase chain reaction), conforme o

Protocolo RTPCR para detecção e caracterização da Influenza Suína do Centers for Disease Control and Prevention (CDC)¹⁴.

Detalhamento adicional da amostra pode ser consultado em publicação anterior do nosso grupo¹⁵.

O seguimento dos desfechos das gestações foi realizado via telefone, entre os meses de abril e agosto de 2013, por uma equipe treinada, incluindo uma psicóloga. No início da entrevista telefônica, foi solicitado consentimento para a confirmação das informações disponíveis no cadastro do SINAN-Influenza e coleta de novos dados a respeito do resultado da gestação e desenvolvimento da criança.

Foram avaliados parâmetros clínicos relativos à gestação (idade gestacional na notificação, resultado do PCR, outros medicamentos em uso, complicações clínicas, consanguinidade, comorbidades maternas, tipo de parto) e relativos ao recém-nascido (prematividade, baixo peso, presença de malformações congênitas, complicações neonatais) e seu desenvolvimento (marcos de desenvolvimento neuropsicomotor, comorbidades apresentadas e uso de medicações).

O desenvolvimento neuropsicomotor foi avaliado com base na informação a respeito dos principais marcos de desenvolvimento e seus períodos esperados de aparecimento na criança. Esses marcos constam nas escalas de avaliação correntemente em uso e foram adaptados para a população brasileira, sendo parte integrante da Ficha de Acompanhamento do Desenvolvimento do Ministério da Saúde do Brasil¹⁶.

Os principais marcos do desenvolvimento avaliados e suas idades de incidência esperadas são, respectivamente: sustento cefálico (2 a 5 meses), sentar sem apoio (5 a 10 meses), caminhar (10 a 15 meses) e falar palavras com sentido (9 a 15 meses)¹⁶.

Os dados desse estudo foram analisados utilizando-se métodos descritivos.

RESULTADOS

Durante a epidemia de Influenza A H1N1, em 2009, foi informado ao SINAN – Influenza, banco de dados do estado do Rio Grande do Sul, 589 casos de gestantes com suspeita de infecção pelo vírus.

Cinquenta e dois seguimentos com crianças expostas ao oseltamivir no período intra-uterino foram incluídos nesse estudo.

Trinta e uma crianças eram do sexo masculino e 21 do sexo feminino. As idades no momento do seguimento variaram entre 36 e 47 meses.

Atraso em qualquer marco do desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM) foi registrado em 27 crianças (51,9%). Atraso isolado na fala foi observado em 11 crianças, e seis apresentaram-se apenas com atraso no início da deambulação. Atrasos mais consistentes, afetando dois ou mais marcos foram relatados em 10 pacientes (19,2%) (Tabela 1).

A caracterização dos fatores de risco gestacionais e do quadro clínico relacionado à síndrome gripal apresentada pelas gestantes está descrita na Tabela 2. Não houve diferença significativa nos fatores de risco entre crianças com atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) e com desenvolvimento normal.

O período gestacional de exposição ao oseltamivir foi principalmente no segundo e terceiro trimestres (96,2%).

As amostras biológicas com realização de PCR resultaram em Influenza A (H1N1) para 23 (44,2%) pacientes, Negativo para Influenza A em 13 (25%) e Influenza A sazonal em 3 (5,8%).

Consanguinidade foi relatada em dois seguimentos. Exposição gestacional ao tabagismo foi observada em 9 pacientes e ao álcool em 6 pacientes. Comorbidades maternas relatadas foram asma (n=8), diabetes (n=3) e hipertensão arterial (n=2).

As características do nascimento e relatos de crise convulsiva das crianças com seguimento realizado estão na Tabela 3. Não houve diferença entre crianças com e sem atraso do desenvolvimento nos desfechos descritos.

Parto pré-termo (<37 semanas) foi observado em 9 (17,3%) crianças. Cesárea de emergência foi necessária em 13 (25%) gestantes. Baixo peso ao nascer (<2500g) foi observado em 3 (5,8%) recém-nascidos.

Crises convulsivas estavam presentes em duas crianças (3,8%) nos seguimentos realizados, sendo que em apenas uma delas associa-se também ADNPM. Não houve descrição de malformações ou outras comorbidades nas crianças avaliadas.

Os detalhes da historia gestacional, apresentação clínica do quadro gripal materno, desfechos perinatais e de desenvolvimento infantil das 10 crianças observadas com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (com dois ou mais marcos afetados) estão na Tabela 4.

DISCUSSÃO

Observando-se as pandemias e epidemias anteriores, e até mesmo a influenza sazonal, identificam-se as gestantes como grupo de risco, apresentando maior morbidade e mortalidade. A taxa de hospitalização entre as gestantes chegou a ser cerca de quatro vezes maior que na população em geral durante a pandemia do ano 2009¹⁷.

Sendo assim, o uso de fármacos antivirais, como o oseltamivir, vem sendo estudado de forma consistente apenas recentemente e mostram-se seguros quando utilizados em gestantes¹⁸. Um estudo encontrou eventos adversos gastrointestinais (40%) e neuropsiquiátricos (18%) em crianças usando o medicamento como profilaxia para influenza A (H1N1)¹⁹.

Em modelos animais observou-se que uma única dose de Oseltamivir de 1000mg/kg (cerca de 250 vezes a dose recomendada em crianças) em ratos com 7 dias de vida resultou em um excesso de mortes associadas com a exposição ao pró-fármaco e ao metabólito ativo do fármaco. A concentração do pró-fármaco em ratos juvenis foi aproximadamente 1500 vezes maior do que a observada em animais adultos, sugerindo que esses efeitos adversos possam estar relacionados à imaturidade da barreira hemato-encefálica ou ao sistema imaturo de conversão do pró-fármaco em metabólito ativo nos animais jovens¹².

Atraso do desenvolvimento ocorre em até 15% das crianças abaixo de cinco anos de idade. Isso inclui atraso na fala e desenvolvimento da linguagem, desenvolvimento motor, desenvolvimento sócio-emocional e cognitivo²⁰. Nosso trabalho investigou os desfechos de neurodesenvolvimento nas crianças expostas no período gestacional ao oseltamivir. Da amostra de 52 seguimentos

realizados, ADNPM foi observado em 27 crianças (51,9%), e em dez casos (19,2%) esse atraso ocorreu em pelo menos dois marcos, acima do limite superior de 15% esperado na faixa etária pediátrica (até 5 anos de idade).

A verificação do desenvolvimento infantil baseado no início das habilidades neuropsicomotoras é uma forma simplificada de avaliação. Há uma grande variabilidade individual entre as crianças e uma ampla faixa de idade considerada normal para a aquisição de um determinado marco^{17,20}. Sendo assim, não podemos atribuir demasiada importância a um único marco atrasado, mas sim avaliar as habilidades em conjunto. Para tanto, buscamos avaliar de forma mais detalhada apenas aquelas crianças nas quais dois ou mais marcos do desenvolvimento apresentaram-se com atraso.

Também, para fins de comparação, apresentamos as características maternas, gestacionais e perinatais da amostra de uma forma subdividida entre crianças com e sem atraso de desenvolvimento. Não houve diferença entre os dois grupos nos desfechos descritos. As frequências de prematuridade e de baixo peso ao nascimento estão dentro do esperado para a população brasileira^{21,22}.

Por tratar-se de uma amostra de conveniência, nossa análise ainda necessita de comparações com um grupo controle de crianças nascidas de mães que apresentaram o mesmo quadro gripal, mas sem exposição intra-útero ao oseltamivir. Essa avaliação aponta-se como uma perspectiva para melhorar o poder dessa análise e eliminar os fatores confundidores. Além disso, a aplicação de escalas de avaliação de desenvolvimento apropriadas deve ser a principal melhoria a ser incorporada nessa análise.

Em conclusão, esse estudo demonstrou taxa de atraso do desenvolvimento em crianças expostas intra-útero ao fármaco oseltamivir muito acima da esperada para a população geral. No entanto, análises futuras são necessárias para melhorar o poder e a solidez desses achados.

REFERÊNCIAS

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of swine-origin influenza A(H1N1) virus infection-Mexico, march-april 2009. *MMWR - Morbidity and Mortality Weekly Report* 2009;58(17):467-70.
2. Singhal S, Sarda N, Arora R, Punia N, Jain A. Clinical profile & outcome of H1N1 infected pregnant women in a tertiary care teaching hospital of northern India. *Indian J Med Res* 2014;139:454-8.
3. Dolin R. Prevention and treatment of influenza. 2002. UpToDate Software, version 10.3. <http://www.uptodate.com>
4. Mossad SB. Treatment of the common cold. *BMJ*. 1998;317:33-36.
5. ANVISA. Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo de Manejo Clínico e Vigilância Epidemiológica da Influenza, versão III. 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/influenza/arquivos/protocolomanejoclinico.pdf>.
6. Beau A-B, Hurault-Delarue C, Vial T, Montastruc J-L, Damase-Michel C, Lacroix I. Safety of oseltamivir during pregnancy: a comparative study using the EFEMERIS database. *BJOG*. 2014 Jun;121(7):895-900.
7. Svensson T, Granath F, Stephansson O, Kieler H. Birth outcomes among women exposed to neuraminidase inhibitors during pregnancy. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2011;20:1030-4.
8. Greer LG, Sheffield JS, Rogers VL, Roberts SW, McIntire DD, Wendel GD Jr. Maternal and neonatal outcomes after antepartum treatment of influenza with antiviral medications. *Obstet Gynecol* 2010;115:711-16.
9. Xie H, Yasseen AS III, Xie R, Fell DB, Sprague AE, Liu N, et al. Infant outcomes among pregnant women who used oseltamivir for treatment of influenza during the H1N1 epidemic. *Am J Obstet Gynecol* 2013;208:293.e1-7.
10. Saito S, Minakami H, Nakai A, Unno N, Kubo T, Yoshimura Y. Outcomes of infants exposed to oseltamivir or zanamivir in utero during pandemic (H1N1) 2009. *Am J Obstet Gynecol* 2013;209:130.e1-9.

11. Nieto-Pascual L, Arjona-Berral JE, Marín-Martín EM, Muñoz-Gomariz E, Ilich I, Castelo-Branco C. Early prophylactic treatment in pregnant women during the 2009–2010 H1N1 pandemic: obstetric and neonatal outcomes. *J Obstet Gynaecol* 2013;33:128–34
12. Okamoto S, Kamiya I, Kishida K, Shimakawa T, Fukui T, Morimoto T. Experience with oseltamivir for infants younger than 1 year old in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:575–576.
13. Kimberlin DW, Shalabi M, Abzug MJ, Lang D, Jacobs RF, Storch G, et al. Safety of oseltamivir compared with the adamantanes in children less than 12 months of age. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(3):195-8.
14. World Health Organization. CDC Protocol of Realtime RTPCR for Swine Influenza A (H1N1). World Health Organization, Geneva. 2009. Retirado de http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDC_realtimeRT_PCRprotocol_20090428.pdf [Acessado em 26/11/2011]
15. Silva AAd, Ranieri TMS, Torres FD, Vianna FSL, Paniz GR, et al. Impact on Pregnancies in South Brazil from the Influenza A (H1N1) Pandemic:Cohort Study. *PLoS ONE* 2014;9(2): e88624.
16. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Saúde da criança: acompanhamento do crescimento e desenvolvimento infantil. 2002. Série Cadernos de Atenção Básica; n. 11. Série A. Normas e Manuais Técnicos.
17. Jamieson DK, Honein MA, Rasmussen SA, Williams JL, Swerdlow DL, Biggerstaff MS et al. H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA. *Lancet* 2009 Aug 8;374(9688):451-8.
18. Wollenhaupt M, Chandrasekaran A, Tomianovic D. The safety of oseltamivir in pregnancy: an update review of post-marketing data. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2014:doi: 10.1002/pds.3673
19. Kitching A, Roche A, Balasegaram S, Heathcock R, Maguire H. Oseltamivir adherence and side effects among children in three London schools affected by influenza A(H1N1)v, May 2009 – an internet-based cross-sectional survey. *Eurosurveillance* 2009;14(30):5-9.
20. Oberklaid F, Efron D. Developmental delay--identification and management. *Aust Fam Physician*. 2005;34(9):739-42.

21. Silveira MF, Matisajevich A, Horta BL, Bettiol H, Barbieri MA, Silva AA, et al. Prevalência de nascimentos pré-termo por peso ao nascer: revisão sistemática. Rev Saúde Pública 2013;47(5)992-1000.
22. Viana JK, Taddei JAAC, Cocetti M, Warkentin S. Peso ao nascer de crianças brasileiras menores de dois anos. Cad. Saúde Pública 2013;29(2):349-356.

Tabela 1 – Número de marcos afetados nas 52 crianças avaliadas

	N	%
ADNPM ¹ em apenas um marco		
Falar	11	21,1
Caminhar	6	11,5
ADNPM ¹ em dois marcos	5	9,6
ADNPM ¹ em três ou quatro marcos	5	9,6

¹Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor

Tabela 2 – Características gestacionais e do quadro clínico materno das crianças expostas ao oseltamivir.

	Crianças com ADNPM ¹ (n = 27)		Crianças sem ADNPM ¹ (n = 25)		Total	
	N	%	N	%	N	%
Trimestre gestacional de exposição ao Oseltamivir						
Primeiro (0-11 sem)	1	3,7	1	4,0	2	3,8
Segundo (12-23sem)	10	37,0	7	28,0	17	32,7
Terceiro (≥24 sem)	16	59,3	17	68,0	33	63,5
Resultado do PCR						
Influenza A (H1N1)	13	48,1	10	40,0	23	44,2
Negativo para Influenza A	6	22,2	7	28,0	13	25,0
Influenza A sazonal	2	7,4	1	4,0	3	5,8
Internação hospitalar	17	62,9	20	80,0	37	71,1
Ventilação mecânica	9	33,3	2	8,0	11	21,1
Uso de antibiótico	11	40,7	10	40,0	21	40,4
Consanguinidade	2	7,4	0	0,0	2	3,8
Tabagismo	7	25,9	2	8,0	9	17,3
Uso de álcool	3	11,1	3	12,0	6	11,5
Comorbidades						
Asma	5	18,5	3	12,0	8	15,4
Diabetes	1	3,7	2	8,0	3	5,8
Hipertensão arterial	2	7,4	0	0,0	2	3,8

¹Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor

Tabela 3 – Características dos desfechos gestacionais da amostra.

	Crianças com ADNPM ¹ (n = 27)		Crianças sem ADNPM ¹ (n = 25)		Total	
	N	%	N	%	N	%
Sexo masculino	18	66,6	13	52,0	31	59,6
Parto pré-termo (<37 sem)	7	25,9	2	8,0	9	17,3
Parto normal	8	29,6	13	52,0	21	40,3
Cesárea de emergência	10	37,0	3	12,0	13	25,0
Baixo peso ao nascimento (<2500g)	3	11,1	0	0,0	3	5,8
Crise convulsiva	1	3,7	1	4,0	2	3,8

¹Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor

Tabela 4 – Caracterização das dez crianças com atraso no desenvolvimento neuropsicomotor em dois ou mais marcos.

Caso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sexo	F	F	F	M	M	M	F	F	F	M
Idade (meses)	46	40	37	40	43	39	46	40	44	47
Período de exposição ao oseltamivir (Idade gestacional em semanas)	28	14	14	17	34	23	22	32	22	32
PCR ¹	Inf A Sazonal ²	Inf A H1N1 ³	Neg Inf A ⁴	Inf A H1N1 ³	Inf A H1N1 ³	Neg Inf A ⁴	NI	Inf A H1N1 ³	NI	Neg Inf A ⁴
Internação hospitalar	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Ventilação mecânica	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
Uso de antibiótico	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Tabagismo	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Álcool	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Comorbidade materna	-	-	-	-	asma	asma	asma hipertensão	-	-	asma
Duração da gestação (semanas)	28	24	36	38	38	39	NI	41	39	38
Tipo de parto	PN	CEM	CEM	PN	CEL	NI	CEM	CEM	CEL	PN
Peso ao nascimento (gramas)	3200	1955	3070	3155	3685	2955	2595	4080	3100	2500
APGAR 1'	NI	NI	NI	9	NI	8	NI	6	9	NI
APGAR 5'	NI	NI	NI	NI	NI	9	NI	9	10	NI
Sustento cefálico (meses) (esperado = 2 a 5m)	NI	6	6	5	11	6	6	5	3	8
Sentar (meses) (esperado = 5 a 10m)	24	12	10	18	14	8	8	8	7	9
Caminhar (meses) (esperado = 10 a 15m)	30	24	18	16	18	14	12	18	17	12
Falar palavras (meses) (esperado = 9 a 15m)	24	36	12	18	28	24	16	18	12	18
Crise convulsiva	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

¹ Polymerase chain reaction; ²Influenza A Sazonal; ³Influenza A (H1N1); ⁴Negativo para Influenza A

Abreviações: F = feminino; M = masculino; NI = não informado;

PN = parto normal; CEM = cesárea de emergência; CEL = cesárea eletiva

7. DISCUSSÃO

Este trabalho abordou como questão central o desfecho das gestações expostas ao vírus Influenza A (H1N1) e, conseqüentemente, ao seu tratamento com o fármaco oseltamivir durante a pandemia do ano 2009.

