

I

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

GERALDO MAGELA FERNANDES

**PANORAMA DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS SOLÚVEIS EM
GESTANTES COM DIAGNÓSTICO DE COVID-19 NOS DIFERENTES
TRIMESTRES DE GESTAÇÃO, DESFECHOS CLÍNICOS NEONATAIS E
PERFIL ANTROPOMÉTRICO NO PRIMEIRO ANO DE VIDA: UM ESTUDO
EXPLORATÓRIO**

BRASÍLIA

2023

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

GERALDO MAGELA FERNANDES

**PANORAMA DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS SOLÚVEIS EM
GESTANTES COM DIAGNÓSTICO DE COVID-19 NOS DIFERENTES
TRIMESTRES DE GESTAÇÃO, DESFECHOS CLÍNICOS NEONATAIS E
PERFIL ANTROPOMÉTRICO NO PRIMEIRO ANO DE VIDA: UM ESTUDO
EXPLORATÓRIO**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Gonçalves de Castro

BRASÍLIA

2023

GERALDO MAGELA FERNANDES

**PANORAMA DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS SOLÚVEIS EM
GESTANTES COM DIAGNÓSTICO DE COVID-19 NOS DIFERENTES
TRIMESTRES DE GESTAÇÃO, DESFECHOS CLÍNICOS NEONATAIS E
PERFIL ANTROPOMÉTRICO NO PRIMEIRO ANO DE VIDA: UM ESTUDO
EXPLORATÓRIO**

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas
pelo Programa de Pós-graduação em Ciências
Médicas da Universidade de Brasília

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Claudio Gonçalves de Castro (Presidente)

Professor da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB)
Professor do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da
Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília

Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Professora da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB)
Professora do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da
Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília

Profa. Dra. Marta David Rocha de Moura

Professora da Escola Superior de Ciências da Saúde (ESCS) – DF
Secretaria de Estado da Saúde do Distrito Federal - DF

Prof. Dr. Paulo Roberto Margotto

Hospital Materno Infantil de Brasília – DF
Secretaria de Estado da Saúde do Distrito Federal - DF

Profa. Dra. Meimei Guimarães Junqueira de Queirós (Suplente)

Professora da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB)
Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília

Fernandes, Geraldo Magela

Panorama de mediadores inflamatórios solúveis em gestantes com diagnóstico de COVID-19 nos diferentes trimestres de gestação, desfechos clínicos neonatais e perfil antropométrico no primeiro ano de vida: um estudo exploratório.

.Brasília, 2023.

124 p.:il.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Orientador: Luiz Claudio Gonçalves de Castro

1. COVID-19 2. SARS-CoV-2 3. Gestantes 4. Mediadores inflamatórios solúveis 5. Desfechos clínicos 6. Recém-nascidos

Dedico este trabalho as memórias de Elzúita, Ana Cristina e Patrícia...
Gostaria de um dia poder dizer a elas que cuidamos dos
seus filhos com todo carinho e amor.

Agradecimentos

Agradeço a toda energia positiva do universo que conspiraram para que eu tivesse persistência, inteligência e êxito na realização desta pesquisa.

Agradeço ao meu marido, companheiro de vida, de alegria, de incentivo, de apoio e de amor: Caio Frederico Silva.

Agradeço aos meus pais que me deixaram o exemplo do respeito, da honestidade, da compaixão, da ética e do amor ao próximo, fundamentais na realização de qualquer trabalho.

Agradeço às minhas irmãs, aos meus irmãos, Tia Kotinha, meus cunhados e sobrinhos que sempre foram a minha torcida.

Agradeço à Universidade de Brasília, Hospital Universitário de Brasília e à Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, instituições públicas fundamentais na realização de pesquisas.

Agradeço ao SUS por possibilitar o acompanhamento dos pacientes envolvidos neste estudo.

Agradeço especialmente a cada família envolvida neste estudo que mesmo em um período de extrema comoção mundial não mediu esforços para acompanharem seus filhos no ambulatório de pediatria.

Agradeço às Áreas de Medicina da Criança e do Adolescente e de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília que tanto ajudaram no esforço coletivo da elaboração deste projeto.

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Claudio Gonçalves de Castro por me incentivar, apoiar em todos os momentos deste projeto e ter me acolhido nas horas difíceis.

Agradeço a Dra. Lizandra Moura Paravidine Sasaki, uma grande irmã-científica durante todo este trabalho desde a concepção do estudo, coletas dos materiais biológicos e análises dos dados.

Agradeço a Profa. Dra. Rosana Tristão, pelo incentivo e empolgação contínuos e pela imensa contribuição na concepção da parte pediátrica do estudo.

Agradeço a Profa. Dra. Karina Nascimento Costa e ao Prof. Dr. José Alfredo Lacerda de Jesus pelo incentivo e pela concepção da parte pediátrica do estudo.

Agradecimento muito especial aos meus grandes amigos e parceiros nesta jornada, Dr. Felipe Motta e Dra. Maria Eduarda Canellas de Castro. Sem eles não teria chegado até aqui.

Agradeço ao Dr. David Araújo Júnior por toda contribuição na concepção parte pediátrica do estudo, principalmente nos estudos de imagens.

Agradeço as Enfermeiras Yácara, Kelly, Tatiane e Denise fundamentais nas coletas e armazenamento dos materiais biológicos.

Agradeço ao Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho e toda a equipe do Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz – MG pelas análises laboratoriais dos materiais biológicos utilizados neste estudo e por toda paciência na avaliação de cada resultado, na análise na elaboração dos gráficos.

Agradeço aos residentes de Programa de Residência Médica em Pediatria do Hospital Regional de Sobradinho e do Programa de Residência Médica em Pediatria do Hospital Universitário de Brasília que muito contribuíram na avaliação de seguimento dos recém-nascidos, em especial: Amanda do Carmo, Lucas do Carmo, Isabela Frota, Rayssa Lima, Felipe Yung e Heloisa Gouveia.

Agradeço aos internos do curso de medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília que muito contribuíram nos atendimentos dos recém-nascidos, em especial à Luísa Marques da turma 102.

Agradeço a Profa. Dra. Caroline Oliveira Alves e às terapeutas ocupacionais Pabline e Wanessa por contribuírem tanto com o andamento do ambulatório e na avaliação de desenvolvimento dos recém-nascidos.

Agradeço aos meus alunos de PIBIC 2020/2021 em especial Rodrigo Nery, da turma 107 do curso de medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, e Lucas Lauand, da turma 105 do curso de medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília; que foram fundamentais na catalogação das amostras biológicas e na administração no nosso banco de dados.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas

Gerais (FAPEMIG) e o Universidade de Brasília (Grant # 7155, “Fundo COVID-19 UnB em Ação: Ações emergenciais para combate à COVID-19 e mitigação das consequências da pandemia”, “Eficácia de um protocolo de testagem RT-PCR para SARS-CoV-2 sobre a preservação da força de trabalho em saúde durante a pandemia COVID-19 no Brasil: ensaio clínico randomizado” e Grant # 7110, “Amamentar em tempos de pandemia de COVID-19: um protocolo para avaliação do impacto do SARS-COV-2 no sucesso do aleitamento materno”).

Nada foi em vão! Valeu a pena se doar às pessoas e às amizades

Mário Quintana

RESUMO

Fundamentos: A descrição das consequências maternas, fetais e pediátricas da infecção por SARS-CoV-2 ocorrida no período gestacional e a investigação dos mecanismos subjacentes são ferramentas importantes ao melhor entendimento da doença e na provisão de evidências para melhores cuidados e tratamentos da díade mãe-filho, baseados em evidências científicas.

Objetivos: Caracterizar as mudanças fisiológicas que ocorrem no perfil dos mediadores imunológicos durante a gestação, estudar as mudanças na resposta imunológica em gestantes infectadas pelo SARS-CoV-2 em diferentes trimestres da gestação e correlacioná-las com desfechos clínicos e antropométricos em seus recém-nascidos no período perinatal e no primeiro ano de vida dos lactentes.

Métodos: Estudo realizado em duas fases. Na primeira fase, ocorreu um estudo observacional prospectivo projetado para caracterizar o estado imunológico de mulheres grávidas com COVID-19 convalescente e análise panorâmica da interação entre mediadores inflamatórios séricos solúveis. Uma amostra de 141 gestantes de todos os períodos gestacionais compreendeu pacientes com infecção convalescente por SARS-CoV-2 entre 3 a 20 semanas após o início dos sintomas (COVID, n=89) e um grupo controle de gestantes não infectadas cujo material para análise dos mediadores inflamatórios séricos foi colhido no período pré-pandêmico (GC, n=52). Na segunda fase, um total de 262 recém-nascidos de gestantes que tiveram infecção por SARS-CoV-2 com início dos sintomas durante o período gestacional foram divididos em três grupos de acordo com o trimestre em que ocorreu a infecção materna: 1º trimestre (n=58), 2º trimestre (n=80) e 3º trimestre (n=124). Nesse grupo, estudou-se as correlações entre o perfil imunológico das gestantes e a gravidade da COVID materna com desfechos clínicos e antropométricos de seus filhos ao nascimento e no primeiro ano de vida.

Resultados: Na primeira fase do estudo, os níveis de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento foram quantificados por uma matriz de microesferas de alto rendimento. No grupo GC, a maioria dos mediadores solúveis inflamatórios séricos apresentou diminuição fisiológica progressiva no 2º e 3º trimestre de gravidez, enquanto níveis mais altos de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento foram observados no grupo de pacientes com COVID-19. As assinaturas de mediadores inflamatórios séricos solúveis e a análise do mapa de calor apontaram que o maior aumento observado no grupo COVID estava relacionado a citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ e IL-17). A análise de um conjunto maior de biomarcadores mostrou um aumento da razão entre os mediadores inflamatórios nos

grupos COVID/GC no 2º (aumento de três vezes) e no 3º (aumento de três a 15 vezes) trimestres. A análise de rede integrativa demonstrou que a gravidez no GC evolui com conectividade decrescente entre pares de mediadores inflamatórios solúveis séricos em direção ao 3º trimestre. Embora o grupo COVID tenha apresentado um perfil semelhante, o número de conexões foi notavelmente menor ao longo da gravidez. Na segunda fase do estudo, encontrou-se uma incidência maior de gestantes que evoluíram para quadros mais graves quando infectadas no 3º trimestre ($p < 0.001$) e maior incidência de prematuridade ($p = 0,0246$). Não houve diferenças nas medidas antropométricas ao nascimento, quando os neonatos foram comparados pelo trimestre gestacional em que ocorreu a infecção materna ou pela gravidade da COVID-19 materna. Em relação ao seguimento longitudinal da antropometria no primeiro ano de vida desse grupo de crianças, encontrou-se menor ganho de peso no primeiro mês de vida entre os lactentes cujas mães tiveram COVID-19 no 2º e 3º trimestres gestacionais em comparação ao grupo 1º trimestre ($p = 0,0152$) e menor ganho de peso no grupo cujas mães tiveram COVID grave ($p = 0,0148$). Em relação ao comprimento, não houve diferença nos ganhos ao longo do primeiro ano de vida entre os grupos, mas na avaliação intragrupo observou-se menor ganho no primeiro mês de vida entre os filhos de mães com COVID grave e com infecção no 3º trimestre gestacional. Em relação ao perímetro cefálico, a avaliação intragrupos mostrou menor ganho no primeiro mês em todos os grupos, o qual persistiu no 6º mês de vida entre os lactentes, exceto no grupo cujas mães tiveram COVID no 1º trimestre gestacional. A melhora do ganho de perímetro cefálico ocorreu aos 12 meses, exceto no grupo de filhos de mães COVID não grave.

Conclusão: No grupo de gestantes com COVID-19, encontrou-se aumento pronunciado nos níveis séricos de mediadores inflamatórios solúveis no 3º trimestre, associado à diminuição da interação em rede entre eles. A maior gravidade da COVID nas gestantes associou-se a maior frequência de prematuridade e de encaminhamento dos neonatos à Unidade de Terapia Intensiva Neonatal. Não houve diferenças no perfil antropométrico ao nascimento dos neonatos, independente do grupo. No entanto, o perfil antropométrico dos lactentes ao longo do primeiro ano de vida apresentou padrões diferentes em relação aos ganhos de peso, comprimento e perímetro cefálico, ao se comparar os grupos de acordo com a gravidade da COVID materna e com o período gestacional em que ocorreu a infecção pelo SARS-CoV-2.

Palavras-chave: 1. COVID-19 2. SARS-CoV-2 3. Gravidez 4. Mediadores inflamatórios solúveis 5. Desfechos clínicos 6. Recém-nascido

ABSTRACT

Background: The description of the maternal, fetal and pediatric consequences of SARS-CoV-2 infection occurring during pregnancy and investigating the underlying mechanisms is crucial for a better understanding of the disease and providing evidence for better care and treatments for the mother dyad -son, based on scientific evidence.

Objectives: To characterize the physiological changes that occur in the profile of immunological mediators during pregnancy, to study changes in the immunological response in pregnant women infected by SARS-CoV-2 in different trimesters of pregnancy and to correlate them with clinical and anthropometric outcomes in their newborns. born in the perinatal period and in the first year of the infants' lives.

Methods: Study carried out in two phases. In the first phase, a prospective observational study designed to characterize the immunological status of pregnant women with convalescent COVID-19 and panoramic analysis of the interaction between soluble serum inflammatory mediators took place. A sample of 141 pregnant women from all gestational periods comprised patients with convalescent SARS-CoV-2 infection between 3 and 20 weeks after the onset of symptoms (COVID, n=89) and a control group of uninfected pregnant women whose material for analysis of serum inflammatory mediators was collected in the pre-pandemic period (CG, n=52). In the second phase, a total of 262 newborns born to pregnant women who had SARS-CoV-2 infection with the onset of symptoms during the gestational period were divided into three groups according to the trimester in which the maternal infection occurred: 1st trimester (n=58), 2nd trimester (n=80) and 3rd trimester (n=124). In this group, correlations were studied between the immunological profile of pregnant women and the severity of maternal COVID with clinical and anthropometric outcomes of their children at birth and during the first year of life.

Results: In the first phase of the study, levels of chemokines, pro-inflammatory cytokines, regulatory cytokines and growth factors were quantified using a high-throughput microsphere array. In the GC group, the majority of serum soluble inflammatory mediators showed a progressive physiological decrease in the 2nd and 3rd trimester of pregnancy, while higher levels of chemokines, cytokines and growth factors were observed in the COVID-19 patient group. Soluble serum inflammatory mediator signatures and heatmap analysis indicated that the greatest increase observed in the COVID group was related to pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF-, IL-12, IFN- and IL-17 α) γ . Analysis of a larger set of biomarkers showed an increase in the ratio of inflammatory mediators in the COVID/GC groups in the 2nd (three-fold increase) and 3rd (three- to 15-fold increase) trimesters. Integrative network analysis demonstrated

that pregnancy in GC evolves with decreasing connectivity between pairs of serum soluble inflammatory mediators towards the 3rd trimester. Although the COVID group had a similar profile, the number of connections was notably lower throughout the pregnancy. In the second phase of the study, a higher incidence of pregnant women who developed more severe conditions when infected in the 3rd trimester ($p < 0.001$) and a higher incidence of prematurity ($p = 0.0246$) was found. There were no differences in anthropometric measurements at birth when neonates were compared by the gestational trimester in which the maternal infection occurred or by the severity of maternal COVID-19. Regarding longitudinal anthropometry follow-up in the first year of life of this group of children, less weight gain was found in the first month of life among infants whose mothers had COVID-19 in the 2nd and 3rd trimesters of pregnancy compared to the 1st trimester group. ($p = 0.0152$) and less weight gain in the group whose mothers had severe COVID ($p = 0.0148$). In relation to length, there was no difference in gains over the first year of life between the groups, but in the intra-group assessment, lower gains were observed in the first month of life among children of mothers with severe COVID and with infection in the 3rd trimester of pregnancy. . In relation to head circumference, the intragroup assessment showed a smaller gain in the first month in all groups, which persisted in the 6th month of life among infants, except in the group whose mothers had COVID in the 1st gestational trimester. The improvement in head circumference gain occurred at 12 months, except in the group of children of mothers with non-severe COVID.