O vírus influenza A H1N1 é produto de vários rearranjos genéticos entre cepas dos vírus influenza previamente circulantes, alguns destes exclusivos de suínos ou de aves, e que se tornaram capazes de infectar humanos (Webster et al., 1992; Medina & García-Sastre, 2011).

As gestantes são consideradas um grupo de risco para complicações graves relacionadas ao vírus influenza H1N1, com grande morbidade e mortalidade observadas em epidemias anteriores do vírus Influenza (Tanaka et al., 2009; Raj et al., 2014). Quanto aos efeitos sobre o embrião-feto, os estudos a respeito do potencial teratogênico do vírus influenza ainda são limitados. O único tratamento específico conhecido, respaldado por evidências recentes, é o uso de inibidores da neuraminidase, zanamivir e oseltamivir, dos quais apenas o último está disponível no Brasil.

Análises dos efeitos do vírus Influenza A H1N1 sobre a gestação, durante a pandemia de 2009, focaram-se primariamente na mortalidade e morbidade maternas, em parte devido ao imediatismo da pandemia e da rapidez com que as séries de casos foram publicadas. O seguimento das mulheres após a admissão hospitalar, com foco nos desfechos gestacionais, ainda não tem sido inteiramente investigado. Nesse contexto, entre os estudos realizados a respeito dessa pandemia, alguns poucos se dedicaram também a explorar os desfechos das gestações e as informações sobre os recém-nascidos (Tabela 4 da seção Introdução).

No presente trabalho, foi realizado um estudo de coorte prospectivo não controlado que avaliou gestantes com exposição ao vírus H1N1 e ao tratamento com Fosfato de Oseltamivir. A amostra consistiu nas gestantes com sintomas suspeitos de Influenza A notificadas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Influenza (SINAN-Influenza, base de dados do estado do Rio Grande do Sul).

O artigo 1 teve como objetivo avaliar os desfechos e os possíveis efeitos teratogênicos das gestações expostas ao vírus Influenza A (H1N1) durante a pandemia de 2009. Sendo assim, apresentou as características clínicas do quadro gripal das gestantes, suas complicações e, especialmente, os dados a respeito dos desfechos gestacionais e dos recém-nascidos dessa coorte exposta.

Analisando os resultados, os desfechos gestacionais e maternos quase não se mostraram alterados quando correlacionados com o vírus Influenza A H1N1. Esses achados diferem de outros estudos realizados recentemente, os quais demonstram desfechos gestacionais desfavoráveis quando na presença de infecção materna pelo vírus H1N1 (Pierce et al., 2011; Mendez-Figueroa et al., 2011). Esse estudo pode ter sido incapaz de detectar desfechos gestacionais negativos devido ao tamanho amostral associado à gravidade da doença presente em ambos os grupos de comparação. Nos estudos anteriormente citados, que mostraram piores desfechos, a comparação foi realizada entre gestantes infectadas por H1N1 *versus* gestantes saudáveis, enquanto na nossa análise houve a comparação entre gestantes com H1N1 *versus* gestantes com quadro clínico semelhante não-H1N1. Entretanto, embora não tenha sido verificada diferença estatisticamente significativa, nota-se, em nossa análise, que a taxa de óbitos maternos no grupo H1N1 foi o dobro do grupo não-H1N1.

O artigo 2, utilizando-se da mesma coorte, teve como objetivo avaliar os potenciais efeitos adversos da medicação em gestantes expostas ao oseltamivir durante a pandemia de Influenza A H1N1 de 2009 no estado do Rio Grande do Sul. Em nossa análise, houve um maior número de reações adversas relatadas em pacientes não-H1N1 após o uso do oseltamivir. Além disso, informações adicionais foram obtidas a respeito da segurança do oseltamivir tendo em vista que não houve relato de nenhuma complicação maior ou malformação entre os desfechos das gestantes que utilizaram esse fármaco. Esses dados estão de acordo com estudos recentes que têm investigado os potenciais efeitos adversos no feto do uso de inibidores de neuraminidase durante a gestação sem demonstrar aumento no risco de desfechos adversos (Beau A-B et al., 2014; Xie et al., 2013; Nieto-Pascual et al., 2013). Por outro lado, os desfechos maternos

(incluindo óbitos) e gestacionais (frequência de natimortos) mostraram-se mais graves em pacientes que não utilizaram o fármaco oseltamivir, provavelmente pela gravidade do quadro clínico apresentado sem tratamento adequado. Essa observação adiciona informação importante para a tomada de decisão no momento da escolha sobre o tratamento de uma gestante com quadro gripal.

A seguir, o artigo 3 toma como base teórica os possíveis efeitos neurológicos em crianças expostas ao fármaco oseltamivir intra-útero (Okamoto et al., 2005; Kimberlin et al., 2010). Acompanhando essa mesma coorte de gestações expostas ao vírus Influenza A (H1N1) e ao seu tratamento durante a pandemia de 2009, realizamos os seguimentos de 52 filhos dessas pacientes avaliando seus marcos de desenvolvimento neuropsicomotor e possíveis efeitos ou condições neurológicas relatadas. Atrasos afetando dois ou mais marcos do desenvolvimento foram relatados em 10 (19,2%) pacientes. Esse estudo demonstrou taxa de atraso do desenvolvimento em crianças expostas durante a gravidez ao oseltamivir acima da esperada para a população geral. Essas observações devem ser confirmadas por estudos futuros com controle apropriado e seguimento a longo prazo. Entretanto, levantam preocupação, uma vez que o oseltamivir tem efeito sobre o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) em modelos animais. Além disso, os períodos gestacionais de uso predominante do fármaco (2º e 3º trimestres) são os de maior risco para efeitos neurocomportamentais.

Finalmente, destaca-se a importância desses dados devido ao grande número de desfechos que puderam ser avaliados nesse estudo e reforçam dados de segurança já publicados em outros trabalhos. Espera-se que o presente trabalho seja capaz de contribuir para um melhor entendimento a respeito do potencial teratogênico do vírus Influenza A (H1N1) e de seu tratamento com o fármaco oseltamivir.

Capítulo VIII – Perspectivas

8. PERSPECTIVAS

A realização desse projeto permitiu compreender a importância da avaliação dos possíveis efeitos teratogênicos de condições e fármacos comuns que afetam um grande número de pacientes, especialmente em situações atípicas como foi a pandemia de Influenza A (H1N1) ocorrida em 2009.

Estudos futuros serão decisivos no estabelecimento de condutas clínicas no que diz respeito ao tratamento e manejo geral dessa condição em grupos específicos de pacientes.

Nesse contexto, destacam-se:

- Avaliação de condutas preventivas para gestantes, com especial atenção para programas de imunização que se configuram como um grande desafio de saúde pública.

- Seguimento e avaliação a longo prazo de crianças expostas ao fármaco oseltamivir na busca de dados de segurança dessa droga nesse grupo de pacientes.

Desse modo, o término dessa tese de Doutorado abre perspectivas relevantes e importantes para o prosseguimento dessa linha de pesquisa nas diferentes áreas abordadas, seja nos aspectos clínicos, farmacológicos ou epidemiológicos do vírus Influenza e de seu tratamento.

Capítulo IX – Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Ghafar AN, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Hayden FG, Nguyen DH, de Jong MD, et al. (2008) Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans. *N Engl J Med* 358(3):261-73.

ANVISA (2009). Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo de Manejo Clínico e Vigilância Epidemiológica da Influenza, versão III. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/influenza/arquivos/protocolo_manejo_clinico.pdf.

Australian and New Zealand Intensive Care Influenza Investigators, Australasian Maternity Outcomes Surveillance System (2010) Critical illness due to 2009 A/H1N1 influenza in pregnant and postpartum women: population based cohort study. *BMJ* 340:c1279.

Beau A-B, Hurault-Delarue C, Vial T, Montastruc J-L, Damase-Michel C, Lacroix I. (2014) Safety of oseltamivir during pregnancy: a comparative study using the EFEMERIS database. *BJOG*. 121(7):895-900.

Bercini M, Ranieri T, Porto MA, Müller DP, Mohrdieck R (2011) Medidas de Enfrentamento, Prevenção e Controle da Influenza no Estado do Rio Grande do Sul. *Boletim Epidemiológico*. Secretaria da Saúde. Governo do Estado do Rio Grande do Sul. 13:1-4.

Broughton DE, Beigi RH, Switzer GE, Raker CA, Anderson BL. Obstetric health care workers' attitudes and beliefs regarding influenza vaccination in pregnancy. *Obstet Gynecol*, 2009; 114(5):981-7.

CDC (2009a). United States Center for Disease Control and Prevention. Interim guidance for clinicians on identifying and caring for patients with swine-origin influenza A(H1N1) vírus infection. Disponível em: <http://www.cdc.gov/swineflu/identifyingpatients.htm>

CDC (2009b). United States Center for Disease Control and Prevention. Interim guidance on specimen collection, processing, and testing for patients with suspected swine-origin influenza A(H1N1) vírus infection. Disponível em: <http://www.cdc.gov/h1n1flu/specimencollection.htm>

CDC (2009c). United States Center for Disease Control and Prevention. Interim guidance on antiviral recommendations for patients with novel influenza A(H1N1) vírus infection under close contacts. Disponível em: <http://www.cdc.gov/h1n1flu/recommendations/htm>

CDC (2009d). United States Center for Disease Control and Prevention. Interim guidance for clinicians on the prevention and treatment of swine-origin influenza vírus infection in young children. Disponível em: <http://www.cdc.gov/swineflu/childrentreatment.htm>

CDC (2009e). Center for Infectious Disease Research and Policy. CDC: H1N1 spreads about as readily as seasonal flu, May 20 2009. Disponível em: <http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/influenza/swineflu/news/may2009attack.html>.

Creanga AA, Johnson TF, Graitcer SB, Hartman LK, Al-Samarrai T, et al. (2010) Severity of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in pregnant women. *Obstet Gynecol* 115:717-26.

Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ et al. (2009) Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 360(25):2605-15.

Dolin R. (2002) Prevention and treatment of influenza. UpToDate Software, version 10.3. <http://www.uptodate.com>

Doyle TJ, Goodin K, Hamilton JJ. (2013) Maternal and neonatal outcomes among pregnant women with 2009 pandemic influenza A(H1N1) illness in Florida, 2009-2010: a population-based cohort study. *PLoS One*. 24;8(10):e79040.

Dubar G, Azria E, Tesniere A, Dupont H, Le Ray C, et al. (2010) French experience of 2009 A/H1N1v influenza in pregnant women. *Plos One* 5:e13112..

Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, Hanage WP, Van Kerkhove MD, Hollingsworth TD, et al. (2009) Pandemic potential o a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science* 324:1557.

Freeman DW, Barno A. (1959) Deaths from Asian influenza associated with pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 78:1172-5.

Garten RJ, Daves CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A et al. (2009) Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325(5937):197-201.

Gérardin P, El Amrani R, Cyrille B, Gabrièle M, Guillermin P, et al. (2010) Low clinical Burden of 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Infection during Pregnancy on the Island of La Réunion. *PLoS ONE* 5: e10896.

Greenberg M, Jacobziner H, Pakter J, Weisl BAG. (1958) Maternal mortality in the epidemic of Asian influenza, New York City, 1957. *Am J Obstet Gynecol* 76:897-902.

Gruslin A, Steben M, Halperin S, Money DM, Yudin MH, Infectious Diseases Committee of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. 2009. Immunization in pregnancy. *J Obstet Gynaecol Can* 31(11):1085-101.

Haberg SE, Trogstad L, Gunnes N, Wilcox AJ, Gjessing HK, et al. (2013) Risk of fetal death after pandemic influenza infection or vaccination during pregnancy. *N Engl J Med* 368: 333-340.

Halloran M, Hayden F, Yang Y, Longini I, Monto A (2007) Antiviral Effects on Influenza Viral Transmission and Pathogenicity: Observations from Household-based Trials. *American Journal of Epidemiology* 165(2):212-221.

Hewagama S, Walker SP, Stuart RL, Gordon C, Johnson PD, et al. (2010) 2009 H1N1 Influenza A and pregnancy outcomes in Victoria, Australia. *Clin Infect Dis* 50:686-90.

Jamieson DJ, Theiler RN, Rasmussen SA. (2006) Emerging infections and pregnancy. *Emerg Infect Dis* 12:1638-43.

Jamieson DK, Honein MA, Rasmussen SA, Williams JL, Swerdlow DL, Biggerstaff MS, et al. (2009) H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA. *Lancet* 451-58.

Jefferson T, Demicheli V, Rivetti D, Jones M, Di Pietrantonj C, Rivetti A. (2006) Antivirals for influenza in healthy adults: systematic review. *Lancet* 367(9507):303-13.

Jiménez MF, El Beitune P, Salcedo MP, Ameln AVV, Mastalir FP, et al. (2010) Outcomes for pregnant women infected with the influenza A (H1N1) virus during the 2009 pandemic in Porto Alegre, Brazil. *Int J Gynecol Obstet* 111:217-19.

Khazeni N, Bravata DM, Holty JC, Uyeki TM, Stave CD, Gould MK. (2009) Safety and efficacy of extended duration antiviral chemoprophylaxis against pandemic and seasonal influenza. *Annals of Internal Medicine* 151(7).

Kilbourne, ED (2006) Influenza pandemics of the 20th century. *Emerging Infectious Diseases*, 12(1):9-14.

Kimberlin DW, Shalabi M, Abzug MJ, Lang D, Jacobs RF, Storch G, et al. (2010) Safety of oseltamivir compared with the adamantanes in children less than 12 months of age. *Pediatr Infect Dis J.* 29(3):195-8.

Kitching A, Roche A, Balasegaram S, Heathcock R, Maguire H. (2009) Oseltamivir adherence and side effects among children in three London schools affected by influenza A(H1N1)v, May 2009 – an internet-based cross-sectional survey. *Eurosurveillance* 14(30):5-9.

Kohen J (2009) Swine flu outbreak. Out of Mexico? Scientists ponder swine-flu's origins. *Science* 324:700.

Lamb, RA (1989) Genes and proteins of the Influenza viruses, p.1-88. In R. M. Krug, H. Fraenkel-Conrat, and R. R. Wagner (ed.). The Influenza viruses. Plenum Pres, New York.

Lim ML, Chong CY, Tee WSN, Lim WY, Chee JJ. (2010) Influenza A/H1N1 (2009) infection in pregnancy – an Asian perspective. *BJOG* 117(5):551-6.

Louie JK, Acosta M, Jamieson DJ, Honein MA. (2010) Severe 2009 H1N1 influenza in pregnant and postpartum women in California. *N Engl J Med* 362:27-35.

Matsuoka Y, Matsumae H, Katoh M, Einfeld AJ, Neumann G, Hase T, et al. (2013) A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC Syst Biol.* 2;7:97.

Medina RA, García-Sastre A (2011) Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol* 9(8):590-603.

Mendez-Figueroa H, Raker C, Anderson BL. (2011) Neonatal characteristics and outcomes of pregnancies complicated by influenza infection during the 2009 pandemic. *American Journal of Obstetrics & Gynecology – Supplement* S58-63.

Ministério da Saúde (2009). Portal da Saúde. Informe Epidemiológico Influenza A (H1N1). Edição nº3. Agosto de 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_influenza_se_31_11_08_2009.pdf

MMWR (2009a) - Outbreak of swine-origin influenza A(H1N1) virus infection-Mexico, march-april 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 58:467.

MMWR (2009b). Hospitalized patients with novel influenza A(H1N1) virus infection – California, April-May 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 58:536.

MMWR (2009c). Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A(H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 58:521.

MMWR (2009d). Update: novel influenza A(H1N1) virus infections – worldwide, May 6 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 58:453.

Mossad SB. (1998) Treatment of the common cold. *BMJ.* 317:33-36.