Conclusion: In the group of pregnant women with COVID-19, a pronounced increase in serum levels of soluble inflammatory mediators was found in the 3rd trimester, associated with a decrease in the network interaction between them. Greater severity of COVID in pregnant women was linked to a higher incidence of prematurity and referral of newborns to the Neonatal Intensive Care Unit. There were no differences in the anthropometric profile of the newborns at birth, regardless of the group. However, the anthropometric profile of infants during the first year of life revealed distinct patterns in terms of weight gain, length, and head circumference, when comparing the groups based on the severity of maternal COVID and the gestational period during which the SARS-CoV-2 infection occurred.

Keywords: 1. COVID-19 2. SARS-CoV-2 3. Pregnancy 4. Inflammatory soluble mediators 5. Clinical outcomes 6. Newborn

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de casos semanais de COVID-19 diagnosticados ao longo do tempo, apresentado de acordo com as Regiões do mundo.	1
Figura 2: Número de óbitos semanais decorrentes da COVID-19 ao longo do tempo, apresentado de acordo com as Regiões do mundo.	2
Figura 3: Estrutura do SARS-CoV-2.	3
Figura 4: Patogênese da COVID-19.	4
Figura 5: Variantes e substituições de aminoácidos do SARS-CoV-2 relacionados à virulência.	6
Figura 6: Ativação dos dois braços do sistema imune durante uma infecção viral.	9
Figura 7: Efeitos da infecção pelo SARS-CoV-2 nos processos imunológicos e fisiológicos através dos mediadores inflamatórios solúveis.	11
Figura 8: Mecanismos de ação de mediadores inflamatórios solúveis na infecção pelo SARS-CoV-2 e danos associados.	15
Figura 9: Estratégias terapêuticas para combater a tempestade de citocinas na COVID-19.	16
Figura 10: Implantação do blastocisto e resposta inflamatória.	19
Figura 11: Desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias.	20
Figura 12: Sinalização inflamatória mediada por infecção na gravidez.	21
Figura 13: Visão geral do processo de detecção do imunoensaio Luminex.	34
Figura 14: Quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias séricas em pacientes convalescentes com COVID-19 em diferentes trimestres de gravidez.	43
Figura 15: Citocinas reguladoras séricas e fatores de crescimento em pacientes convalescentes com COVID-19 em diferentes trimestres de gravidez.	44
Figura 16: Resumo das principais alterações nos mediadores solúveis séricos em pacientes do grupo controle e do grupo convalescentes com COVID-19 em diferentes trimestres de gravidez.	47
Figura 17: Assinaturas de mediadores solúveis séricos em pacientes do grupo controle e do grupo de convalescentes com COVID-19 em diferentes trimestres de gravidez.	49
Figura 18: Assinaturas de mediadores solúveis séricos em pacientes convalescentes com COVID-19 em trimestres distintos de gravidez, de acordo com valores de referência de controles saudáveis correspondentes ao trimestre.	51
Figura 19: Redes de mediadores solúveis séricos em pacientes convalescentes de COVID-19 em diferentes trimestres de gravidez.	52
Figura 20: Análise descritiva das redes de mediadores solúveis séricos em pacientes convalescentes com COVID-19 em diferentes trimestres de gravidez.	56
Figura 21: Distribuição de gestantes graves ou críticas e não graves por trimestre de gestação.	62
Figura 22: Proporção de recém-nascidos a termo e pré-termo por trimestre de gestação.	62

Figura 23: Variação dos valores médios de 17-OH-Progesterona (ng/mL) do recém-nascido de acordo com o trimestre de infecção materna.....	63
Figura 24: Proporção de recém-nascidos termo e pré-termo de acordo com a gravidade materna durante a COVID-19.....	65
Figura 25: Proporção de recém-nascidos com indicação de internação em UTI de acordo com a gravidade materna durante a COVID-19.	65
Figura 26: Variação dos valores médios de 17OH-Progesterona (ng/mL) do recém-nascido de acordo com a gravidade materna durante a COVID-19.	66
Figura 27: Variação do Z-escore médio de (a) peso, (b) comprimento, (c) perímetro cefálico e (d) IMC ao longo de 12 meses de acordo com o trimestre de infecção materna.....	68
Figura 28- Variação do Z-escore médio de (a) peso, (b) comprimento, (c) perímetro cefálico e (d) IMC ao longo de 12 meses de acordo com a gravidade materna durante a COVID-19.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Papel de alguns mediadores solúveis na COVID-19.	12
Tabela 2 – Características da população do estudo	40
Tabela 3 – Características da população de recém-nascidos baseada no trimestre de infecção materna por SARS-CoV-2 na gestação.	61
Tabela 4 – Características da população de recém-nascidos baseada na gravidade de infecção materna por SARS-CoV-2 na gestação.	64
Tabela 5 – Comparações entre grupos para as variáveis Z-escore peso, Z-escore comprimento, Z-escore perímetro cefálico e Z-escore IMC de acordo com o trimestre de infecção materna	66
Tabela 6 – Comparações entre grupos para as variáveis Z-Escore peso, Z-Escore comprimento, Z-Escore perímetro cefálico e Z-Escore IMC de acordo com a gravidade da infecção materna.	70
Tabela 7 – Resumo da comparação intergrupos da evolução antropométrica ao longo do primeiro ano de vida, de acordo com a gravidade da COVID materna e o trimestre gestacional em que ocorreu a infecção.	73
Tabela 8 – Resumo da comparação intragrupos da evolução antropométrica ao longo do primeiro ano de vida, de acordo com a gravidade da COVID materna e com o trimestre gestacional em que ocorreu a infecção.	73

ABREVIATURAS E SIGLAS

17OH – 17-hidroxi-progesterona
 ADAM17: Desintegrina e metaloprotease 17;
 AIG – adequado para idade gestacional
 ALCON – alojamento conjunto
 AME – aleitamento materno exclusivo
 CCL11 – Ligante 11 de Quimiocina (do inglês Chemokine ligand 11)
 CCL2 – Ligante 2 de Quimiocina (do inglês Chemokine ligand 2)
 CCL3 – Ligante 3 de Quimiocina (do inglês Chemokine ligand 3)
 CCL4 – Ligante 4 de Quimiocina (do inglês Chemokine ligand 4)
 CCL5 – Ligante 5 de Quimiocina (do inglês Chemokine ligand 5)
 CD - cluster de diferenciação (do inglês cluster of differentiation);
 Células NK: células assassinas naturais
 CMV – citomegalovírus
 CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Brasil
 COVID-19 – Doença do Coronavírus de 2019 (do inglês Corona Virus Disease 2019)
 CXCL10 – quimiocina 10
 CXCL8 – quimiocina 8
 DF – Distrito Federal
 ECA II – Enzima Conversora de Angiotensina II
 FGF-basic – Fator básico do crescimento de fibroblastos (do inglês Basic Fibroblast Growth Factor)
 FIO2: Fração inspirada de oxigênio;
 FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
 Flt1: tirosina quinase 1 semelhante a Fms;
 Foxp3: Caixa de forquilha P3;
 G-CSF – Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos (do inglês Granulocyte colony-stimulating factor)
 GC – Grupo controle
 GIG – grande para a idade gestacional
 GM-CSF – Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (do inglês Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
 HAS – hipertensão arterial sistêmica
 HIV – vírus da imunodeficiência humana
 HRAN – Hospital Regional da Asa Norte
 HSV – vírus herpes simples
 HUB – Hospital Universitário de Brasília
 IFNs: Interferons;
 IgG – Imunoglobulina G
 IgM – Imunoglobulina G
 IL-10 – Interleucina-10 (do inglês Interleukin-10)
 IL-12 – Interleucina-12 (do inglês Interleukin-12)
 IL-13 – Interleucina-13 (do inglês Interleukin-13)
 IL-15 – Interleucina-15 (do inglês Interleukin-15)
 IL-17 – Interleucina-17 (do inglês Interleukin-17)
 IL-1Ra – Interleucina-1Ra (do inglês Interleukin-1Ra)
 IL-1 β - Interleucina-1 β (do inglês Interleukin-1 β)
 IL-2 – Interleucina-2 (do inglês Interleukin-2)
 IL-4 – Interleucina-4 (do inglês Interleukin-4)
 IL-6 – Interleucina-6 (do inglês Interleukin-6)
 IL-8 – Interleucina-8 (do inglês Interleukin-8)
 IL-9 – Interleucina-9 (do inglês Interleukin-9)
 IMC – índice de massa corporal
 INF γ - Interferon- γ