Neumann G, Noda T, Kawaoka Y (2009) Emergence of pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459: 931.

Nieto-Pascual L, Arjona-Berral JE, Marín-Martín EM, Muñoz-Gomariz E, Ilich I, Castelo-Branco C. (2013) Early prophylactic treatment in pregnant women during

the 2009–2010 H1N1 pandemic: obstetric and neonatal outcomes. *J Obstet Gynaecol* 33:128–34.

Okamoto S, Kamiya I, Kishida K, Shimakawa T, Fukui T, Morimoto T. (2005) Experience with oseltamivir for infants younger than 1 year old in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 24:575–576.

Pasternak B, Svanström H, Molgaard-Nielsen D, Krause TG, Emborg HD, et al. (2012) Risk of Adverse Fetal Outcomes Following Administration of a Pandemic Influenza A (H1N1) Vaccine During Pregnancy. *JAMA* 308(2): 165-174.

Pierce M, Kurinczuk JJ, Spark P, Brocklehurst P, Knight M. (2011) Perinatal outcomes after maternal 2009/H1N1 infection: national cohort study. *British Medical Journal* 342:d3214.

Raj RS, Bonney EA, Phillippe M. (2014) Influenza, Immune System, and Pregnancy. *Reprod Sci.* Jun 4:1-18.

Red Book. (2006) American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases 27. ed. Washington, DC: AAP, 2006.

Reshet'ko OV, Lutsevich KA, Sanina II. (2014) Peculiarities and clinical significance of drug pharmacokinetics and pharmacodynamics during pregnancy. *Eksp Klin Farmakol.* 77(2):35-43.

Rojas-Suarez J, Paternina-Caicedo A, Cuevas L, Angulo S, Cifuentes R, Parra E, et al. (2014) Maternal mortality due to pandemic influenza A H1N1 2009 virus in Colombia. *J Perinat Med.* 42(1):19-26.

Satpathy HS, Lindsay M, Kawwass JF. 2009. Novel H1N1 Virus Infection in Pregnancy. *Postgrad Med* 121(6):106-12

Scholtissek C, Hinshaw VS and Olsen CW, Influenza in pigs and their role as the intermediate host. In: K.G. Nicholson, R.G. Webster and A.J. Hay, Editors, *Textbook of influenza*, Blackwell Science, Oxford 1998., pp. 137–145.

Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (2009a). 14/08/2009 - Gripe A- confirmados mais 15 óbitos no RS. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=noticias&cod=48244>

Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (2009b). 11/08/2009 - SES registra mais seis mortes por gripe a no dia 11 de agosto. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=noticias&cod=47988>

Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (2009c). 10/08/2009 - Mais cinco mortes pela gripe A no Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=noticias&cod=47583>

Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (2009d). 07/08/2009 - CEVS confirma primeira morte por gripe A(H1N1) na capital. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=noticias&cod=47493>

Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (2009e). 06/08/2009 - Gripe A (H1N1): mais três mortes no Estado. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=noticias&cod=47403>

Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (2009f). 03/08/2009 - RS registra mais quatro óbitos por gripe A. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=noticias&cod=47208>

Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (2009g). 31/07/2009 - Rio Grande do Sul tem mais quatro mortes por gripe A. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=noticias&cod=47133>

Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (2009h). 29/07/2009 - RS registra mais duas mortes por gripe A em Passo Fundo. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=noticias&cod=46938>

Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (2009i). 28/07/2009 - RS-Registro de mais três mortes pela gripe A (H1N1). Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=noticias&cod=46879>

Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (2009j). 26/07/2009 - Estado tem mais cinco mortes por A (H1N1). Secretário anuncia novas medidas de combate à epidemia. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=noticias&cod=46758>

Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (2009k). 19/07/2009 - Saúde confirma mais quatro mortes pela Gripe A. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=noticias&cod=46038>

Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (2009l). 16/07/2009 - saúde confirma mais cinco óbitos por gripe A. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=noticias&cod=45934>

Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (2009m). 13/07/2009 - RS registra a segunda morte pela nova gripe. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=noticias&cod=45695>

Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (2009n). 28/06/2009 - Osmar Terra fala sobre a primeira morte relacionada a nova gripe. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=noticias&cod=44779>

Scholtissek C, Quack G, Klenk HD, Webster HD (1998) How to overcome resistance of influenza A viruses against adamantane derivatives. *Antiviral Res* 37(2):83-95.

Shun-Shin M, Thompson M, Heneghan C, Perera R, Harnden A, Mant D. (2009) Neuraminidase inhibitors for treatment and prophylaxis of influenza in children: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *British Medical Journal* 339:b3172.

Singhal S, Sarda N, Arora R, Punia N, Jain A. (2014) Clinical profile & outcome of H1N1 infected pregnant women in a tertiary care teaching hospital of northern India. *Indian J Med Res* 139:454-8.

Siston AM, Rasmussen SA, Honein MA, Fry AM, Seib K, et al. (2010) Pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus illness among pregnant women in the United States. *JAMA* 115:717-26.

Smith GJD, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. (2009) Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459:1122-5.

Sullivan SJ, Jacobson RM, Dowdle WR, Poland GA (2010) 2009 H1N1 influenza. *Mayo Clinic Proceedings* 85(1):64-76.

Tanaka T, Nakajima K, Murashima A, Garcia-Bournissen F, Koren G, Ito S. (2009) Safety of neuraminidase inhibitors against novel influenza A (H1N1) in pregnant and breastfeeding women. *Canadian Medical Association Journal* 181(1-2):55-8.

Taubenberger JK, Reid AH, Janczewski TA and Fanning TG. (2001) Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356: 1829–1839.

Treanor, JJ (2010) Influenza viruses, including avian influenza and swine influenza. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin, R (eds) *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, pp 2265-88.

Trifonov V, Khiabani H, Rabadan R (2009) Geographic dependence surveillance and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus. *N Engl J Med* 361(2):115-9.

Wallensten A, Oliver I, Lewis D, Harrison S. (2009) Compliance and side effects of prophylactic oseltamivir treatment in a school in South West England. *Eurosurveillance* 14(30):1-4.

Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM and Kawaoka Y (1992) Evolution and ecology of influenza A viruses, *Microbiol Rev* 56: 152–179.

WHO (2009a). Pandemic (H1N1) 2009 – update 58, 6 July 2009. Disponível em: http://www.who.int/csr/don/2009_07_06/en/index.html

WHO (2009b). World now at the start of 2009 influenza pandemic. Disponível em: http://www.who.int/midiacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase_6_20090611/en/index.html

WHO (2009c). Human infection with new influenza A (H1N1) virus : clinical observations from Mexico and other affected countries, May 2009. Wkly epidemiological report 84 :185.

WHO (2009d). Viruses resistance to oseltamivir (Tamiflu) identified, 8 July 2009. Disponível em: http://www.who.int/csr/disease/swineflu/newsbriefs/h1n1_antiviral_resistence_20090708/en/index.html.

Wollenhaupt M, Chandrasekaran A, Tomianovic D. (2014) The safety of oseltamivir in pregnancy: an update review of post-marketing data. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* doi: 10.1002/pds.3673

Xie H, Yasseen AS III, Xie R, Fell DB, Sprague AE, Liu N, et al. (2013) Infant outcomes among pregnant women who used oseltamivir for treatment of influenza during the H1N1 epidemic. *Am J Obstet Gynecol* 208:293.e1–7.

Yokota RTC, Skalinski LM, Igansi CN, Souza LRO, Iser BPM, et al. (2011). Risk Factors for Death from Pandemic (H1N1) 2009, Southern Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 17: 1467-71.

Capítulo X – Anexos

10.1 ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO (GPPG 09-579)



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 09-579

Versão do Projeto: 04/01/2010

Versão do TCLE: 04/01/2010

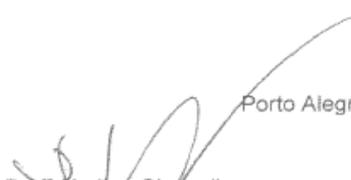
Pesquisadores:

PAULO DORNELLES PICON
INDARA CARMANIM SACCILOTTO
MARIA TERESA VIEIRA SANSEVERINO
MARISA BOFF COSTA
RAFAEL DA VEIGA CHAVES PICON
TANI MARIA SCHILLING RAINIERI
FERNANDA DUARTE TORRES
GRAZIELLA RANGEL PANIZ
PIETRO BAPTISTA DE AZEVEDO

Título: AVALIAÇÃO DO DESFECHO DAS GESTAÇÕES NOTIFICADAS COMO SUSPEITAS DE INFECÇÃO POR INFLUENZA A H1N1E TRATADAS COM OSELTAMIVIR NO RIO GRANDE DO SUL

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 03 de fevereiro de 2010.


Prof. Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

10.2 ANEXO 2 - FICHA DE SEGUIMENTO DAS GESTAÇÕES NOTIFICADAS COMO SUSPEITA DE INFLUENZA A H1N1

Data seguimento: ___/___/___ (1) telefone (2) pessoal (3) prontuário (4) outro

Você consente em conversar por telefone com uma equipe medica e fornecer alguns dados referentes: ao episódio de síndrome gripal que você apresentou e em relação ao desenvolvimento da sua gestação.
() Sim autorizo

NOME DA GESTANTE: _____

DUM: ___/___/___ **DATA PROVÁVEL DO PARTO:** ___/___/___

DATA INÍCIO DOS SINTOMAS: ___/___/___ **IDADE GESTACIONAL:** ___ sem.

RESULTADO DO PCR:

() Influenza A H1N1 () Influenza A sazonal
() negativo para Influenza A () não realizado

USO DE OSELTAMIVIR: () Sim () Não

Se Sim de ___/___/___ a ___/___/___

() Solução () Cápsula

Reações adversas: () Sim. () Não

Qual?

- | | |
|--------------------|-------------------------------|
| 1) vômitos/náuseas | 4) alterações neurológicas |
| 2) dor abdominal | 5) cefaleia |
| 3) diarreia | 6) reações alérgicas cutâneas |
| | 7) outra _____ |

Presença de reações adversas a partir da _____ dose

Duração das reações adversas: _____(horas/dias)

INTERNAÇÃO HOSPITALAR: de ___/___/___ a ___/___/___

- ventilação mecânica: () sim () não
- uso de antibióticos: () sim () não _____
- outras medicações: () sim () não _____

Pré-natal: local: _____ **no. de consultas:** _____

ECOGRAFIA OBSTETRICA: ___/___/___ com idade gestacional: ___ semanas

Complicações obstétricas: () Sim. Qual? () Não

- | | | |
|--------------------------------|-------------------------|--|
| 1) ameaça de aborto | 5) outra infecção | 8) sangramento |
| 2) trabalho de parto prematuro | 6) diabetes gestacional | 9) restrição crescimento |
| 3) ruptura de membranas | 7) hipertensão | 10) condição fetal não tranquilizadora |
| 4) infecção urinária | | |

Óbito materno: data: ___/___/_____

Causa do óbito:

Antecedentes Gineco-Obstétricos:

Gesta:_____ Para:_____ Ces:_____ NVivos:_____ NMort:_____

Gem:_____ AboEsp:_____ AboProv:_____

Consanguinidade: () sim () não

Antecedentes de malformações: _____

Fatores de risco e Comorbidades:

- Tabagismo () sim _____ () não
- Ingestão de álcool () sim _____ () não
- Uso de ácido fólico () sim _____ () não
- Doença materna crônica () sim _____ () não

Resultado da gestação:

(1) NVIVO ___/___/___ (2) NMORTO ___/___/___ (3) ABO ESP ___/___/___

(4) ABO IND ___/___/___

Duração da gestação: _____ semanas

Tipo de parto: (1) normal (2) normal com fórceps
(3) cesárea eletiva (4) cesárea emergência

Local de nascimento: _____

RECÉM-NASCIDO:

Nome: _____

Sexo: (1) masculino (2) feminino APGAR: 1º:___ 5º:___

peso: _____g compr: _____cm PC: _____cm

idade gestacional Capurro: _____ semanas () AIG () PIG () GIG

Alta hospitalar: (1) <3d (2) 3-7d (3) 8-15d (4) >15d

Intercorrências: () sim () não

LM Exclusivo: (1) 0 - 7d (2) 8d -1m (3) >1 - 3m (4) >3 - 6m (5) >6m

Pediatra:

Exames e avaliações realizados após o nascimento:

Óbito em: ____/____/____ Idade: _____

Causa: _____

Anatomo-patológico:

Avaliação do conceito: (1) normal (2) anormal

Responsável pelo preenchimento:

AVALIAÇÃO AMBULATORIAL

data: ____/____/____

INDICAÇÃO:

EXAME FÍSICO: Peso ____kg comprimento: ____cm perímetro

cefálico: ____cm

Dismorfias: () Sim.() Não

Qual?

Outras alterações: () Sim.() Não

Qual?

Eu autorizo que meu recém nascido seja submetido à avaliação clínica no ambulatório de Genética Pré-natal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Data: ____/____/____

Mãe ou responsável

10.3 ANEXO 3 - FICHA DE SEGUIMENTO DAS GESTAÇÕES NOTIFICADAS COMO SUSPEITA DE INFLUENZA A H1N1 E SEUS FILHOS

Data seguimento: ___/___/___ (1) telefone (2) pessoal (3) prontuário (4) outro

Você consente em conversar por telefone com uma equipe medica e fornecer alguns dados referentes: ao episódio de síndrome gripal que você apresentou e em relação ao desenvolvimento da sua gestação.
() Sim autorizo

NOME DA GESTANTE: _____

NOME DO FILHO: _____

USO DE OSELTAMIVIR: () Sim () Não

Consanguinidade: () sim () não

Antecedentes de malformações: _____

Fatores de risco e Comorbidades:

- Tabagismo () sim _____ () não
- Ingestão de álcool () sim _____ () não
- Uso de ácido fólico () sim _____ () não
- Doença materna crônica () sim _____ () não

Duração da gestação: _____ semanas

Tipo de parto: (1) normal (2) normal com fórceps
(3) cesárea eletiva (4) cesárea emergência

Local de nascimento: _____

Intercorrências: () sim () não

Exames e avaliações realizados após o nascimento:

Óbito em: ___/___/___ **Idade:** _____

Causa: _____

Anatomo-patológico:

Avaliação do conceito: (1) normal (2) anormal

Teste de Triagem Neonatal (Teste do Pezinho):

() Normal

() Alterado _____

Marcos de desenvolvimento (idade):

- Sustento cefálico: _____

- Sentar: _____

- Engatinhar: _____

- Caminhar: _____

- Falar:

- Palavras: _____

- Frases: _____

- Controle de esfíncteres: _____

Convulsão:

() Sim

() Não

Exame complementar:

Comorbidade:

Uso de medicação:

Hospitalização:

() Não

() Sim. Motivo: _____

Cirurgia:

() Não

() Sim. Motivo: _____

Responsável pelo preenchimento:

Capítulo XI – Apêndices

11.1 APÊNDICE 1 – Menção Honrosa de Apresentação Oral da 30ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

30ª Semana Científica
do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Três décadas comprometidas com ensino e pesquisa
04 a 08 de outubro de 2010

Certificado

Certificamos que o trabalho “Desfechos maternos e perinatais em pacientes obstétricas expostas ao vírus Influenza A H1N1 da Pandemia 2009 tratadas com oseltamivir no Rio Grande do Sul (Brasil)”, dos autores - PIETRO BATISTA DE AZEVEDO; Torres FD; Silva AA; Vianna FSL; Paniz GR; Sanseverino PB; Costa MH; Krebs L; Santos L; Faccini LS; Ranieri TS; Picon PD; Sanseverino MTV , recebeu Menção Honrosa de apresentação oral da 30ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Porto Alegre, 08 de outubro de 2010.

[Signature]
Prof.ª Nádirne Clausell
Coordenadora do GPPG

[Signature]
Prof.ª Gisele Gus Manfro
Coordenadora da Semana Científica

[Signature]
Prof. Amazílio Vieira de Macedo Neto
Presidente do Hospital de Clínicas

11.2 APÊNDICE 2 – Prêmio João Monteiro Pina Neto – XXIV Congresso Brasileiro de Genética Médica



11.3 APÊNDICE 3 – Artigo publicado na Revista HCPA (2010)

ARTIGO ORIGINAL

DOSAGEM PLASMÁTICA DO FATOR DE VON WILLEBRAND E VARIÁVEIS CLÍNICAS COMO FATORES PROGNÓSTICOS NO CÂNCER DE MAMA

PLASMATIC VON WILLEBRAND FACTOR MEASUREMENT AND CLINICAL VARIABLES AS PROGNOSTIC FACTORS OF BREAST CANCER

Nilton Leite Xavier¹, José Antonio Cavalheiro², André Anjos da Silva³

RESUMO

Introdução: O fator Von Willebrand (vW) é uma glicoproteína cujo aumento da concentração sérica está associado ao mecanismo de estimulação do epitélio endotelial facilitando a metástase do câncer de mama.

Objetivo: O objetivo deste estudo é avaliar o valor prognóstico do vW no câncer de mama, assim como variáveis clínicas.

Métodos: Analisou-se uma coorte de 50 pacientes com câncer de mama (CM) do Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, entre os anos 2002 e 2005, quando se avaliou o vW nestes 50 casos e em 53 controles. Decorridos 42 meses da última inclusão, todas as pacientes com CM foram chamadas para nova avaliação do vW por imunoturbidimetria. Consideramos valores elevados de vW quando acima de 160%. As pacientes foram analisadas de acordo com faixa etária de até 59 anos ou ≥ 60 anos de idade. O desfecho clínico foi dividido entre bom (sem evidência de doença) e ruim (ôbito ou com evidência de doença).

Resultados: Obtivemos nova coleta em 41 pacientes que retornaram para revisão. O fator vW isoladamente não apresentou um bom desempenho prognóstico para o seguimento do CM em relação ao desfecho clínico. Presença de linfonodos axilares positivos, índice de massa corporal (IMC) ≥ 30 kg/m², menarca ≤ 11 anos e tamanho tumoral > 2 cm foram as variáveis significativas para determinação do prognóstico nesta coorte.

Conclusões: Neste estudo o fator de vW não se mostrou útil para determinação de prognóstico no CM, enquanto que o estado axilar e o diâmetro tumoral foram fatores determinantes de sobrevida. Mais estudos são necessários para confirmar se a menarca e o IMC também são fatores prognósticos.

Palavras chave: VonWillebrand; fator prognóstico; câncer de mama

ABSTRACT

Background: The Von Willebrand factor (vW) is a glycoprotein whose high serum levels are associated with the mechanism of endothelium stimulation promoting metastatic processes in breast cancer.

Aim: This study is to assess the prognostic value of vW in breast cancer, as well as other clinic variables.

Methods: We evaluated a cohort of 50 patients with breast cancer (BC) who were being treated at the Mastology Department of Hospital de Clínicas de Porto Alegre from 2002 to 2005. We measured the vW levels of these 50 patients and 53 controls. Forty-two months after the last patient was included in the study, all patients with BC had their vW levels measured by means of immunoturbidimetric assay. vW values above 160% were considered high. The patients were divided into two age groups: 59 years old or younger and 60 years old or older. The clinical outcome was good (no evidence of disease) and poor (death or evidence of disease).

Results: We obtained new blood samples or forty-one who returned to revision. Individual values of vW did not show a good prognostic information in the follow up of patients with breast cancer in relation to clinical outcomes. Positive axillary lymph nodes, body mass index (BMI) ≥ 30 kg/m², menarche ≤ 11 years old, and tumor size > 2 cm, were significant predictors of prognosis in this cohort.

Conclusions: In this study vW as not useful to determine prognosis in breast cancer, while axillary status and tumoral size were predictive factors of survival. More studies are necessary to confirm if menarche and BMI are prognostic factors too.

Keywords: Von Willebrand; prognostic factors; breast cancer

Rev HCPA 2010;30(2):105-110

O Fator Von Willebrand (vW) é uma glicoproteína sintetizada nas células endoteliais e nos megacariócitos (1). O aumento das concentrações séricas do vW está associado com uma série de condições patológicas (1,2) como o diabetes melito, hepatopatias, colagenoses, infarto, neoplasias malignas e outras condições que cursam com o aumento da proliferação endotelial e dano vascular.

A neoangiogênese é responsável pela nutrição e sobrevivência dos tumores sólidos, pela invasão vascular e a metastatização tumoral (2,3), depende de fatores facilitadores que estimulem o epitélio endotelial e o fator de vW tem sido associado a esse mecanismo (4,5).

A literatura é pobre no estudo da associação entre o vW e o câncer de mama (CM) (5), não sendo conhecida sua prevalência na população da maioria dos países. Estabelecemos

1. Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2. Serviço de Mastologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3. Acadêmico, Faculdade de Medicina, UFRGS.

Contato: Nilton Leite Xavier. E-mail: 00003774@famed.ufrgs.br (Porto Alegre, RS, Brasil).

previamente a frequência percentual dos valores do fator vW, em 50 pacientes com câncer de mama e em 53 controles sem câncer de mama, sendo respectivamente de 30% e 11% (6).

Pela possibilidade de terapia antiangiogênica (6,7) o objetivo principal deste estudo foi avaliar o vW em pacientes com câncer de mama como um fator prognóstico. O objetivo secundário foi avaliar outras variáveis clinicopatológicas que possam ter influenciado o desfecho clínico destas pacientes.

MÉTODOS

O cálculo amostral, em estudo caso e controle, com pacientes pareadas por idade (6), foi baseado na hipótese de que o fator de vW esteja alterado em apenas 10% da população saudável e de que a prevalência nas portadoras de câncer de mama seja de 40%; nestas condições o "n" é de 90 pacientes, na proporção 1:1, para casos e controles. Incluiu-se 50 pacientes com câncer de mama. Esta coorte foi constituída no Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) entre junho de 2002 e março de 2005. O critério de inclusão foi a presença de tumor de mama até 5,0 cm e axila sem evidência clínica de comprometimento. Os critérios de exclusão foram pacientes com diabetes, cardiopatia, hemoglobina inferior a 10,5g/dL contagem de plaquetas inferior a 100 mil ou acima de 440.000/ μ L e presença de qualquer foco infeccioso. Todas assinaram o consentimento informado e não há conflito de interesse nos resultados.

O fator vW, determinado pela técnica de imunoturbidimetria, no plasma, foi categorizado em normal (6) (valores de 50 até 160%) e elevado (valores acima de 160%). As outras variáveis analisadas foram idade, peso e estatura para avaliar o índice de massa corporal (IMC), menarca, *status* axilar e tamanho tumoral. A técnica de coloração utilizada, no diagnóstico histopatológico, foi hematoxilina e eosina (HE). O patologista não foi informado dos valores do fator vW. Da mesma forma, o bioquímico que determinou o fator de vW não tinha conhecimento da patologia da paciente. Todas foram tratadas no Serviço de Mastologia do HCPA (7), tendo 27 pacientes sido submetidas à mastectomia radical, 22 à cirurgia conservadora associada à radioterapia e uma optou apenas pelo uso de tamoxifeno. Nenhuma apresentava axila clinicamente comprometida, sendo 20 casos com T1 e 30 casos com T2. Das 49 operadas, 23 fizeram setorectomia e as demais mastectomia; 41 receberam quimioterapia (Qt) adjuvante com esquema FAC, três receberam apenas tamoxifeno e 5 nada receberam. Das 41 que fizeram Qt, 15 também receberam tamoxifeno.

Ao completar 42 meses da última inclusão, realizou-se novo recrutamento das 50 pacientes,

através de telefonema ou de carta, no período de junho/2007 até julho/2008, para nova verificação do fator de vW. Desta coorte, 41 fizeram a coleta de amostra de sangue para a dosagem plasmática do fator vW, realizado pela técnica de imunoturbidimetria.

Correlacionou-se os valores do vW por ocasião da primeira inclusão, com os valores atuais. A faixa etária foi categorizada em igual, ou menor do que 59 anos e a partir dos 60 anos (idosas).

O desfecho clínico foi categorizado, com boa evolução (sem evidência de doença) e má evolução (óbito pela doença e com doença). A correlação da evolução clínica foi realizada com os seguintes parâmetros, registrados por ocasião da inclusão: fator vW, categorizado em até 160% e acima; *status* axilar, categorizado em linfonodo negativo (LN -) e positivo (LN+), independente do número positivo; IMC, categorizada como não obesa e obesa, quando o IMC fosse < 30 ou \geq 30 kg/m², respectivamente. A menarca foi categorizada em precoce, quando igual ou inferior a 11 anos e não precoce, acima de 11 anos; e nódulo, categorizado em T1, menor ou igual a 2,0 cm e T2, de 2,1 até 5,0 cm.

A análise estatística dos valores do fator vW foi pelo teste t para diferença entre médias. Avaliou-se a correlação entre fator vW e evolução clínica, categorizada em sem doença atual: 1, ou falecida com doença: 2; e entre o fator de vW e os fatores de risco em avaliação. As variáveis categóricas foram analisadas pelo Qui² e Pearson, para estudo de coorte. Na análise multivariada com as variáveis significantes da análise univariada o N ficou em 46, sendo 20 casos de T1 e 16 de T2. Nesta circunstância acrescentou-se o tamanho dos nódulos, como variável contínua. A sobrevida livre de doença foi avaliada pela curva de Kaplan-Meier.

O estudo foi aprovado pela Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde (CEP) do HCPA.

RESULTADOS

Das 50 pacientes iniciais, obtivemos nova coleta de sangue em 41. Das nove pacientes restantes, ocorreram cinco óbitos consecutivos ao câncer de mama (10%), um caso de óbito por infarto do miocárdio (2%), com 62 meses de evolução, sem doença. Três não compareceram à coleta (6%), porque moram em outro município e não atenderam a convocação, embora façam revisão periódica. Estão vivas 44 delas, após decorrido o seguimento médio de 57 meses, com mínimo de 43 e máximo de 72 meses. Três estão vivas e com doença. Uma faleceu de infarto, sem doença aparente, e foi excluída da análise. Deste grupo, 41 (82%) apresentam-se clinicamente sem doença.

As características das pacientes estão na Tabela 1. A correlação dos valores do vW, pré e pós-tratamento, estão na Tabela 2, ao passo que na Tabela 3 são apresentadas as correlações entre faixa etária e fator de vW, em que se encontrou valores pós-tratamento mais elevados em mulheres com mais de 60 anos, e essa dife-

rença foi estatisticamente significativa. As médias e as variâncias do vW pré e pós-tratamento foram 137,07% e 2089,37%, 179,97% e 4756,32%, respectivamente. Há significância estatística (P <0,001).

Tabela 1 – Características demográficas e clínicas das pacientes.

Variáveis	N	Média ±DP	Extremos
Idade (anos)	49	56,3 ±12,3	34 – 78
Id menarca (anos)	46	13,4±2,4	10 – 26
Id menopausa (anos)	29	48,8 ±5,3	36 – 61
Nº de gestações	47	2,5 ±0,7	00 – 03
IMC (Kg/m ²)	48	27,3 ±4,9	19 – 39,9
Von (%)	49	134,8 ±44,5	57 – 248
Will (%)	41	179,9 ±68,9	75 – 378

Von: valores iniciais do fator de Von Willebrand; Will valores do 2º recrutamento.

Tabela 2 – Resultados do fator vW, nos 41 casos em que se fez as duas avaliações.

Fator de vW	Pré-tratamento (Von)	Pós-tratamento (Will)	Valor P
Até 160%	28 (68,3%)	16 (39,0%)	0,007
Acima de 160%	13 (31,7%)	25 (61,0%)	0,007

Tabela 3 – Análise pré e pós-tratamento dos valores VW correlacionados com a idade, categorizada em até 59 anos e ≥60 anos (N=41).

Idade/Fator vW	Até 160%	Acima de 160%	Total	RR [IC 95%]
Pré: vW				
Até 59 anos	17	05	22	RR =1,38
≥60 anos	11	08	19	[0,97 - 2,15]
Pós: vW				
Até 59 anos	12	10	22	RR =2,59
≥60 anos	04	15	19	[1,0 - 6,70]

A relação existente entre a evolução clínica e os parâmetros avaliados estão na Tabela 4, junto com a fração atribuível. Axila positiva, a obesidade, a menarca precoce e o T2 foram preditivos de mau prognóstico neste paciente. O fator do vW não foi um fator preditivo significativo.

Tabela 4 – Correlação com a evolução clínica:(média de 57 meses).

Variáveis	N	Risco Relativo (IC 95%)	Fração Atribuível
vW > 160%	49	1,40 (0,50 – 3,91)	–
LN positivo	49	2,20 (1,23 – 3,94)	54,5%
IMC ≥30	48	2,93 (1,43 – 5,95)	65,9%
Menarca ≤11	46	5,57 (1,41 – 22,2)	82,1%
Nódulo T2	49	1,63 (1,11 – 2,40)	38,7%

Na Tabela 5 é apresentada a análise estratificada com o cruzamento de dados para o fator de vW e na Tabela 6 estão os resultados da análise multivariada, embora o número de pacientes tenha

sido pequeno para esta análise, a menarca, o IMC, o tamanho do nódulo foram independentes associados ao prognóstico

Tabela 5 – Análise por tabulação cruzada (estratificada).

CLINICA			vW		Total
			1	2	
1	T1T2	até 2,0cm	17	2	19
		2,1 até 5,0cm	13	9	22
	Total		30	11	41
2	T1T2	até 2,0cm	1	0	1
		2,1 até 5,0cm	4	3	7
	Total		5	3	8

Von: valores do fator de vonWillebrand pré-tratamento; Clínica 1: χ^2 Pearson 4,794, com $P=0,029$, bilateral. O risco estimado para T1T2, tem Odds 5,88 (IC 95% : 1,08 a 32,01); A taxa de Odds para coorte com $vW=1$, é 1,51 (IC 95% : 1,03 a 2,21); Na estratificação o Q^2 de Cochran's foi 5,46, com p bilateral=0,019.

Tabela 6 – Análise multivariada com as variáveis significantes.

N= 46	Variável dependente	F teste	Significância
CLINICA	Menarca	6,17	0,01
	IMC	7,20	0,01
	Tamanho Tumoral	4,58	0,03
	T1/ T2	2,92	0,09
	Linfonodo Positivo	3,75	0,05

A sobrevida livre de doença desta coorte, de acordo com a menarca, neste período de observação, é apresentada na Figura 1.



Figura 1 – Sobrevida cumulativa até 5 anos (Método de Kaplan Meier).

DISCUSSÃO

Estudo comparado (6), incluindo pacientes com e sem tumor e na mesma faixa etária, mostrou correlação positiva do fator VW quanto à presença de CM e com significância estatística.

Salientamos que as pacientes com tumores pequenos, até 2,0 cm, apresentaram a mesma frequência (10,7%) de valores elevados para o vW do que as pacientes sem tumor (6). Isto mostra, salvo novos estudos, que o fator vW não tem valor no diagnóstico precoce.

Não há estudo que correlacione o vW com evolução clínica e, por isso, fizemos a análise desta pequena coorte incluindo outros parâmetros. Verificou-se que apenas duas pacientes com valores de vW acima de 160 mudaram para valores inferiores e 14, entre as que tinham valores inferiores a 160, passaram a valores acima de 160, mostrando que os grupos se tornaram distintos ao longo do período de observação (tabela 1).

Na tabela 2 observa-se, apesar de termos mantido os grupos originais, sem corrigir a idade pelo tempo já decorrido, uma migração das pacientes para valores do vW mais elevados. Isto apenas demonstra correlação positiva com a faixa etária, parecendo um fator dependente da idade.

O fator de Von Willebrand não se mostrou um discriminante para indicar a evolução clínica, neste período de observação, conforme análise mostrada na Tabela 3. As variáveis *status* axilar, menarca precoce, obesidade e tamanho tumoral se mostraram significantes tanto do ponto de

vista estatístico como clínico. Os valores normais do vW pré-tratamento estão associados com os nódulos até 2,0 cm. Os poucos trabalhos que avaliaram o fator vW foram com carcinomas mais avançados, quando a angiogenese já está bem estabelecida (4,5). Para casos com T1 o fator vW não se mostrou de utilidade e os valores se tornaram elevados, na maioria, após o tratamento, mesmo com as pacientes aparentemente estando saudáveis.

A interpretação da Tabela 3 nos permite afirmar que a paciente que teve LN+, no momento do tratamento, apresentou um risco de 2,2 vezes de não estar saudável no final deste período de observação. Com exceção do fator vW todas as variáveis se mostraram como fatores de risco para uma má evolução. Embora a menarca precoce tenha significância estatística, o intervalo de confiança amplo, demonstra um N pequeno. O percentual de 82% representa o quanto este fator influenciou no mau prognóstico.