JAK - Janus quinase (do inglês Janus kinase) ;
 MERS-CoV – Síndrome Respiratória do Oriente Médio por Coronavírus (do inglês Middle Eastern Respiratory Syndrome – Coronavirus)
 MHC - complexo principal de histocompatibilidade (do inglês major histocompatibility complex);
 MPO – Mieloperoxidase;
 NETs – Armadilhas extracelulares de neutrófilos;
 NIH – do inglês National Institutes of Health
 NT-proBNP– peptídeo natriurético pró-B tipo N-terminal;
 OMS – Organização Mundial de Saúde
 PaO₂: Pressão parcial de oxigênio;
 PC – Perímetro cefálico
 PCR – proteína C reativa;
 PD-1: Morte programada 1;
 PD-1: Proteína 1 de morte celular programada;
 PD-L1: Ligante da proteína de morte programada 1;
 PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (do inglês Platelet Derived Growth Factor)
 PIG – pequeno para a idade gestacional
 PIGF – Fator de crescimento placentário;
 PMNs – Polimorfonucleares;
 PROUDEST – Pregnancy Outcome and Child Development – Effects of SARS-CoV-2 Infection Trial
 ReBEC – Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos
 RN – Recém-nascido
 RNA – ácido ribonucleico (do inglês ribonucleic acid)
 RT-PCR – do inglês Real Time – Polymerase Chain Reaction
 RuV – vírus da rubéola
 s4-1BB: membro 9 solúvel da superfamília do ligante do fator de necrose tumoral (sTNFSF9);
 sACE2, enzima conversora de angiotensina solúvel 2;
 sACE2: Enzima conversora de angiotensina solúvel 2;
 SARS-CoV – Síndrome Respiratória Aguda Grave por Coronavírus (do inglês Severe Acute Respiratory Syndrome – Coronavirus)
 SARS-CoV-2 – Síndrome Respiratória Aguda Grave por Coronavírus 2 (do inglês Severe Acute Respiratory Syndrome – Coronavirus 2)
 sBTLA: Atenuador solúvel de linfócitos B e T;
 sCTLA-4: Antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos solúveis;
 SDRA – síndrome do desconforto respiratório aguda
 sFLT-1 – Tirosina quinase-1 tipo fms solúvel;
 sGITR – Proteína solúvel relacionada ao TNFR induzida por glicocorticóide;
 sHVEM – Mediador solúvel de entrada do herpesvírus;
 sIDO – Indolamina 2,3-dioxigenase solúvel;
 sIL6R – receptor solúvel de interleucina 6;
 sLAG-3– gene 3 de ativação de linfócitos solúveis;
 sP-selectina– Marcadores solúveis de ativação plaquetária;
 sPDL-1, ligante solúvel 1 de morte celular programada;
 SRA: Sistema Renina-Angiotensina;
 SRAG – síndrome respiratória aguda grave
 sRAGE, receptor solúvel para produtos finais de glicação avançada;
 STAT, transdutor de sinal e ativador de transcrição (do inglês signal transducer and activator of transcription);
 sTim-3 – domínio de imunoglobulina de células T solúveis e domínio de mucina 3;
 sTNFR1&II – receptor solúvel do fator de necrose tumoral 1&2;
 suPAR – receptor ativador de plasminogênio tipo uroquinase solúvel;

TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido
TCR – receptor de células T (do inglês T-cell receptor)
TH1 – Linfócito T auxiliar do tipo 1 (do inglês T-helper lymphocyte-1)
TMPRSS2 – Serino protease Transmembrana do tipo 2 (do inglês TransMembrane serine protease 2)
TNF α – Fator de Necrose Tumoral α (do inglês Tumor Necrosis Factor- α)
TNF-Rs – Receptores do fator de necrose tumoral;
UTIN – Unidade de Terapia Intensiva Neonatal
VEGF – fator de crescimento endotelial vascular (do inglês Vascular endotelial growth factor)
VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular;
ZIKV – zika vírus
ZV – Varicela zóster

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	COVID-19 – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	1
1.2.	COVID-19: ORIGEM, PATOGÊNESE E ASPECTOS EVOLUTIVOS AO LONGO DO TEMPO	2
1.3.	MEDIADORES INFLAMATÓRIOS SOLÚVEIS E COVID-19	8
1.4.	COVID-19 NA GESTAÇÃO	17
1.5.	MEDIADORES INFLAMATÓRIOS SOLÚVEIS E GESTAÇÃO	19
1.6.	FORMAS GRÁFICAS DE ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS SOLÚVEIS	22
1.7.	COVID-19: DESFECHOS NEONATAIS E PEDIÁTRICOS	24
1.8.	HIPÓTESE DO ESTUDO	29
1.9.	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	29
2.	OBJETIVOS	30
2.1.	OBJETIVO PRIMÁRIO	30
2.2.	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	30
3.	METODOLOGIA	31
3.1.	ASPECTOS GERAIS	31
3.2.	PRIMEIRA FASE DO ESTUDO	32
3.2.1.	<i>População estudada</i>	32
3.2.2.	<i>Amostras biológicas</i>	33
3.2.3.	<i>Quantificação de mediadores inflamatórios solúveis no soro</i>	33
3.2.4.	<i>Análise estatística</i>	34
3.3.	SEGUNDA FASE DO ESTUDO	36
3.3.1.	<i>Desenho do estudo</i>	36
3.3.2.	<i>Cálculo amostral</i>	36
3.3.3.	<i>Período e local do estudo</i>	37
3.3.4.	<i>Composição da Amostra</i>	37
3.3.5.	<i>Procedimentos Operacionais</i>	37
3.3.6.	<i>Análise estatística</i>	39
3.4.	ASPECTOS ÉTICOS	39
4.	RESULTADOS	40
4.1.	ANÁLISE DESCRITIVA DA POPULAÇÃO DE GESTANTES DA PRIMEIRA FASE DO ESTUDO	40
4.2.	PANORAMA GERAL DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS SOLÚVEIS SÉRICOS NA COVID-19 CONVALESCENTE EM DIFERENTES TRIMESTRES DE GRAVIDEZ	41
4.3.	ASSINATURAS DE MEDIADORES SOLÚVEIS SÉRICOS EM PACIENTES CONVALESCENTES COM COVID-19 EM DIFERENTES TRIMESTRES DE GRAVIDEZ	47
4.4.	REDES DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS SOLÚVEIS SÉRICOS EM COVID-19 CONVALESCENTE EM DIFERENTES TRIMESTRES DE GRAVIDEZ	52
4.5.	ANÁLISE DESCRITIVA DE REDES DE MEDIADORES SOLÚVEIS SÉRICOS EM PACIENTES CONVALESCENTES COM COVID-19 EM DIFERENTES TRIMESTRES DE GRAVIDEZ	54
4.6.	ANÁLISE DESCRITIVA DA AMOSTRA DE RECÉM-NASCIDOS	60
4.7.	ANÁLISE LONGITUDINAL DE DADOS ANTROPOMÉTRICOS DOS RECÉM-NASCIDOS	66
5.	DISCUSSÃO	74
6.	CONCLUSÃO	88
7.	REFERÊNCIAS	90
8.	ANEXOS	108