O diâmetro máximo do nódulo, acima de 2,0 cm se mostrou um preditor negativo na evolução clínica, com risco de 1,63 vezes mais quando comparado com T1. Merece referência de que os tumores T1 se acompanham de bom estado axilar e este é o fator prognóstico mais considerado na literatura (8-10). Embora o fator vW, nesta coorte, não tenha influenciado na evolução clínica, verificamos que os T1, habitualmente, se acompanham de valores do fator vW inferiores a 160% e com frequência (10,7%) similar a da população (11%) sem tumor de mama. A partir da associação de T1 com valores baixos do fator de vW, fez-se a tabulação cruzada com os valores iniciais do vW, T1 e T2 e a evolução clínica. A análise está anotada na Tabela 4 e o resultado está associado ao T1.

A Tabela 3 apresenta a análise univariada salientando-se a categorização desta no resultado. Em virtude dos valores significantes realizou-se a análise multivariada, cujo resultado é apresentado na Tabela 5. Os autores acrescentaram, na análise, o nódulo como variável contínua em 46 pacientes. Os resultados são significativos, mas consideramos que novos estudos são necessários, com número maior de pacientes.

Além do estado dos linfonodos axilares e do tamanho tumoral, parâmetros prognósticos bem definidos, nosso estudo salienta que tanto a obesidade quanto a menarca precoce também são fatores de mau prognóstico nesta coorte. A obesidade tem sido correlacionada com os fatores angiogênicos que seriam os facilitadores do crescimento tumoral e das metástases, tendo, neste caso, a conotação de pior prognóstico (12).

A literatura (8-11,13) tem mostrado que vários são os fatores de risco de aparecimento do câncer de mama, e, entre eles a obesidade e a

menarca precoce, no entanto como fatores prognósticos, estes parâmetros não tem sido avaliados (8). O diâmetro máximo tumoral e o status axilar são fatores prognósticos já bem definidos. Este é considerado como o indicador prognóstico mais importante e nossos dados também estão de acordo com a literatura (9,10,13).

Os valores para o vW de até 160% foram normais nos T1 que têm uma evolução favorável, o que foi confirmado apenas na análise estratificada. O fato dos valores de vW nos casos T1 terem significância, parece-nos ser um fator de confusão, porque na população normal, sem câncer, a frequência do vW acima de 160% é a mesma (6). Esta associação, na prática clínica, não ajuda no manejo terapêutico e concluímos que o vW não é útil para avaliação prognóstica. Verificou-se que em torno de 25% dos T2 evoluíram mal (clínica 2), sem distinção quanto aos valores do fator vW pré-tratamento.

Neste estudo, confirmamos que o estado axilar e o diâmetro tumoral são determinantes de sobrevida, e outros estudos com maior número de pacientes são necessários para confirmar se a menarca e o IMC também são fatores prognósticos.

Agradecimentos

Ao apoio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

REFERÊNCIAS

1. NashGL, Walsh DC e Kakkar AK. The role of the coagulation system in tumour angiogenesis. *The Lancet Oncol* 2001,2(12):608-13.
2. Kato T, Kameoka S, Kimurta T, Nishikawa T & Kasajima T. Angiogenesis and blood vessel invasion as prognostic indicators for node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2001, 65(3):203-15.
3. MacConmara M, O'Hanlon DM, Kiely MJ, Connolly Y & Jeffers M. An evaluation of the prognostic significance of vascular endothelial growth factor in node positive primary breast carcinoma. *Int J Oncol* 2002,20(4):717-21.
4. Rohsig IM, Damin DC, Stefani SD et al. Von Willebrand factor antigen levels in plasma patients with malignant breast disease. *Braz J Med Biol Res* 2001,34(9):1125-29.
5. Schwartzmann G, Damin DC & Roisemberg I. Malignant disease and von Willebrand factor. *The Lancet Oncol* 2001,2(12):716-17.
6. Xavier, NL et al. Cancer de Mama e Fator de Von Willebrand. *Anais da 25ª. Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Rev HCPA*, 2005, 25(supl.1):77.

7. Menke CH, Biazus JV, Xavier NL et al. Tratamento do Câncer de Mama. In: Rotinas em Mastologia. Ed. Artmed 2007, p: 169-74.
8. Pascalicchio JC, Fristachi & Baracat FF. Câncer de mama: fatores de risco, prognósticos e preditivos. Rev Bras Mastol 2001, 11(2):71-84.
9. Paksereshet S, Ingle GK, Bahadur et al. Risk factors with breast cancer among women in Delhi. Indian J Cancer 2009, 46(2):132-8.
10. Menke CH, Biazús JV, Xavier NL et al. Epidemiologia, fatores de risco e aconselhamento genético. In: Rotinas em Mastologia. Editora Artmed 2007, p: 135- 142.
11. Costanza ME & Chen WY. Epidemiology and risk factors for breast cancer. In:<http://www.updateonline.com/online/content/topic.do?topicKey=breasten/9760&sel> Acessado em 28/07/2009.
12. Silha JV, Krsek M, Sucharda P & Murphy LJ. Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. Int J Obes. 2005, 29(11):1308-14.
13. Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH et al. Benign breast disease and the risk of breast cancer. N Engl J Med 2005, 353 (3):229-37.

Recebido: 05/04/2010

Aceito: 18/05/2010

11.4 APÊNDICE 4 – Artigo publicado na Revista Research and Reports in Endocrine Disorders (2012)

Research and Reports in Endocrine Disorders

Dovepress

open access to scientific and medical research

 Open Access Full Text Article

REVIEW

Emerging treatment options for the mucopolysaccharidoses

This article was published in the following Dove Press journal:

Research and Reports in Endocrine Disorders

5 November 2012

[Number of times this article has been viewed](#)

Roberto Giugliani¹⁻⁶
Andressa Federhen^{1,4}
André Anjos Silva^{1,5}
Camila Matzenbacher Bittar^{1,5}
Carolina Fischinger Moura de Souza¹
Cristina Brinckmann Oliveira Netto¹
Fabiana Quoos Mayer^{2,7}
Guilherme Baldo^{1,2,8}
Ursula Matte¹⁻⁵

¹Medical Genetics Service, ²Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil; ³Department of Genetics, ⁴Postgraduate Program in Child and Adolescent Health, ⁵Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil; ⁶National Institute of Population Medical Genetics (INAGEMP), Porto Alegre, RS, Brazil; ⁷Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Eldorado do Sul, RS, Brazil; ⁸Department of Biophysics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract: The mucopolysaccharidoses (MPS) are a group of diseases arising from one of eleven different enzyme defects, each one affecting one single step of the degradation pathway of glycosaminoglycans. Several developments in the understanding of the MPS have occurred since the first clinical report about their occurrence in 1917: the nature of the storage product was recognized, a useful biomarker (mucopolysacchariduria) was developed, the enzyme defects became identified, and the gene defects were elucidated. The first successful treatment for MPS diseases was bone marrow transplantation, which was introduced for the therapy in 1980. Over the last decade, a whole new set of therapeutic approaches have become available or are currently in development to address MPS. Intravenous enzyme replacement therapy, already approved for MPS I, II, and VI, will possibly be available for MPS IVA and for MPS VII within the next few years. Intrathecal enzyme replacement therapy (tested in animals and already reported in a few patients) may become a tool to treat or prevent the central nervous system (CNS) manifestations which occur in several MPS. Substrate inhibition therapy using small molecules which cross the blood-brain barrier is also being tested for MPS types with CNS manifestations. In vitro studies point out that chaperones may also be of therapeutic value when the main cause is protein misfolding and retention at the endoplasmic reticulum. Stop-codon read-through strategy has been tried in preclinical studies with MPS models caused by nonsense mutations. Preclinical studies assessing gene therapy also show quite encouraging results, and this modality of treatment is now moving toward clinical development. The use of neural stem cells in MPS types which have CNS involvement is also promising. It is important to point out that MPS diseases are hard to treat, and demand specific therapies with a broad range of supportive measures. An additional challenge arises from the high cost of these technology intensive approaches, and this needs to be addressed if the treatments are to become widely available. Finally, since there is evidence that early diagnosis followed by early treatment considerably improves the health outcomes for these patients, newborn screening is becoming increasingly important for the early diagnosis of affected patients.

Keywords: mucopolysaccharidoses, glycosaminoglycans, treatment, enzyme replacement therapy, gene therapy, lysosomal diseases

Introduction

The group of the mucopolysaccharidoses (MPS) includes diseases arising from eleven different enzyme defects, each one affecting one single step in the degradation pathway of glycosaminoglycans (GAGs). In this step, particular species of GAGs are accumulated, and a characteristic picture is observed in the patients who present with one of the eleven MPS types. In each MPS type, a broad heterogeneity of manifestations is usually observed, tentatively related to residual enzyme activity,

Correspondence: Roberto Giugliani
Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil
Tel +55 51 3359 6338
Fax +55 51 3359 8010
Email rgiugliani@hcpa.ufrgs.br

submit your manuscript | www.dovepress.com

Dovepress

<http://dx.doi.org/10.2147/RRED.S24769>

Research and Reports in Endocrine Disorders 2012:2 53-64

© 2012 Giugliani et al, publisher and licensee Dove Medical Press Ltd. This is an Open Access article which permits unrestricted noncommercial use, provided the original work is properly cited.

53

which could be conditioned by the underlying gene defect (with a trend to be more severe when gene rearrangements or frameshift/nonsense mutations occur, and more attenuated when missense mutations are involved). Many developments in understanding the MPS have occurred since they were first reported in 1917: the nature of the storage products was recognized, a useful biomarker (mucopolysacchariduria) was developed, the enzyme defects became identified, and the gene defects in all the diseases became known.¹

The first successful treatment for these diseases was bone marrow transplantation (BMT), introduced in 1980. BMT or hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is still used, and its main indication at present is for therapy of the severe form of MPS I (Hurler disease) when the transplantation can be performed before the age of 2.5 years or when the patient presents with an intelligence quotient greater than 70. If performed later, BMT/HSCT will not prevent the cognitive decline that occurs in this form of the disease, and other forms of therapy will be preferred due to the high mortality and morbidity rates associated with the transplantation procedure. For this reason BMT/HSCT is not usually indicated for the more attenuated forms of MPS I or MPS VI, despite the reports of successful outcomes in these MPS types. BMT/HSCT does not seem to be an option for MPS III and MPS IV, and its indication in MPS II is still controversial.

Following the success of enzyme replacement therapy (ERT) for the treatment of Gaucher disease, this method of treatment was also developed for MPS and is now available for MPS I (since 2003), MPS VI (since 2005), and MPS II (since 2006), and has certainly improved the outcome of patients affected by these MPS types.

The storage of GAGs still seems to be the primary problem in MPS, but it is now well known that this launches a cascade of pathogenic mechanisms, opening the door for the use of different therapeutic approaches targeting different disease mechanisms.

This review does not focus on the available BMT/HSCT and ERT approaches, but rather concentrates on the emerging treatment options for these diseases, including intravenous ERT for further MPS types, intrathecal ERT, substrate reduction therapy, the use of chaperones, stop-codon read-through (SCRT), gene therapy, and the use of neural stem cells.

Intravenous enzyme replacement therapy

ERT involves regular-infusions of a recombinant product which is similar to the deficient enzyme missing in the

specific MPS type. Before the advent of therapies targeting the deficient enzyme activity, the treatment of MPS was mainly focused on the prevention and care of complications, which is still a very important aspect in the management of these patients.^{2,3} ERT is the main specific treatment already available for some types of MPS, which brings substantial benefits to the patients. Over the last few years, the prognosis of the disease in MPS patients has improved considerably due to better understanding of the complications, the better supportive care provided, and also due to the specific therapies developed for some MPS types.⁴ However, improvements are more noticeable in some areas (visceromegaly, respiratory system, heart muscle, joint mobility, endurance) than in others (heart valves, cornea, skeletal system, and central nervous system [CNS] manifestations).⁵⁻⁷

It is important to mention that the production of antibodies against the recombinant enzymes may impact the efficacy of the enzyme replacement therapy, and some research initiatives are in progress to develop protocols to minimize this problem.⁸ In addition, the use of ERT before and immediately after HSCT has been proposed, as this would improve the patient's condition for the HSCT procedure, and would provide enzyme supply while the donor cells are still establishing themselves in the receptor (this would be even more important if the donor is a carrier).⁹

As clinical trials using ERT are already underway for MPS IVA, and possibly for MPS VII in the near future, we will focus on these conditions in this section. MPS IVA, also known as Morquio syndrome type A, is a rare, autosomal recessive disorder caused by a deficiency of the lysosomal enzyme N-acetylgalactosamine-6-sulfate-sulfatase, which catalyzes one of the steps of the catabolism of the GAGs keratan sulfate and chondroitin-6-sulfate.¹⁰ The multisystemic impact of this storage results in skeletal dysplasia, decreased endurance, and impaired quality of life. Generally, MPS IVA patients with a severe form of the disease do not survive beyond 20 to 40 years, whereas those patients with an attenuated form may survive longer. Mortality is commonly due to cardiorespiratory or neurological complications.¹¹ As no specific therapy for MPS IVA has been available until now, palliative care has been the primary treatment modality.

ERT is now being developed for MPS IVA, and preliminary data from preclinical studies^{12,13} and from Phase I/II clinical trials indicate the sharp decrease of urinary keratan sulfate excretion after a few weeks of treatment, with an additional improvement in a 6-minute walking test and a 3-minute stair climb test; these results are similar to those observed in clinical trials of ERTs for MPS I, II, and VI.

Adverse reactions are also comparable to those observed with the use of ERT across other MPS.¹⁴ However, more conclusive data on the efficacy of this therapy will not be available until the results of the Phase III clinical trial are reported, and these are to be announced in early 2013. It may be anticipated that as the skeletal system is prominently affected in this type of MPS, early treatment would be important to reduce the burden of these manifestations, as bone is a difficult tissue to treat with ERT.

MPS VII (also known as Sly syndrome) results from a deficiency of β -glucuronidase (GUSB) and is inherited as an autosomal recessive trait. Affected patients share many clinical features with patients with other forms of MPS, including shortened life span, mental retardation, organomegaly, and the bone and joint abnormalities that are collectively referred to as dysostosis multiplex.¹⁵ Comprehensive studies of ERT in animal models of MPS VII (especially with mice, dogs, and cats), which have been playing an important role in the development of ERT for related disorders (including other lysosomal storage disorders [LSDs]),^{16,17} are promising. There is hope that a clinical development program of ERT for MPS VII will be starting shortly, as an Orphan Drug Designation was already granted for this product. The disease has a broad spectrum of clinical presentations, from hydrops fetalis to milder forms with normal intelligence, and it would be expected that ERT would provide greater benefits in the more attenuated forms, as the blood-brain barrier (BBB) may prevent enzyme therapy from directly helping the brain, as is the case with ERT in the other MPS which have involvement of the CNS.¹⁸

Intrathecal enzyme replacement therapy

It is known that some types of MPS develop CNS manifestations, which can include cerebral tissue abnormalities (leading to progressive cognitive deficit), and/or spinal cord compression (leading to myelopathy), and/or obstruction of cerebrospinal fluid reabsorption (leading to high-pressure communicating hydrocephalus). As in other affected areas (bone, joints, heart, airways, eye, etc), a reduction of GAGs in the CNS is imperative in order to revert, stop, or at least slow down the progression of the devastating effects of the GAGs accumulation in the brain and meninges.

As the BBB prevents the enzyme from reaching the brain in significant quantities, the intravenous ERT does not address the neurological complications of the disease. Recent animal studies suggest that intravenously administered enzymes can cross the BBB in small amounts; however, there

is no conclusive evidence that this also occurs in humans. The attempt to deliver the recombinant enzyme intrathecally has been shown to enhance the enzyme activity levels in the brain (three- to 20-fold heterozygote levels).¹⁹

The intrathecal administration of recombinant arylsulphatase B resulted in a reduction in GAGs storage in the dura of MPS VI cats.²⁰ Thus, intrathecal ERT is an effective way to introduce enzymes into the CNS in animal models and, although there is still no evidence that shows that it may prevent cognitive impairment in MPS I, some studies have demonstrated behavioral improvement in animal models of other LSDs when enzymes are provided directly into the brain.¹⁹ Other studies have shown that intrathecal ERT administered every 3 months adds substantial benefit to high-dose intravenous ERT for the treatment of CNS storage in MPS I in the canine model. The primary disadvantage of direct CNS delivery is the invasive nature of the procedure.²¹ Furthermore, we should mention that, with intrathecal ERT, the distribution of enzymes within the brain may be imperfect, especially in larger brains, and the benefits of intrathecal ERT for subjects with established CNS manifestations may be difficult to achieve.