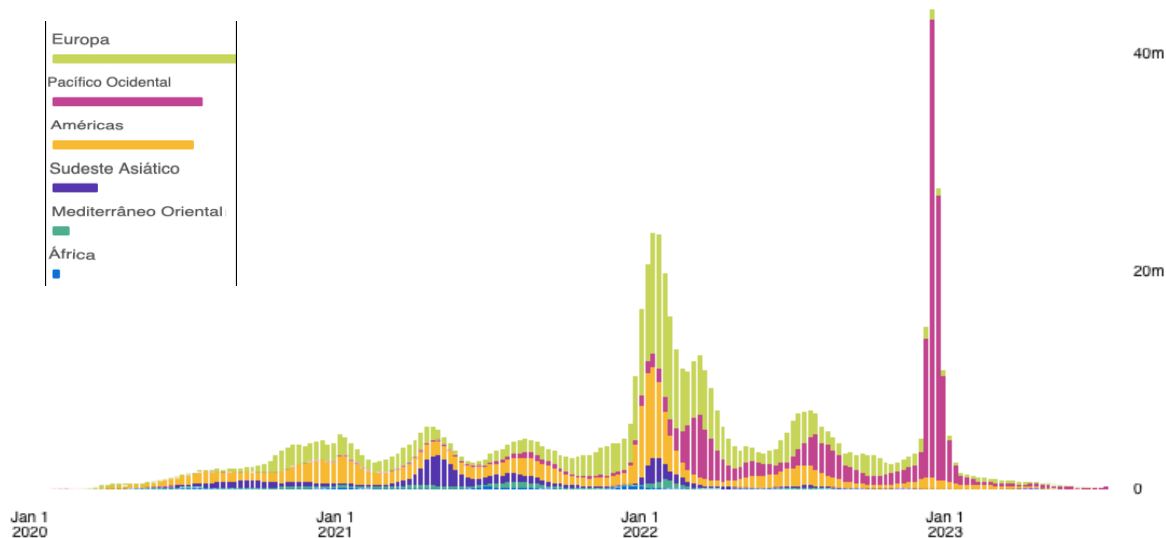
ANEXO 1 – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	108
ANEXO 2 - OUTRAS PUBLICAÇÕES RELACIONADAS AO ESTUDO PROUDEST (EM PARCERIA COM OUTROS AUTORES)	113
9. APÊNDICES	114
APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	114
APÊNDICE 2 – PLANILHA DE DADOS DO ESTUDO	115
APÊNDICE 3 – PLANILHA DE COLETA DE DADOS DE SEGUIMENTO DE CONSULTAS	116
APÊNDICE 4 - ARTIGO COM DADOS ORIGINAIS DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM GESTANTES – PRÉ REQUISITO PARA A DEFESA DO DOUTORADO	117

1. INTRODUÇÃO

1.1. COVID-19 – Dados Epidemiológicos

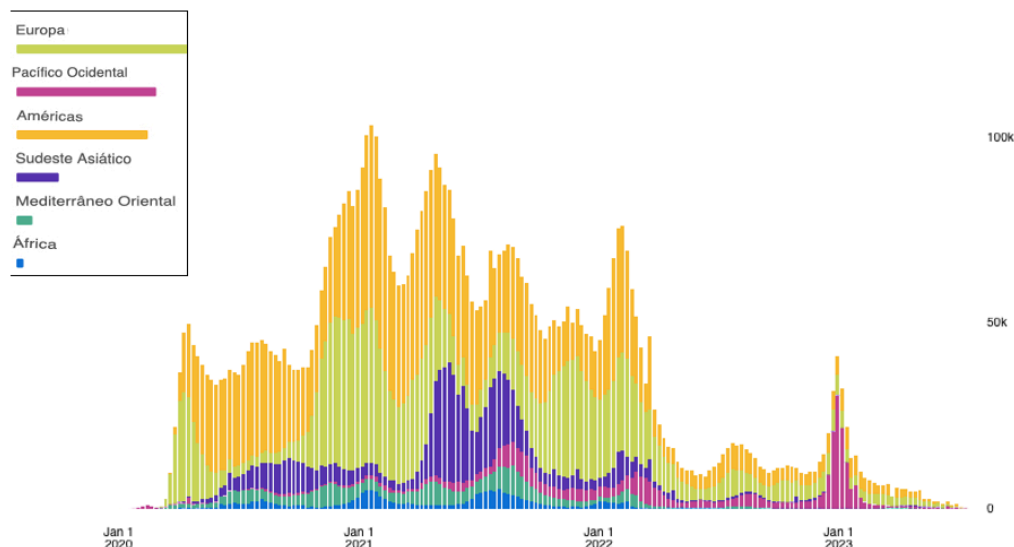
A Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a infecção pelo novo coronavírus SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, síndrome respiratória aguda grave causada pelo coronavírus 2), denominada COVID-19 (*coronavirus disease 19*, doença do coronavírus 19), como pandemia em março de 2020. Desde os primeiros casos da doença na China, a comunidade científica tem descrito a sua história e evolução em diversas perspectivas, mas há ainda várias situações sem resposta (1). Foram confirmados, desde então, mais de 768 milhões de casos de COVID-19, com 6,9 milhões dos quais resultaram em morte (2) (Figura 1 e Figura 2).

Figura 1: Número de casos semanais de COVID-19 diagnosticados ao longo do tempo, apresentado de acordo com as Regiões do mundo.



Adaptado de OMS, 2023 (2)

Figura 2: Número de óbitos semanais decorrentes da COVID-19 ao longo do tempo, apresentado de acordo com as Regiões do mundo.



Adaptado de OMS, 2023 (2)

1.2. COVID-19: Origem, patogênese e aspectos evolutivos ao longo do tempo

O vírus SARS-CoV-2 é o mais novo coronavírus conhecido a infectar seres humanos. Os coronavírus são vírus envelopados com um genoma de fita de RNA de aproximadamente 30.000 bases. O SARS-CoV-2 pertence ao gênero *Betacoronavirus*, que também inclui o vírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e o vírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) (3).

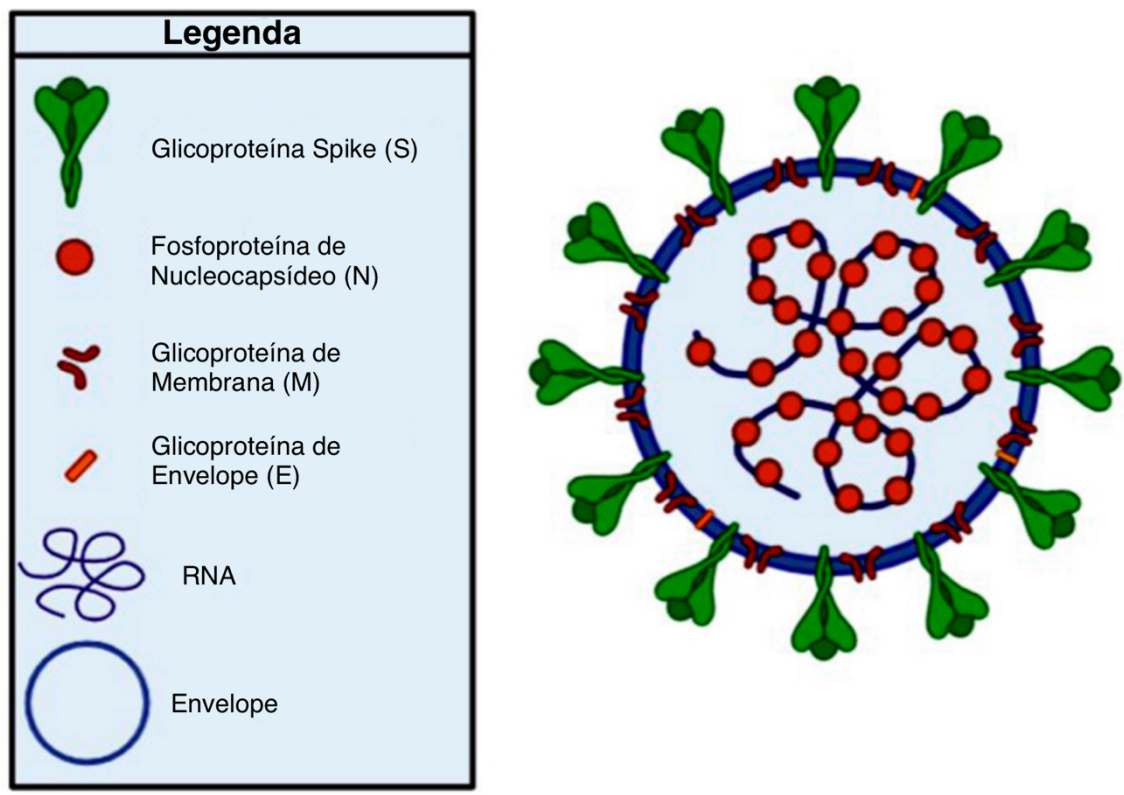
SARS-CoV-2, SARS-CoV e MERS-CoV apresentam similaridades e diferenças. SARS-CoV-2 e SARS-CoV apresentam 79% de coincidência genômica enquanto SARS-CoV-2 e MERS-CoV, 50%. Em relação à clínica, a infecção pelo SARS-CoV-2 mostrou-se mais contagiosa e menos grave quando comparada às infecções por SARS-CoV e MERS-CoV (4).

As origens do SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 são consideradas zoonóticas. Tanto o SARS-CoV quanto o MERS-CoV se originaram em morcegos e se espalharam diretamente através de uma espécie de gato asiático (*Paradoxurus hermaphroditus*) e camêlos para os humanos, enquanto que em relação ao SARS-CoV-2 ainda o mecanismo não está elucidado (5).