Two case reports have described successful delivery of recombinant enzymes intrathecally in adult patients with MPS I and MPS VI with spinal cord compression. In studies of canine models, the MPS I patient received four injections of 3 mL of laronidase (approximately 1.74 mg of enzyme) at monthly intervals.²² The patient had improved gait, respiratory parameters, and decreased use of pain medications, without adverse events.²³ The MPS VI patient had been presenting with a slow, but apparently steady improvement in sensitivity to hot and cold and reflexes; however, walking capacity decreased progressively. It was concluded that in situations of high surgical risk or less advanced bone disease, the intrathecal ERT approach may be considered as therapeutic or adjunct therapy for the MPS types for which ERT is available.²⁴

The encouraging results which came from preclinical studies and case reports have paved the way for clinical trials investigating intrathecal therapy for MPS I (whether associated or not to BMT/HSCT), MPS II, and MPS IIIA, and these studies are currently in progress.

Substrate reduction therapy

Since intravenous ERT appears to be inefficient in treating the CNS manifestations of the MPS, studies on alternative therapeutic methods are being conducted. Substrate reduction therapy (SRT) has recently been shown to be a promising

strategy for treatment of neuronopathic forms of MPS and other LSDs.²⁵ The SRT aims to decrease the amount of stored material through the administration (usually oral) of small molecules that are capable of inhibiting the synthesis of the substrate stored in that specific disease, resulting in the restoration of the balance between synthesis and degradation. For the success of this type of therapy it is necessary that the enzyme has some residual activity, in order to turn over the decreased amount of stored substrate. In MPS disorders, the strategy for SRT would be the reduction of the formation of GAGs by inhibiting the enzymes needed for the synthesis of these molecules.²⁶ Inhibiting the formation of the primary storage products should delay the development of pathologies in MPS disorders. The most important therapeutic strategy is based on the use of relatively small molecules that may cross the BBB and reach the CNS, making SRT a potential strategy with which to approach the neurological problems associated with the MPS disorders. There are a number of inhibitors of GAGs synthesis, and we will comment briefly on the two which are considered the most important SRT agents for MPS.

Genistein and other natural flavonoids

The compound 5,7-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopiran-4-one, known also as genistein or 4,5,7-trihydroxyisoflavone, has been demonstrated to be an inhibitor of GAGs synthesis in fibroblasts of patients suffering from various types of MPS.²⁷ Subsequent studies on MPS II (Hunter syndrome) and MPS III (Sanfilippo syndrome) – the MPS types in which the neurological symptoms are severe – indicated that genistein, a natural isoflavone, can be effective in the treatment of some symptoms, including behavior and cognitive disabilities, in both mouse models (mice suffering from MPS II and MPS IIIB) and human patients.^{28–31} Improvement was noticed in the short-term treatment of animals with MPS II, and a complete correction of behavior was observed in long-term treatment of animals with MPS IIIB.^{29–30}

In pilot clinical studies conducted for 1 year, it was demonstrated that treatment with a 5 mg/kg/day Genistein-rich isoflavone extract in 10 pediatric patients (3 to 14 years) suffering from MPS IIIA and MPS IIIB resulted in a statistically significant reduction in the concentration of urinary GAGs, changes in hair morphology, and improved cognitive function as assessed by special psychological tests.³¹ No adverse events related to the treatment were reported. The effects of genistein on neurological parameters in MPS animals and humans were assumed to be due to the ability of this isoflavone to cross the BBB, which was previously

demonstrated.³² The mechanism of genistein-mediated substrate reduction was proposed to be due to inhibition of tyrosine-specific protein kinase activity of the epidermal growth factor receptor.³³

Recently, Kloska et al³⁴ tested the effects of other flavonoids (apigenin, daidzein, kaempferol, and naringenin) on GAGs synthesis in cultured fibroblasts from MPS IIIA and MPS IIIB patients. They found that daidzein and kaempferol inhibited GAGs synthesis significantly and as efficiently as genistein. The study also showed that the combination of various flavonoids is more effective in inhibiting GAGs synthesis than the use of any of these compounds alone. Moreover, these compounds were able to reduce lysosomal storage in MPS IIIA fibroblasts and led to inhibition of GAGs synthesis by a mechanism other than blocking of the tyrosine kinase of epidermal growth factor receptors, as happens with genistein. This is important given that the use of tyrosine kinase inhibitors are associated with toxic and/or adverse effects like diarrhea and nausea, as well as skin and cardiac toxicity; therefore, their use in the treatment of MPS patients may result in compliance problems in the long term.

It should be mentioned that most of the trials with genistein are open-label, and the only controlled trial did not find an improvement in CNS function.³⁵ There are suggestions that doses as high as 160 mg/kg may be needed.³⁶ The use of 150 mg/kg for 12 months did not show side effects, but two out of eight patients showed deterioration during this period.³⁷ In conclusion, although natural flavonoids may be an option for SRT in the MPS, further clinical trials are needed to evaluate the efficacy and safety of this potential treatment, and to establish recommended doses.

Rhodamine B

Rhodamine B is a coloring agent also known as DMC Red 37 that used to be used in cosmetics such as lipsticks and soaps. *In vitro* experiments in cultured human lip fibroblasts showed that rhodamine B at concentrations of 25 µg/mL and 50 µg/mL led to a reduction in GAGs synthesis.³⁸ Roberts et al^{39,40} demonstrated that rhodamine B is an effective inhibitor of GAGs production *in vitro* and *in vivo* in the MPS IIIA mouse model; however, the toxicity profile of rhodamine B appears to be unacceptable for its use as a drug for humans. Although recent studies suggest that long-term treatment with low doses of rhodamine B is safe in mice,⁴¹ it is still not clear whether its safety profile would be the same for humans, and whether treatment with such low doses may be effective in improving MPS symptoms, or at least stopping or slowing down disease progression. It is important to mention that

although rhodamine B may decrease the GAGs storage, its use possibly would not affect the levels of gangliosides and other neuronally-stored materials, which seem to contribute to the pathophysiology of MPS disorders.

Pharmacological chaperones

Lysosomal enzymes are synthesized and secreted into the endoplasmic reticulum (ER) in a largely unfolded state. An efficient intracellular system ensures that only properly folded proteins are transported to the Golgi apparatus for further maturation. Misfolded enzymes are rapidly degraded by the proteasome. Specific molecules, called “pharmacological chaperones,” are able to increase residual enzyme activity by rescuing misfolded mutant proteins from rapid endoplasmic reticulum-associated degradation, and promoting the processing and trafficking of mutant enzymes to the lysosomes. As a result, the enzyme is still able to maintain its function, despite the initial misfolding caused by a missense mutation.⁴²

Pharmacological chaperones (PC) therapy has been proposed and investigated as a potential treatment for many genetic diseases, including LSDs, that result from misfolded and/or unstable proteins.^{43,44} As already pointed out, the CNS manifestations of the LSDs do not respond to intravenous ERT due to the inability of these exogenous enzymes to cross the BBB. Other problems include insufficient delivery to relevant tissues and organs, immunogenic reactions, and tolerability.^{45,46} The PC, on the other hand, are small molecules that could be administered orally and could cross the BBB. Despite being a novel approach, there are a few drugs that have been proposed as PC, which are already being investigated in clinical trials.⁴⁴ The treatment of metabolic diseases with competitive inhibitors such as chemical chaperones at subinhibitory intracellular concentrations was first proposed by Fan et al.⁴⁷ They presented evidence that administration of deoxygalactonojirimycin at low concentrations effectively enhanced mutant lysosomal alpha-galactosidase A activities in lymphoblasts from Fabry patients with R301Q or Q279E mutations. Since then, PC have been exploited for other lysosomal storage disorders such as Gaucher, Pompe, Tay–Sachs, Sandhoff, GM1 gangliosidosis, and Niemann–Pick C, as well as for the stabilization of a variety of nonlysosomal proteins of medical interest.^{2,48,49}

One of the disadvantages of a chemical chaperone, however, is the fact that its treatment effect is restricted to patients with missense mutations. PC might not be able to rescue processing mutants where the mutation has affected the active site or where the folding defect is too great to be reversed. The compound must be hydrophobic or be able

to enter the cells through an alternative pathway and reach the ER at concentrations sufficient to promote folding. The concentrations of pharmacological chaperone required for rescue might be too high and produce negative side effects. As in Pompe patients, it may be assumed that only 10%–15% of these patients are amenable to enhancement therapy.^{2,50–51} In MPS, a few molecules have been studied for potential use as chaperones in MPS III. This group includes 2-acetamido-1,2-dideoxyojirimycin and 6-acetamido-6-deoxycastanospermine, which may inhibit the involved enzyme NAGLU (deficient in MPS IIIB) at high concentrations, but these molecules may act as chaperones at lower concentrations.⁵² Feldhammer et al⁵³ observed that glucosamine partially rescued the lysosomal membrane enzyme-deficient in MPS IIIC, which in most cases is retained in the ER and is not targeted to the lysosome. Suzuki et al⁵⁴ are working on a new substance in β -galactosidase (deficient in MPS IVB) gene mutations, with some interesting preliminary results.

SCRT

SCRT is an approach in which there is suppression of premature termination codons (PTC) by the addition of a random amino acid in the PTC position, allowing for full protein translation. The translation termination mechanism is highly conserved among most organisms and is marked by three codons: UAG, UAA, and UGA. The nucleotide sequence around the stop codon also plays an important role in translation termination efficiency. Aminoglycosides, the main drugs used for SCRT purposes, appear to reduce the translation fidelity through proofreading inhibition, as they tend to increase the frequency of amino acid insertions in PTC sites and allow the ribosomes to continue translation.⁵⁵ However, aminoglycosides have minimal effects on normal translation, as their termination signals in eukaryotes are surrounded upstream and downstream by sequences that increase translation termination efficiency.⁵⁶ Therefore, the use of drugs as PTC suppressors in diseases such as the MPS, in which nonsense mutations form a significant portion of disease causing mutations, represents an alternative therapeutic approach.

A few studies have shown that SCRT is influenced by different factors. Keeling and Bedwell⁵⁷ showed that efficiency of stop-codon suppression by gentamicin and amikacin was different for different codons and the adjacent nucleotides. A study of MPS I evaluated gentamicin as treatment for the IDUA p.Q70X and p.W402X mutations in CHO-K1 cells, and showed that the level of SCRT after gentamicin treatment was higher for PTC with lower fidelity stop-codons.⁵⁸

Moreover, SCRT may not be effective in cases with markedly low levels of nonsense transcripts that occur due to the nonsense-mediated mRNA decay mechanism, which is responsible for the degradation of mRNA containing PTC, and was shown to be present in MPS.^{59,60} Linde et al⁶¹ showed that in cases of efficient nonsense-mediated mRNA decay, nonsense transcripts are markedly reduced, being insufficient in generating enough functional proteins even when gentamicin is provided.

Despite the influence of different factors, SCRT has been tested successfully for MPS I, which presents at least 15 PTC mutations. The first study that addressed the use of SCRT for MPS I showed that gentamicin treatment of fibroblasts heterozygous for the p.Q70X and p.W402X mutations restored alpha-L-iduronidase (IDUA) activity to 2.8% of normal levels. Moreover, the treatment was able to reduce the intracellular content of GAGs, resulting in a reduction in lysosomal vacuolation.⁶² Recently, Wang et al investigated the efficiency of SCRT to suppress the p.W392X nonsense mutation using gentamicin, G418, amikacin, paromomycin, and the designer aminoglycosides NB54 and NB84: results showed that NB84 suppressed nonsense mutation more efficiently than the other compounds.⁶³ In vivo treatment reduced urine GAGs excretion and tissue GAGs storage,

showing that this option may have therapeutic efficacy. Although preclinical results are not always reproduced in clinical trials (as occurred with SCRT for Duchenne muscular dystrophy), SCRT may be a potential therapeutic strategy for MPS treatment with the advantage that the drugs used in this approach, as with the drugs used for substrate reduction and chaperone therapies, can be administered orally and are able to cross the BBB. This represents an opportunity for treatment of patients with neurological symptoms.

Gene therapy

The discovery that lysosomal enzymes can be secreted and taken up by adjacent or distant cells via the M6P receptor, thereby bringing about cross-correction, made gene therapy especially attractive for the MPS disorders. Figure 1 shows the rationale for gene therapy in the MPS. Both in vivo and ex vivo protocols using different vectors have been successfully tested in animal models.^{64,65}

Some nonviral approaches have been tested for treatment of MPS. Simple hydrodynamic plasmid injections through the tail vein resulted in partial correction in the MPS I mouse model,⁶⁶ and even better results were achieved in MPS VII mice.⁶⁷ However, the transient expression of the transgene made researchers look for other nonviral methods of gene

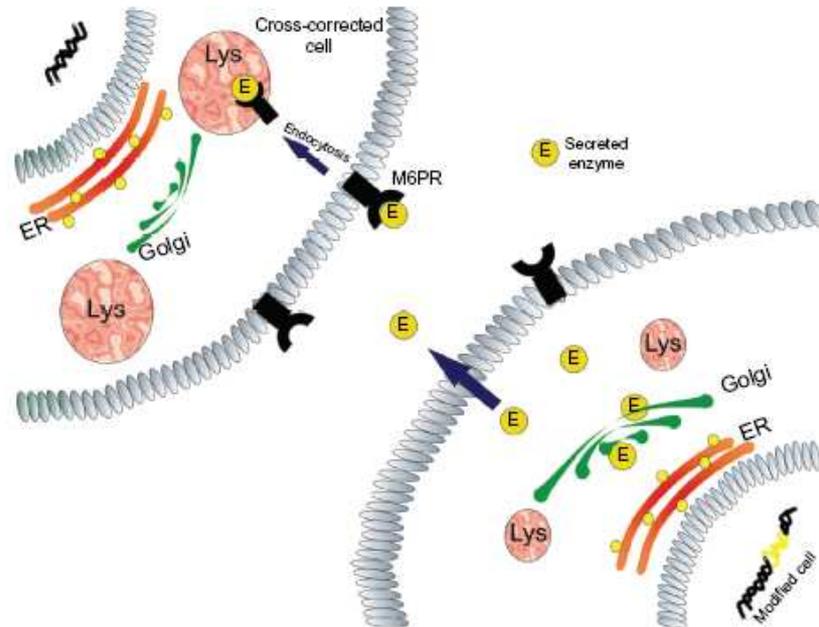


Figure 1 Rationale for gene therapy in MPS disorders.

Notes: The genetically modified cells (at the bottom) produce a normal copy of the enzyme, which is secreted to the extracellular media and is able to be internalized by adjacent cells using the M6PR. The internalized enzyme reduces the glycosaminoglycan storage in the lysosome.

Abbreviations: E, enzyme; M6PR, mannose-6-phosphate receptor; ER, endoplasmic reticulum; MPS, mucopolysaccharidoses.

transfer. In that context, removal of some bacterial sequences from the construct coupled with immunomodulation allowed for long-term expression of IDUA in MPS I mice.⁶⁸ Another interesting approach used the Sleeping Beauty transposon system to allow transgene integration into host cells. IDUA activity in both visceral tissues as well as in the brain was detected after Sleeping Beauty-mediated gene therapy in MPS I mice.⁶⁹ To confer protection against the immune system, cell lines were transfected with plasmids and encapsulated into polymer membranes. This approach has shown benefits in correcting both MPS I cells,⁷⁰ as well as MPS I,^{71,72} MPS II,⁷³ and MPS VII⁷⁴ mice when applied intraperitoneally. MPS VII mice treated with an intraventricular injection of the capsules have also shown improvements in behavioral and biochemical abnormalities,⁷⁵ confirming that this strategy is a potential treatment for the MPS.

However, it should be noted that most gene therapy protocols for MPS include modified viruses as vectors due to their higher efficiency of transduction and long-term gene expression. These vectors have been applied both *in situ* and systemically, depending on the characteristics of the MPS studied. Most viral vectors used for MPS are derived from retroviruses, lentiviruses, and adeno-associated viruses (AAV).