As quatro proteínas estruturais do SARS-CoV-2— (1) *Spike* (S) glicoproteína, (2) glicoproteína do envelope (E), (3) glicoproteína da membrana (M) e (4) proteína do nucleocapsídeo (N) — são responsáveis pela replicação e estruturação viral, ligação do

vírus com receptores celulares bem como para a patogenicidade do vírus (**Figura 3**). A proteína *spike* S, na superfície do vírus, permite a entrada do SARS-CoV-2 nas células alvo, através da ligação dessa proteína a um receptor celular. O vírus envolve a enzima conversora de angiotensina II (ECA II) e a serina protease celular TMPRSS2 da célula hospedeira ativa a fusão da proteína S com a membrana celular (**Figura 3**).(6).

Figura 3: Estrutura do SARS-CoV-2.



Adaptado de Bakhshandeh et al (21)

O SARS-CoV-2 pode ser detectado diretamente através de dois principais testes, o teste de amplificação de ácido nucleico (sendo o principal o RT-PCR – *Real Time – Polimerase Chain Reaction*) e o teste do antígeno (imunoensaios que detectam proteínas específicas do vírus), a partir do material colhido com um *swab* de nasofaringe (7,8).

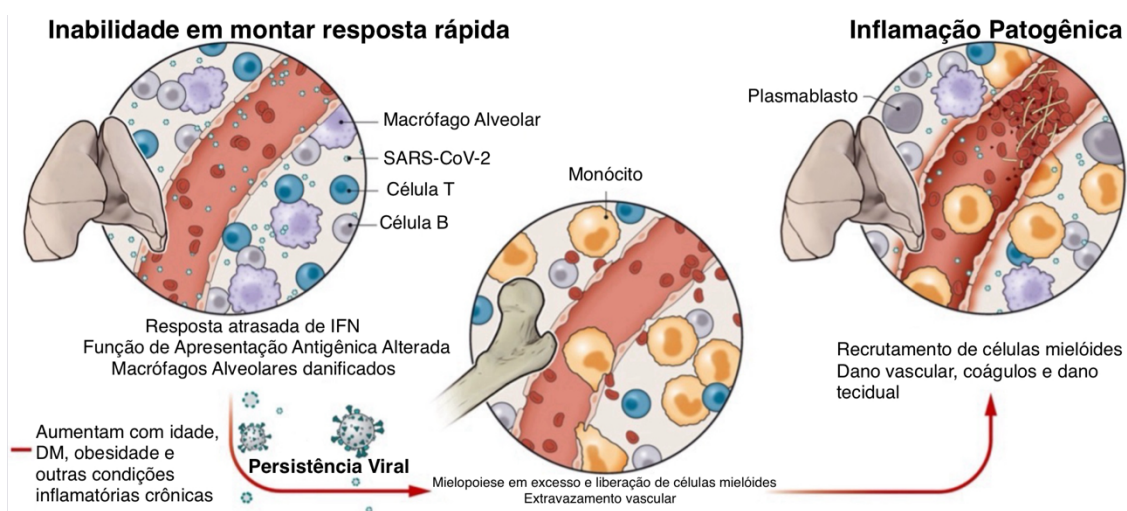
O SARS-CoV-2 pode ser transmitido por gotículas no ar, contato direto, secreções respiratórias e fecal-oral de indivíduos sintomáticos ou assintomáticos. Os sintomas iniciais da COVID-19 podem variar de totalmente assintomáticos a doença grave e morte. As manifestações mais comuns são febre, tosse e falta de ar. Outros sintomas adicionais comuns incluem fadiga, mialgias, náuseas, vômitos, diarreia, cefaleia, fraqueza, rinorreia, anosmia e ageusia. Este quadro clínico pode gradativamente evoluir para pneumonia, síndrome respiratória aguda grave (SRAG),

lesão hepática, lesão cardíaca, trombose e doença neurológica (9–11).

A principal alteração patológica nos pacientes com COVID-19 é o edema pulmonar, seguido de lesão alveolar difusa com a formação de membranas hialinas. São observados nos alvéolos a hiperplasia de pneumócitos tipo II, presença de macrófagos, monócitos e mediadores inflamatórios de células mononucleares intersticiais (12).

A patogênese da COVID-19 é complexa e tem sido fortemente associada a uma resposta imune desequilibrada (6,13). A incapacidade de apresentar uma estratégia imune eficaz é multifatorial. Os principais fatores associados a este processo são i) a inibição na resposta antiviral precoce dos interferons (INF) do tipo I das células hospedeiras, ii) a alteração na função de apresentação de antígeno e iii) o conjunto de macrófagos alterados, comum em obesos, diabéticos, idosos e portadores de doenças inflamatórias crônicas. Estas situações promovem a persistência viral e danos teciduais prolongados, além de recrutar células mielóides inflamatórias prejudiciais para o local infectado. O aumento da mielopoiese e dano vascular contribuem ainda mais para o incremento na liberação de células mielóides inflamatórias da medula óssea para a circulação sanguínea e seu recrutamento para o local da infecção levando a dano tecidual profundo, lesões vasculares e coágulos sanguíneos. Esta situação é comum em pacientes com doença grave. (14). (Figura 4).

Figura 4: Patogênese da COVID-19.



Adaptado de Merad et al, 2023

O SARS-CoV-2, após adentrar nas células epiteliais respiratórias, desencadeia uma resposta imune com a liberação de citocinas inflamatórias. A grande liberação de citocinas pelo sistema imunológico em resposta à infecção viral e/ou infecções

secundárias é seguida pela infiltração de macrófagos e neutrófilos no tecido pulmonar, o que resulta em uma tempestade de citocinas. O vírus pode ativar as células TH1 patogênicas a secretarem citocinas pro-inflamatórias como o fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos (GM-CSF) e interleucina-6 (IL-6). O GM-CSF estimula os monócitos patogênicos a liberarem mais IL-6, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e as outras citocinas (15). A tempestade de citocinas na COVID-19 é representada principalmente por altas concentrações de IL-6 e TNF- α (16). Nesses casos, a inflamação descontrolada causa danos a múltiplos órgãos, levando à falência especialmente dos sistemas cardíaco, hepático e renal. (17–19).

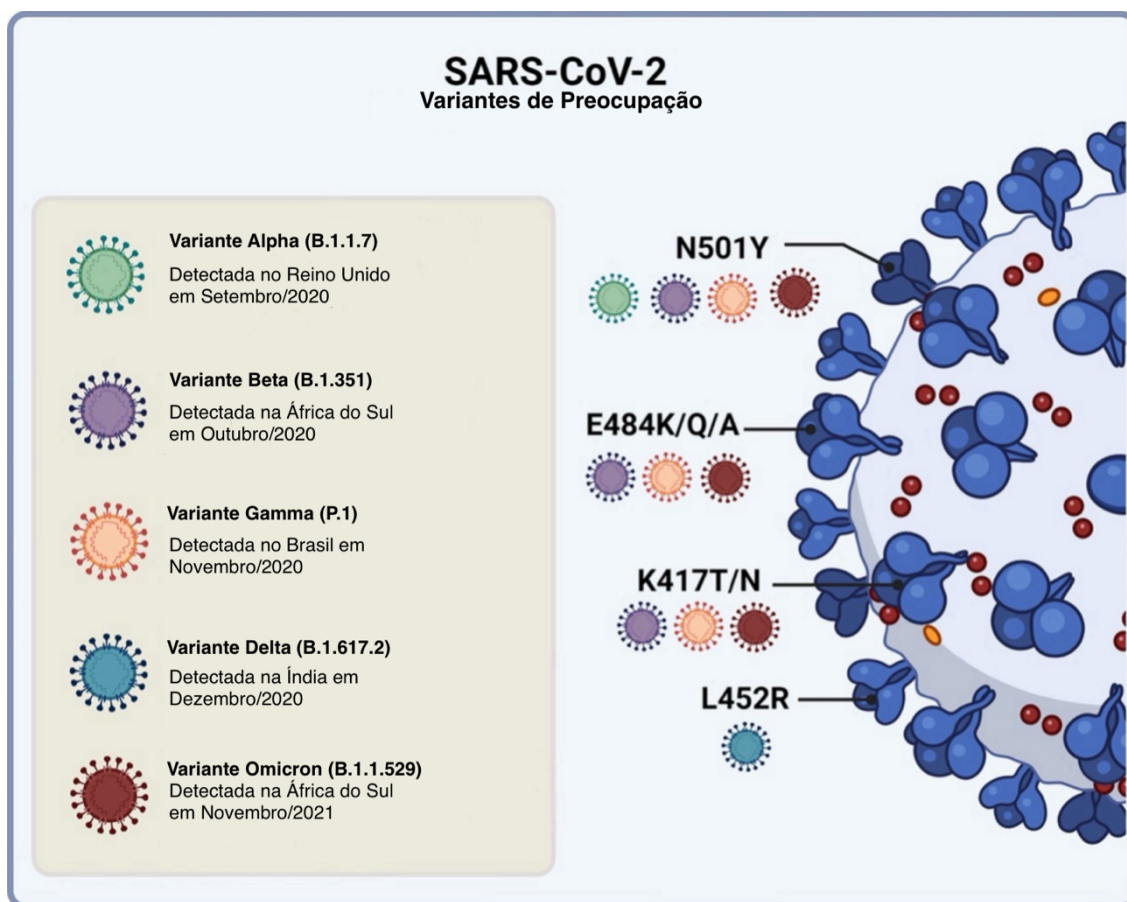
O período médio de incubação na infecção pelas cepas iniciais do SARS-CoV-2 era de aproximadamente 4-5 dias antes do início dos sintomas. Dentro de 5 a 6 dias após o início dos sintomas, a carga viral do SARS-CoV-2 atingia seu pico. Casos graves de COVID-19 progridem para síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), em média em torno de 8 a 9 dias após o início dos sintomas. Neste processo pode haver diferenças de acordo com a variante envolvida. (20)