The retroviral vectors have an RNA genome that is copied to DNA and integrates into chromosomes, producing long-term expression. Their main disadvantages include the fact that they only transduce dividing cells and they can produce insertional mutagenesis.⁷⁶ Protocols using a gamma-retrovirus for MPS I and MPS VII resulted in high and stable serum IDUA and GUSB levels, and they complete corrections in both mouse^{64,77-79} and dog models.⁷⁷

Lentiviral vectors are a type of retroviral vector that is able to transduce nondividing cells. Due to this property, they are suitable for the treatment of diseases affecting the CNS. *In situ* delivery of lentiviral vectors has proven to be effective in treating brain abnormalities found in MPS IIIA,⁸⁰ MPS IIIB,⁸¹ and MPS VII⁸² mice. Furthermore, systemically injected lentiviruses also had a positive outcome on somatic and brain diseases.⁸²

In recent years, several studies have tested different serotypes of AAV vectors for gene therapy in MPS. These vectors have a single stranded DNA genome, which is converted into a double-stranded DNA that is able to form concatemers in the nucleus, leading to long-term gene expression; integration into the chromosome occurs occasionally. Several studies have addressed the efficacy of using AAV vectors for different types of MPS. AAV-8 gene therapy has been shown to effectively transduce liver cells and ameliorate somatic and brain

abnormalities in MPS IIIA mice when applied intravenously.⁸³ An intravenous injection of a AAV2/8 vector was able to ameliorate the clinical signs found in MPS VI cats for up to 1 year.⁸⁴ Combining an intravenous and an intracisternal injection of AAV-2 resulted in increased lifespan and correction of brain abnormalities in MPS IIIB mice.⁸⁵ Furthermore, injections of AAV-5.5 or AAV-2.5 in dog models of MPS I and IIIB have shown long-term correction of abnormalities without serious adverse effects.⁸⁶

Other studies have used gene therapy in combination with other therapies as complementary approaches. A study on MPS IIIB mice⁸⁷ evaluated bone marrow transplant alone, intracranial AAV2/5 gene therapy alone, or the combination of both. Combination therapy, compared to either therapy alone, resulted in synergistic effects on hearing as well as CNS lysosomal inclusions; however, antagonistic effects were noted on motor function and lifespan. A second study on MPS I mice compared hematopoietic stem cell transplantation alone (without genetic modifications) or with hematopoietic stem cells transduced with a lentiviral vector.⁶⁶ The *ex vivo* gene therapy approach was able to correct brain and skeletal abnormalities in MPS I mice, which were not corrected in the group treated with nontransduced cells. The authors concluded that the gene therapy was able to augment the efficacy of the stem cell transplant.

Gene therapy also faces problems with the distribution of the vector in the brain, which might be a challenge in larger brains like those found in humans. In addition, we need to learn more about the long-term effects of gene therapy, as the inserted genes would work for decades in humans. With the improvements in vector designs and delivery methods, it is likely that this approach will be tested in the near future, and possibly across different types of MPS. Clinical trials with gene therapy for MPS III types are currently being planned.

Neural stem cells

Neural stem cells (NSC) have been isolated from human and murine brains. These cells possess the capacity to grow indefinitely and the potential to differentiate into three major cell types of CNS cells: neurons, astrocytes, and oligodendrocytes.⁸⁸ The unique properties of NSC include their ability to migrate to distal sites, differentiate into various cell types, and to integrate within the host brain without disrupting normal function.⁸⁹ Therefore, these cells are attractive as delivery vehicles not only for replacing the deficient enzymes in the MPS but also to restore neurological deficits present in these diseases.

In the mouse model of MPS VII, genetically engineered mouse NSC overexpressing GUSB were transplanted into the cerebral ventricles of newborn mice. At maturity, donor-derived cells were present as normal constituents of diverse brain regions, and GUSB activity was detected along the entire neuroaxis, resulting in widespread correction of lysosomal storage in the mouse brain.⁹⁰ Meng et al⁹¹ retrovirally transduced a neural stem cell line derived from human embryonic telencephalon to overexpress GUSB. Cells were transplanted into the cerebral ventricles of neonatal MPS VII mice; 25 days after implant, GAGs storage in the brain was found to be significantly reduced in the transplanted mice. This study provided evidence that human neural stem cells would serve as a useful gene transfer vehicle for the treatment of diffuse CNS alterations in LSDs.⁹² Another research group used fetal neural stem cells derived from embryonic mouse striata, and these were expanded *in vitro* by neurosphere formation. Neurospheres were then transplanted into the lateral ventricles of newborn MPS VII mice, and donor cells migrated far beyond the site of injection within 24 hours. GUSB activity showed a slight increase; however, histological analysis revealed a widespread decrease in lysosomal storage in the recipient's hippocampus, cortex, and ependyma. In addition, functional assessment with

novel-object recognition tests confirmed improvements in behavioral patterns.⁹³

Despite encouraging results in animal models, there are a number of issues to be clarified before NSC as a stem cell-based therapy can be applied in the clinical setting. First, it should be noted that these studies incorporated a murine model; the mouse brain is small, thus allowing for the widespread diffusion of lysosomal enzymes.⁹⁴ Second, the long-term effects are unknown, as mouse experiments are limited to months rather than to the human requirement of years.⁹⁴ Finally, the source of the cells is also a matter of concern. In this sense, induced pluripotent stem cells have major potential advantages because patient-specific neuroblasts are suitable for transplantation, they avoid immune reactions, and they can be produced without the use of human embryonic stem cells.⁹⁵ Although induced pluripotent stem cells have not yet been successfully used in clinical trials, different groups have been successful in generating such cells from MPS VII and MPS IIIB patients.^{96,97} So far, the only investigational application that has been developed to assess the use of human NSC allografts in metabolic disorders was specifically targeted for treating Batten's disease (NCL2), and this therapy seems to have been well tolerated by patients.⁹⁸ Therefore, this seems to be a promising strategy for the MPS with neurological involvement.

Table I Available and emerging therapies for the mucopolysaccharidoses*

MPS	Intravenous ERT	Intrathecal ERT	SRT	Chaperones	SCRT	Gene therapy	NSC
I	Available	Pre-clinical studies published; case report published	–	–	Preclinical studies published	Preclinical studies published	–
II	Available	Clinical trial in progress	Preclinical and clinical studies published	–	–	Preclinical studies published	–
IIIA	–	Clinical trial in progress	Preclinical and clinical studies published	–	–	Preclinical studies published clinical trial in progress	–
IIIB	–	–	Preclinical and clinical studies published	In vitro studies	–	Preclinical studies published	–
IIIC	–	–	–	In vitro studies	–	–	–
IIID	–	–	–	–	–	–	–
IVA	Clinical trial in progress	–	–	–	–	–	–
IVB	–	–	–	In vitro studies	–	–	–
VI	Available	Case report published	–	–	–	Preclinical studies published	–
VII	Preclinical studies ongoing; clinical trial planned	–	–	–	–	Preclinical studies published	Preclinical studies published
IX	–	–	–	–	–	–	–

Note: *This table does not include bone marrow transplantation/hematopoietic stem cell transplantation. HSCT is indicated before 2.5 years of age in severe MPS I, to preserve cognitive function.

Abbreviations: ERT, enzyme replacement therapy; SRT, substrate reduction therapy; SCRT, stop-codon read-through; NSC, neural stem cells.

Conclusion

Over the last decade a whole new set of therapeutic measures have become available or are in development to address the MPS. Intravenous ERT, already approved for MPS I, II, and VI, will possibly be available for both MPS IVA and MPS VII within the next few years. Intrathecal ERT, tested in animals and already reported in a few patients, may become a tool to treat or prevent the CNS manifestations of these diseases. Currently, clinical developments are underway for the severe form of MPS I (associated or not to BMT/HSCT), and for MPS II, MPS IIIA, and possibly for MPS IIIB. Substrate inhibition therapy with small molecules which cross the BBB is also being tested for the MPS types with CNS manifestations (mainly MPS III, but also for MPS II). In vitro studies point out that chaperones may also be a therapeutic tool, with preliminary data indicating that they may be useful in MPS IIIB, MPS IIIC and MPS IVB. SCRT strategy has been tried in preclinical studies for MPS I, and may be a tool to attenuate the clinical manifestations of the severe form of this disease when caused by nonsense mutations. Despite the number of preclinical studies that were conducted to investigate gene therapy, and presented with quite encouraging results, this treatment modality took a long time to move forward into clinical studies; however, it should be noted that a trial for MPS IIIA should begin soon. The use of neural stem cells in the MPS types which have CNS involvement is promising, and more experimental results should become available in the next few years. Table 1 summarizes the present situation regarding the available and emerging options for the MPS diseases.

The MPS are hard-to-treat diseases, which demand, in addition to the available specific therapies, a broad range of supportive measures that are very important to improve the patient's quality of life.⁹⁹ As expected, most of the technology-intensive therapies for rare and ultra-rare diseases have very high costs, which brings an extra challenge for access to these treatments.

Another important point to mention is that early diagnosis followed by early treatment seems to considerably improve patient outcomes.¹⁰⁰ Since there is currently a significant delay in MPS diagnosis after the onset of symptoms,^{101,102} it is important to establish early diagnoses to prevent disease progression; in this light, newborn screening for these diseases (already technically possible) may be considered as a wider set of treatment possibilities become available for these diseases.

Acknowledgment

The authors express their gratitude to Dr Anthony H Fensom for the careful review of the text and for his valuable suggestions.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Neufeld E, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill; 2001:3421–3451.
- Giugliani R, Federhen A, Munoz Rojas MV, et al. [Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidoses I, II and VI: recommendations from a group of Brazilian experts]. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56(3):257–277. Portuguese.
- Beck M. Therapy for lysosomal storage disorders. *IUBMB Life*. 2010;62(1):33–40.
- Valayannopoulos V, Wijburg FA. Therapy for the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50 Suppl 5:v49–v59.
- Clarke LA, Wraith JE, Beck M, et al. Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I. *Pediatrics*. 2009;123(1):229–240.
- Wraith JE, Scarpa M, Beck M, et al. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *Eur J Pediatr*. 2008;167(3):267–277.
- Harmatz P, Giugliani R, Schwartz IV, et al; MPS VI Study Group. Long-term follow-up of endurance and safety outcomes during enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: Final results of three clinical studies of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Mol Genet Metab*. 2008;94(4):469–475.
- Dickson P, Peinovich M, McEntee M, et al. Immune tolerance improves the efficacy of enzyme replacement therapy in canine mucopolysaccharidosis I. *J Clin Invest*. 2008;118(8):2868–2876.
- Horowitz D, Magalhães TSPC, Bonfim C, et al. Enzyme replacement therapy (ERT) and hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in a very young child with Hunter Syndrome: two year follow-up. Abstract Proceedings of the 12th International Symposium on MPS and related diseases; June 28–July 1, 2012; Noordwijkerhout, The Netherlands: p. 103.
- Tomatsu S, Montañó AM, Oikawa H, et al. Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio A disease): clinical review and current treatment. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12(6):931–945.
- Kakkis ED, Neufeld EF. The mucopolysaccharidoses. In: Berg BO, editor. *Principles of Child Neurology*. New York: McGraw-Hill, 1996:1141–1165.
- Dvorak-Ewell M, Wendt D, Hague C, et al. Enzyme replacement in a human model of mucopolysaccharidosis IVA in vitro and its biodistribution in the cartilage of wild type mice. *PLoS One*. 16, 2010;5(8):e12194.
- Tomatsu S, Montañó AM, Dung VC, et al. Enhancement of drug delivery: enzyme-replacement therapy for murine Morquio A syndrome. *Mol Ther*. 2010;18(6):1094–1102.
- BioMarin. BioMarin provides update on GALNS Phase 1/2 Extension Study (MOR-100) [press release]. Novato, CA: Biomarin Pharmaceutical Inc; July 28, 2011. Available from: <http://phx.corporate-ir.net/phoenix.zhtml?c=106657&p=irol-newsArticle&ID=1590497&highlight=>. Accessed February 23, 2012.
- Sly WS, Quinton BA, McAlister WH, Rimoin DL. Beta glucuronidase deficiency: report of clinical, radiologic, and biochemical features of a new mucopolysaccharidosis. *J Pediatr*. 1973;82(2):249–257.
- Sly WS. Enzyme replacement therapy: from concept to clinical practice. *Acta Paediatr Suppl*. 2002;91(439):71–78.

17. Vogler C, Levy B, Grubb JH, et al. Overcoming the blood-brain barrier with high-dose enzyme replacement therapy in murine mucopolysaccharidosis VII. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(41):14777–14782.
18. National MPS Society. *A Guide to Understanding MPS VII*. Durham, NC: National MPS Society; 2008. Available from: http://www.mpsociety.org/wp-content/uploads/2011/07/MPS_VII_2008.pdf. Accessed February 23, 2012.
19. Chen AH, Dickson PI. Enzyme replacement therapy for cognitive decline in mucopolysaccharidosis Type I: past, present, and future. *Lysosomal Storage Diseases*. 2011;9(1):9–16.
20. Auclair D, Finnie J, White J, et al. Repeated intrathecal injections of recombinant human-4-sulphatase remove dural storage in mature mucopolysaccharidosis VI cats primed with a short-course tolerisation regimen. *Mol Gen Metab*. 2010;99(2):132–141.
21. Dickson PI, Hanson S, McEntee ME, et al. Early versus late treatment of spinal cord compression with long-term intrathecal enzyme replacement therapy in canine mucopolysaccharidosis type I. *Mol Genet Metab*. 2010;101(2–3):115–122.
22. Kakkis E, Lester T, Yang R, et al. Successful induction of immune tolerance to enzyme replacement therapy in canine mucopolysaccharidosis I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(3):829–834.
23. Munoz-Rojas MV, Vieira T, Costa R, et al. Intrathecal enzyme replacement therapy in a patient with mucopolysaccharidosis type I and symptomatic spinal cord compression. *Am J Med Genet A*. 2008;146A(19):2538–2544.
24. Munoz-Rojas MV, Horovitz DD, Jardim LB, et al. Intrathecal administration of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase to a MPS VI patient with pachymeningitis cervicalis. *Mol Genet Metab*. 2010;99(4):346–350.
25. Jakóbkiewicz-Banecka J, Węgrzyn A, Węgrzyn G. Substrate deprivation therapy: a new hope for patients suffering from neuronopathic forms of inherited lysosomal storage diseases. *J Appl Genet*. 2007;48(4):383–388.
26. Roberts AL. *Substrate Deprivation as a Novel Therapy for the Mucopolysaccharidoses* [doctoral thesis]. South Australia: University of Adelaide; 2007.
27. Piotrowska E, Jakóbkiewicz-Banecka J, Baranska S, et al. Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses. *Eur J Hum Genet*. 2006;14(7):846–852.
28. Friso A, Tomanin R, Salvalaio M, Scarpa M. Genistein reduces glycosaminoglycan levels in a mouse model of mucopolysaccharidosis type II. *Br J Pharmacol*. 2010;159(5):1082–1091.
29. Malinowska M, Wilkinson FL, Bennett W, et al. Genistein reduces lysosomal storage in peripheral tissues of mucopolysaccharide IIIB mice. *Mol Genet and Metab*. 2009;98(3):235–242.
30. Malinowska M, Wilkinson FL, Langford-Smith KJ, et al. Genistein improves neuropathology and corrects behaviour in a mouse model of neurodegenerative metabolic disease. *PLoS One*. 2010;5(12):e14192.
31. Piotrowska E, Jakóbkiewicz-Banecka J, Tyłki-Szymanska A, et al. Genistin-rich soy isoflavone extract in substrate reduction therapy for Sanfilippo syndrome: an open-label, pilot study in 10 pediatric patients. *Current Therapeutic Research*. 2008;69(2):166–179.
32. Tsai TH. Concurrent measurement of unbound genistein in the blood, brain and bile of anesthetized rats using microdialysis and its pharmacokinetic application. *J Chromatogr A*. 2005;1073(1–2):317–322.
33. Akiyama T, Ishida J, Nagakawa S, et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*. 1987;262(12):5592–5595.
34. Kloska A, Jakóbkiewicz-Banecka J, Narajczyk M, Banecka-Majkutewicz Z, Węgrzyn G. Effects of flavonoids on glycosaminoglycan synthesis: implications for substrate reduction therapy in Sanfilippo disease and other mucopolysaccharidoses. *Metab Brain Dis*. 2011;26(1):1–8.
35. Wijburg FA, Valstar MJ, Ruijter de J. Genistein: results of clinical trials. Proceedings of the 12th International Symposium on MPS and related diseases; June 28–July 1, 2012; Noordwijkerhout, The Netherlands: p. 43.
36. Bigger B. Genistein: animal studies and a new trial. 12th International Symposium on MPS and related diseases. Proceedings of the 12th International Symposium on MPS and related diseases; June 28–July 1, 2012; Noordwijkerhout, The Netherlands: p. 44.
37. Kim K, Dodsworth C, Paras A, Burton BK. High dose synthetic genistein treatment in MPS patients with neurological involvement. Proceedings of the 12th International Symposium on MPS and related diseases; June 28–July 1, 2012; Noordwijkerhout, The Netherlands: p. 76.
38. Kaji T, Kawashima T, Sakamoto M. Rhodamine B inhibition of glycosaminoglycan production by cultured human lip fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1991;111(1):82–89.
39. Roberts AL, Thomas BJ, Wilkinson AS, Fletcher JM, Byers S. Inhibition of glycosaminoglycan synthesis using rhodamine B in a mouse model of mucopolysaccharidosis type IIIA. *Pediatr Res*. 2006;60(3):309–314.
40. Roberts AL, Rees MH, Klebe S, Fletcher JM, Byers S. Improvement in behaviour after substrate deprivation therapy with rhodamine B in a mouse model of MPS IIIA. *Mol Genet Metab*. 2007;92(1–2):115–121.
41. Roberts AL, Fletcher JM, Moore L, Byers S. Trans-generational exposure to low levels of rhodamine B does not adversely affect litter size or liver function in murine mucopolysaccharidosis type IIIA. *Mol Genet Metab*. 2010;101(2–3):208–213.
42. Fan JQ, Ishii S. Active-site-specific chaperone therapy for Fabry disease. Yin and Yang of enzyme inhibitors. *FEBS J*. 2007;274(19):4962–4971.
43. Parenti G. Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics. *EMBO Mol Med*. 2009;1(5):268–279.
44. Schiffmann R. Therapeutic approaches for neuronopathic lysosomal storage disorders. *J Inher Metab Dis*. 2010;33(4):373–379.
45. Lim-Melia ER, Kronn DF. Current enzyme replacement therapy for the treatment of lysosomal storage diseases. *Pediatr Ann*. 2009;38(8):448–455.
46. Valenzano KJ, Khanna R, Powe AC, et al. Identification and characterization of pharmacological chaperones to correct enzyme deficiencies in lysosomal storage disorders. *Assay Drug Dev Technol*. 2011;9(3):213–235.
47. Fan JQ, Ishii S, Asano N, Suzuki Y. Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat Med*. 1999;5(1):112–115.
48. Germain DP, Fan JQ. Pharmacological chaperone therapy by active-site-specific chaperones in Fabry disease: in vitro and preclinical studies. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2009;47 Suppl 1:S111–S117.
49. Beck M. Emerging drugs for lysosomal storage diseases. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2010;15(3):495–507.
50. Loo TW, Clarke DM. Chemical and pharmacological chaperones as new therapeutic agents. *Expert Rev Mol Med*. 2007;9(16):1–18.
51. Porto C, Cardone M, Fontana F, et al. The pharmacological chaperone N-butyldeoxyjirimycin enhances enzyme replacement therapy in Pompe disease fibroblasts. *Mol Ther*. 2009;17(6):964–971.
52. de Ruijter J, Valstar MJ, Wijburg FA. Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo Syndrome): emerging treatment strategies. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12(6):923–930.
53. Feldhammer M, Durand S, Pshzhetsky AV. Protein misfolding as an underlying molecular defect in mucopolysaccharidosis III type C. *PLoS One*. 2009;4(10):e7434.
54. Suzuki Y, Ogawa S, Sakakibara Y. Chaperone therapy for neuronopathic lysosomal diseases: competitive inhibitors as chemical chaperones for enhancement of mutant enzyme activities. *Perspect Medicin Chem*. 2009;3:7–19.
55. Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, et al. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med*. 2003;349(15):1433–1441.
56. Linde L, Kerem B. Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases. *Trends Genet*. 2008;24(11):552–563.
57. Keeling KM, Bedwell DM. Clinically relevant aminoglycosides can suppress disease-associated premature stop mutations in the IDUA and P53 cDNAs in a mammalian translation system. *J Mol Med (Berl)*. 2002;80(6):367–376.