Na medida em que o vírus evolui e novas variantes surgem, tem havido preocupações de que tais variantes poderiam aumentar a patogenicidade por escapar de imunidade gerada por infecção anterior ou pela vacinação. Algumas variantes preocupantes, como 1.351 (Beta), P.1 (Gamma) e o B.1.1.529 (Omicron), têm mutações que as tornam menos suscetíveis à imunidade mediada por vacina e adquirida por infecção. Algumas variantes podem induzir doença mais grave após infecção que outras, embora cepas como B.1.1.7 (Alpha) e B.1.617.2 (Delta) sejam conhecidos por se espalhar com mais eficiência, dificultando a distinção entre o aumento das taxas de infecção e o aumento da gravidade (14).

A identificação de todas as mutações do SARS-CoV-2 e suas conexões com alterações patológicas é bastante complexa porque existem muitos pacientes assintomáticos. Mas existem alguns dados bem definidos de algumas mutações. A Omicron é caracterizada por mais de 30 mutações descritas na proteína S, além disso é mais transmissível do que a variante Delta. A variante Omicron ainda é capaz de evasão imune significativa e se espalha mais rápido do que qualquer variante anterior do vírus. (21)

Como discutido anteriormente, a proteína S do SARS-CoV-2 se liga ao receptor ECA-2 para facilitar a sua entrada na célula hospedeira. As substituições de aminoácidos na proteína S que determinam as novas variantes do vírus estão relacionadas com o perfil de habilidade dos mesmos em invadir a célula hospedeira (**Figura 5**). (22)

Figura 5: Variantes e substituições de aminoácidos do SARS-CoV-2 relacionados à virulência.



Adaptado de Mistry et al, 2023 (22)

A substituição N501Y é comum às cepas variantes Alpha, Beta, Gamma e Omicron. As substituições E484K/Q/A e K417T/N estão presentes nas cepas Beta, Gamma e Omicron, enquanto a substituição L452R é exclusiva da variante Delta.

A variante Alpha (B.1.1.7) foi detectada pela primeira vez no final de setembro de 2020 e rapidamente se tornou a cepa predominante nos Reino Unido. A variante Beta (B.1.351), primeiramente detectada em outubro de 2020, tornou-se a cepa dominante resultando na segunda onda na África do Sul. De forma similar, a variante Gamma (P.1) foi detectada em quatro brasileiros que viajavam para Japão em janeiro de 2021 e foi responsável pelo ressurgimento de infecções em Manaus, apesar dos altos níveis de infecção anterior no país. A variante Delta (B.1.617.2), detectada pela primeira vez em dezembro de 2020, foi responsável pelo aumento maciço de casos que causou uma segunda onda na Índia e infecções emergentes em várias regiões dos Estados Unidos. A variante Omicron (B.1.1.529), foi detectado pela primeira vez em novembro de 2021 por laboratórios de vigilância genômica de classe mundial na África

do Sul e foi encontrado em muitos países ao redor o mundo. O surgimento dessas variantes é preocupante, uma vez que podem afetar a transmissibilidade viral, virulência e taxa de reinfeção ao escapar de imunidade induzida por vacina. (22,23)

A substituição da asparagina (N) pela tirosina (Y) na posição 501 (N501Y), como nas variantes Alpha e Beta tem mostrado um aumento de afinidade com as proteínas de ligação da célula hospedeira. Este fato tem contribuído para aumento de transmissibilidade e carga viral nas infecções por estas cepas. Análises clínicas posteriores mostraram que a variante Alpha está associada a casos de maior gravidade de mortalidade. (24)

As substituições de aminoácidos na variante Beta são mais extensas que na variante Alpha. Em outubro de 2020, a variante Beta foi responsável por 11% dos vírus SARS-CoV-2 sequenciados na África do Sul e em dezembro daquele ano 87% dos casos já eram devidos a essa variante. Na Cidade do Cabo, foi demonstrado que um número de 100.000 casos foi alcançado na metade do tempo quando comparado à segunda onda com a variante Beta, quando comparada à onda anterior do tipo selvagem. A análise preliminar também indicou que houve uma maior taxa de mortalidade na segunda onda, embora isso possa ser devido ao impacto esmagador no sistema de saúde durante aquele tempo.(25)

A variante Gamma foi responsável pelo aumento infecções no Brasil no final de 2020 que pressionaram a saúde sistema à beira do colapso. Isto ocorreu apesar de um nível anteriormente elevado de infecção durante a primeira onda, indicando que a variante não era suscetível à imunidade adquirida naturalmente. A variante Gama contém 17 substituições de aminoácidos, incluindo um trio semelhante na proteína S encontrada na variante Beta. Foi demonstrado que a variante foi em média duas vezes mais transmissível que a variante do tipo selvagem. Estudos clínicos indicaram que a variante Gama pode ser mais crítica entre indivíduos mais jovens. (22,26)

A variante Delta apresenta oito alterações na proteína S. Ela foi responsável pela grave segunda onda que afetou Índia em janeiro de 2021 e se espalhou amplamente para outros países. Esta variante resultou numa terceira onda devastadora em África do Sul e deslocou rapidamente a variante Beta. Esta variante também deslocou a variante Alpha no Reino Unido. Estes deslocamentos favoráveis à variante Delta se deve principalmente a sua alta de taxa de transmissibilidade, pelo menos 40% maior que a outras variantes. A gravidade e a mortalidade nos casos de infectados pela variante Delta também foram maiores. (22,27)