58. Hein LK, Bawden M, Muller VJ, Sillence D, Hopwood JJ, Brooks DA. Alpha-L-iduronidase premature stop codons and potential read-through in mucopolysaccharidosis type I patients. *J Mol Biol*. 2004;338(3):453–462.
59. Menon KP, Neufeld EF. Evidence for degradation of mRNA encoding alpha-L-iduronidase in Hurler fibroblasts with premature termination alleles. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1994;40(7):999–1005.
60. Lualdi S, Di Rocco M, Corsolini F, et al. Identification of nine new IDS alleles in mucopolysaccharidosis II. Quantitative evaluation by real-time RT-PCR of mRNAs sensitive to nonsense-mediated and nonstop decay mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762(4):478–484.
61. Linde L, Boelz S, Nissim-Rafinia M, et al. Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J Clin Invest*. 2007;117(3):683–692.
62. Keeling KM, Brooks DA, Hopwood JJ, Li P, Thompson JN, Bedwell DM. Gentamicin-mediated suppression of Hurler syndrome stop mutations restores a low level of alpha-L-iduronidase activity and reduces lysosomal glycosaminoglycan accumulation. *Hum Mol Genet*. 2001;10(3):291–299.
63. Wang D, Belakhov V, Kandasamy J, et al. The designer aminoglycoside NB84 significantly reduces glycosaminoglycan accumulation associated with MPS I-H in the Idua-W392X mouse. *Mol Genet Metab*. 2012;105(1):116–125.
64. Chung S, Ma X, Liu Y, Lee D, Tittiger M, Ponder KP. Effect of neonatal administration of a retroviral vector expressing alpha-L-iduronidase upon lysosomal storage in brain and other organs in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Genet Metab*. 2007;90(2):181–192.
65. Visigalli I, Delai S, Politi LS, et al. Gene therapy augments the efficacy of hematopoietic cell transplantation and fully corrects mucopolysaccharidosis type I phenotype in the mouse model. *Blood*. 2010;116(24):5130–5139.
66. Camassola M, Braga LM, Delgado-Cañedo A, et al. Nonviral in vivo gene transfer in the mucopolysaccharidosis I murine model. *J Inherit Metab Dis*. 2005;28(6):1035–1043.
67. Richard M, Arfi A, Seguin J, Gandolphe C, Scherman D. Widespread biochemical correction of murine mucopolysaccharidosis type VII pathology by liver hydrodynamic plasmid delivery. *Gene Ther*. 2009;16(6):746–756.
68. Osborn MJ, McElmurry RT, Lees CJ, et al. Minicircle DNA-based gene therapy coupled with immune modulation permits long-term expression of α -L-iduronidase in mice with mucopolysaccharidosis type I. *Mol Ther*. 2011;19(3):450–460.
69. Aronovich EL, Bell JB, Khan SA, et al. Systemic correction of storage disease in MPS I NOD/SCID mice using the sleeping beauty transposon system. *Mol Ther*. 2009;17(7):1136–1144.
70. Baldo G, Quoos Mayer F, Bunin M, Carrillo-Farga J, Matte U, Giugliani R. Recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase correct enzyme deficiency in human mucopolysaccharidosis type I cells. *Cells Tissues Organs*. 2012;195(4):323–329.
71. Piller Puicher E, Tomanin R, Salvalaio M, et al. Encapsulated engineered myoblasts can cure Hurler syndrome: preclinical experiments in the mouse model. *Gene Therapy*. 2012;19(4):355–364.
72. Baldo G, Mayer FQ, Martinelli B, et al. Intraperitoneal implant of recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase partially corrects visceral pathology in mucopolysaccharidosis type I mice. *Cytotherapy*. 2012;14(7):860–867.
73. Friso A, Tomanin R, Alba S, et al. Reduction of GAG storage in MPS II mouse model following implantation of encapsulated recombinant myoblasts. *J Gene Med*. 2005;7(11):1482–1491.
74. Ross CJ, Bastedo L, Maier SA, Sands MS, Chang PL. Treatment of a lysosomal storage disease, mucopolysaccharidosis VII, with microencapsulated recombinant cells. *Hum Gene Ther*. 2000;11(15):2117–2127.
75. Ross CJ, Ralph M, Chang PL. Somatic gene therapy for a neurodegenerative disease using microencapsulated recombinant cells. *Exp Neurol*. 2000;166(2):276–286.
76. Haccin-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. 2003;348(3):255–256.
77. Mango RL, Xu L, Sands MS, et al. Neonatal retroviral vector-mediated hepatic gene therapy reduces bone, joint, and cartilage disease in mucopolysaccharidosis VII mice and dogs. *Mol Genet Metab*. 2004;82(1):4–19.
78. Baldo G, Wu S, Howe RA, et al. Pathogenesis of aortic dilatation in mucopolysaccharidosis VII mice may involve complement activation. *Mol Genet Metab*. 2011;104(4):608–619.
79. Herati RS, Ma X, Tittiger M, Ohlemiller KK, Kovacs A, Ponder KP. Improved retroviral vector design results in sustained expression after adult gene therapy in mucopolysaccharidosis I mice. *J Gene Med*. 2008;10(9):972–982.
80. McIntyre C, Derrick Roberts AL, Ranieri E, Clements PR, Byers S, Anson DS. Lentiviral-mediated gene therapy for murine mucopolysaccharidosis type IIIA. *Mol Genet Metab*. 2008;93(4):411–418.
81. Di Natale P, Di Domenico C, Di Napoli D. Serum MIP-1 alpha level: a biomarker for the follow-up of lentiviral therapy in mucopolysaccharidosis IIIB mice. *J Inherit Metab Dis*. 2010;33(2):159–165.
82. Bielicki J, McIntyre C, Anson DS. Comparison of ventricular and intravenous lentiviral-mediated gene therapy for murine MPS VII. *Mol Genet Metab*. 2010;101(4):370–382.
83. Ruzo A, Garcia M, Ribera A, et al. Liver production of sulfamidase reverses peripheral and ameliorates CNS pathology in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Mol Ther*. 2012;20(2):254–266.
84. Cotugno G, Annunziata P, Tessitore A, et al. Long-term amelioration of feline Mucopolysaccharidosis VI after AAV-mediated liver gene transfer. *Mol Ther*. 2011;19(3):461–469.
85. Fu H, Kang L, Jennings JS, et al. Significantly increased lifespan and improved behavioral performances by rAAV gene delivery in adult mucopolysaccharidosis IIIB mice. *Gene Ther*. 2007;14(14):1065–1077.
86. Ellinwood NM, Ausseil J, Desmaris N, et al. Safe, efficient, and reproducible gene therapy of the brain in the dog models of Sanfilippo and Hurler syndromes. *Mol Ther*. 2011;19(2):251–259.
87. Heldermon CD, Ohlemiller KK, Herzog ED, et al. Therapeutic efficacy of bone marrow transplant, intracranial AAV-mediated gene therapy, or both in the mouse model of MPS IIIB. *Mol Ther*. 2010;18(5):873–880.
88. Kim S. Genetically engineered human neural stem cells for brain repair in neurological diseases. *Brain Dev*. 2007;29(4):193–201.
89. Shihabuddin LS, Cheng SH. Neural stem cell transplantation as a therapeutic approach for treating lysosomal storage diseases. *Neurotherapeutics*. 2011;8(4):659–667.
90. Snyder EY, Taylor RM, Wolfe JH. Neural progenitor cell engraftment corrects lysosomal storage throughout the MPS VII mouse brain. *Nature*. 1995;374(6520):367–370.
91. Meng XL, Shen JS, Ohashi T, Maeda H, Kim S, Eto Y. Brain transplantation of genetically engineered human neural stem cells globally corrects brain lesions in the mucopolysaccharidosis type VII mouse. *J Neurosci Res*. 2003;74(2):266–277.
92. Eto Y, Shen JS, Meng XL, Ohashi T. Treatment of lysosomal storage disorders: cell therapy and gene therapy. *J Inherit Metab Dis*. 2004;27(3):411–415.
93. Fukuhara Y, Li XK, Kitazawa Y, et al. Histopathological and behavioral improvement of murine mucopolysaccharidosis type VII by intracerebral transplantation of neural stem cells. *Mol Ther*. 2006;13(3):548–555.
94. Sidman RL, Li J, Stewart GR, Clarke J, Yang W, Snyder EY, Shihabuddin LS. Injection of mouse and human neural stem cells into neonatal Niemann-Pick A model mice. *Brain Res*. 2007;1140:195–204.
95. Feng Z, Gao F. Stem cell challenges in the treatment of neurodegenerative disease. *CNS Neurosci Ther*. 2012;18(2):142–148.
96. Meng XL, Shen JS, Kawagoe S, Ohashi T, Brady RO, Eto Y. Induced pluripotent stem cells derived from mouse models of lysosomal storage disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(17):7886–7891.

97. Lemonnier T, Blanchard S, Toli D, et al. Modeling neuronal defects associated with a lysosomal disorder using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet.* 2011;20(18):3653–3666.
98. Kohan R, Cismondi IA, Oller-Ramirez AM, et al. Therapeutic approaches to the challenge of neuronal ceroid lipofuscinoses. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011;12(6):867–883.
99. Giugliani R, Federhen A, Muñoz-Rojas MV, et al. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genet Mol Biol.* 2010;33(4):589–604.
100. McGill JJ, Inwood AC, Coman DJ, et al. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI from 8 weeks of age – a sibling control study. *Clin Genet.* 2010;77(5):492–498.
101. Vieira T, Schwartz I, Muñoz V, et al. Mucopolysaccharidoses in Brazil: what happens from birth to biochemical diagnosis? *Am J Med Genet A.* 2008;146A(13):1741–1747.
102. Alonso-Fernández JR, Fidalgo J, Colón C. Neonatal screening for mucopolysaccharidoses by determination of glycosaminoglycans in the eluate of urine-impregnated paper: preliminary results of an improved DMB-based procedure. *J Clin Lab Anal.* 2010;24(3):149–153.

Research and Reports in Endocrine Disorders

Publish your work in this journal

Research and Reports in Endocrine Disorders is an international, peer-reviewed, open access journal publishing original research, reports, reviews and commentaries on all areas of endocrinology, endocrine disorders and therapeutic interventions. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/research-and-reports-in-endocrine-disorders-journal>

peer-review system. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Dovepress

11.5 APÊNDICE 5 – Artigo publicado na Revista HCPA (2013)

Imagem Diagnóstica

SÍNDROME DE OSLER-WEBER-RENDU

OSLER-WEBER-RENDU SYNDROME

Maurício Farenzena¹, Amalia Izaura Nair Medeiros Klaes¹,
Andre Anjos², Jefferson Andre Bauer³, Felipe Soares Torres¹

Revista HCPA. 2013;33(1):106-107

¹ Serviço de Radiologia e Diagnóstico por Imagem, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Porto Alegre, RS, Brasil.

² Serviço de Genética Médica, HCPA. Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Serviço de Otorrinolaringologia, HCPA. Porto Alegre, RS, Brasil

Contato:
Maurício Farenzena
mfarenzena84@aol.com
Porto Alegre, RS, Brasil

Homem de 68 anos, branco, apresentava história de episódios frequentes de epistaxe e obstrução nasal com alívio após o sangramento, sem resposta satisfatória ao tratamento com anti-inflamatórios e corticoide nasal. O paciente foi submetido a adenoidectomia e septoplastia, além de múltiplos procedimentos de cauterização da mucosa nasal para controle dos sintomas. Ao exame clínico, observavam-se telangiectasias na face e na língua, e à rinoscopia, telangiectasias no septo nasal e cornetos. Lesão polipoide no septo da fossa nasal direita foi biopsiada, com diagnóstico histológico de hemangioma capilar. O paciente persistiu com anemia ferropriva, mesmo após reposição adequada de ferro, vitamina B12 e ácido fólico. Considerando-se o aspecto das lesões e a presença de anemia crônica, a hipótese de Síndrome de Osler-Weber-Rendu foi sugerida e angiotomografia de tórax realizada para a avaliação de malformações arteriovenosas (MAVs) pulmonares.

A angiotomografia computadorizada do tórax demonstrou pequenas estruturas nodulares e outras diminutas opacidades em vidro despolido em ambos os pulmões, compatíveis com MAVs (figuras 1 e 2). Considerando-se que o paciente já apresentava epistaxe espontânea recorrente e telangiectasias em locais típicos, a presença de MAVs pulmonares confirmou o diagnóstico de Síndrome de Osler-Weber-Rendu.



Figura 1: Tomografia computadorizada com reconstrução coronal utilizando projeção de intensidade máxima (MIP) e com janela de mediastino demonstrando malformação arteriovenosa no lobo inferior esquerdo. Seta amarela – ramo da artéria pulmonar; Seta vermelha – ramo da veia pulmonar.



Figura 2: Tomografia computadorizada com reconstrução coronal utilizando projeção de intensidade máxima (MIP) e com janela de pulmão demonstrando malformação.