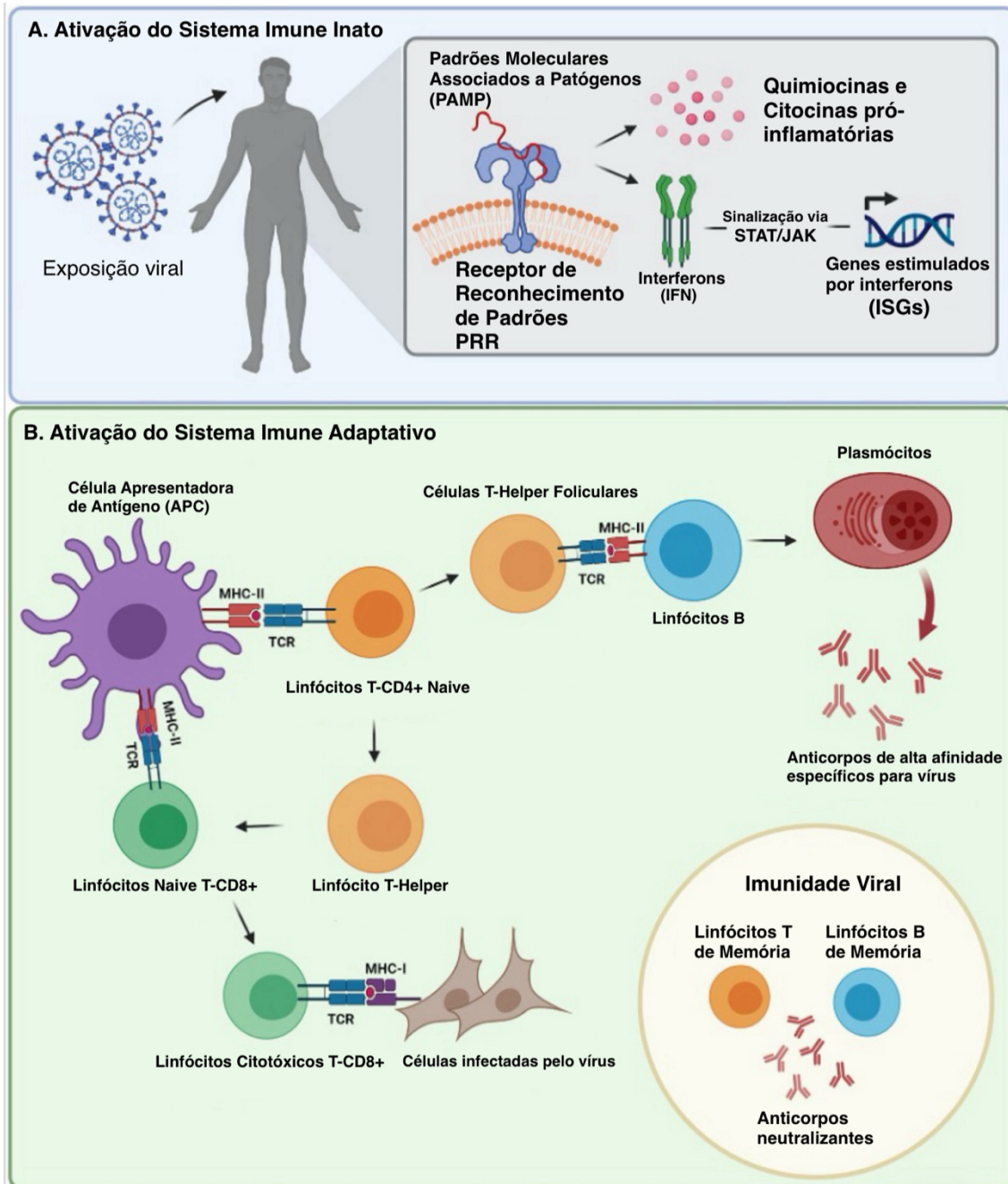
Em relação à variante Omicron, estudos preliminares sugeriram haver um aumento do risco de reinfeção. Apresenta transmissibilidade alta, mas uma forma mais branda da doença quando comparada às outras variantes. (22,28)

1.3. Mediadores inflamatórios solúveis e COVID-19

A regulação das respostas imunológicas são cruciais para a boa recuperação dos pacientes com COVID-19. Os mediadores imunológicos solúveis têm papel essencial neste processo de regulação do sistema imunológico no estado de saúde e doença. No entanto, seus mecanismos exatos de ação não são totalmente compreendidos.(29)

O sistema imunológico é dividido em dois braços, o sistema imunológico adaptativo com linfócitos T e B e o sistema imunológico inato com todos os outros tipos de células imunes, das quais granulócitos, monócitos, macrófagos e células NK (*natural killer*) são as células mais comuns. Também existem células imunológicas, incluindo diferentes células dendríticas, células linfoides inatas ou mastócitos. A maioria das respostas imunes envolve tanto o sistema imunológico inato quanto o sistema imunológico adaptativo, evocando imunidade inata e adaptativa. (30) A resposta imune inata é ativada horas após a exposição viral como a primeira linha de defesa do corpo que libera uma série de moléculas antivirais no local da infecção. Uma resposta imune adaptativa é iniciada após ser estimulada por componentes do sistema imunológico inato para iniciar respostas imunes celulares e humorais específicas dirigidas ao patógeno, dias após a infecção. As células de memória imunológica permanecem preparadas após a eliminação viral, constituindo a presença de imunidade.(22) (**Figura 6**).

Figura 6: Ativação dos dois braços do sistema imune durante uma infecção viral.



Adaptado de Mistry *et al.* (22) STAT, transdutor de sinal e ativador de transcrição (do inglês *signal transducer and activator of transcription*); JAK, Janus quinase (do inglês *Janus kinase*); CD, cluster de diferenciação (do inglês *cluster of differentiation*); MHC, complexo principal de histocompatibilidade (do inglês *major histocompatibility complex*); TCR, receptor de células T (do inglês *T-cell receptor*).

Durante a infecção por SARS-CoV-2, uma resposta imunitária eficaz proporciona a primeira linha de defesa. No entanto, uma resposta inflamatória excessiva e imunidade adaptativa desregulada podem trazer lesões aos diversos tecidos e órgãos.(29)

Vários estudos têm sido conduzidos sobre a correlação dos mediadores inflamatórios solúveis, receptores de membrana e outros mediadores durante a infecção pelo SARS-CoV-2. Tem-se observado que a desregulação na concentração de tais moléculas está associada à patologia da doença e desempenha um papel significativo na gravidade da COVID-19 e na taxa de mortalidade associada. A **Figura 7** resume os aspectos imunológicos e processos fisiológicos no indivíduo através de mediadores inflamatórios solúveis após a infecção por SARS-CoV-2.

A **Tabela 1** resume o papel de alguns mediadores inflamatórios solúveis na COVID-19. A modulação de seus níveis circulantes pode ser uma potencial opção terapêutica para pacientes com COVID-19. (29)

Figura 7: Efeitos da infecção pelo SARS-CoV-2 nos processos imunológicos e fisiológicos através dos mediadores inflamatórios solúveis.



Adaptado de Soltani-Zangbar et al (29) COVID-19: doença por coronavírus 2019; SARS-CoV-2: síndrome respiratória aguda grave coronavírus tipo 2; SDRA: Síndrome do desconforto respiratório agudo; IIs: Interleucinas; PD-1: Morte programada 1; IL-6: Interleucina 6; IFNs: Interferons; PD-1: Proteína 1 de morte celular programada; PD-L1: Ligante de morte programada 1; Foxp3: Caixa de forquilha P3; PaO₂: Pressão parcial de oxigênio; FIO₂: Fração inspirada de oxigênio; PCR: proteína C reativa; sTim-3: domínio de imunoglobulina de células T solúveis e domínio de mucina 3; NT-proBNP: peptídeo natriurético pró-B tipo N-terminal; sCTLA-4: Antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos solúveis; sLAG-3: gene 3 de ativação de linfócitos solúveis; sGITR: Proteína solúvel relacionada ao TNFR induzida por glicocorticoide; sBTLA: Atenuador solúvel de linfócitos B e T; sHVEM: Mediador solúvel de entrada do herpesvírus; TNFRSF14; sIDO: Indolamina 2,3-dioxigenase solúvel; s4-1BB: membro 9 solúvel da superfamília do ligante do fator de necrose tumoral (sTNFSF9); CDs: Cluster de diferenciação; TNF-Rs: Receptores do fator de necrose tumoral; ADAM17: Desintegrina e metaloprotease 17; NETs: Armadilhas extracelulares de neutrófilos; PMNs: Polimorfonucleares; MPO: Mieloperoxidase; sP-selectina: Marcadores solúveis de ativação plaquetária; sFLT-1: Tirosina quinase-1 tipo fms solúvel; VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular; Flt1: tirosina quinase 1 semelhante a Fms; PIGF: Fator de crescimento placentário; sACE2: Enzima conversora de angiotensina solúvel 2; SRA: Sistema Renina-Angiotensina; sRAGE: Receptor solúvel para produtos finais de glicação avançada; suPAR: Receptor solúvel do plasminogênio da uroquinase; Células NK: células assassinas naturais.

Tabela 1 – Papel de alguns mediadores solúveis na COVID-19.

SPDL-1 (protetor)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Diminuição da ação dos linfócitos T ○ Correlação negativa e positiva com relação PaO₂/FIO₂ e PCR, respectivamente
SPD-1 (adverso)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Aumenta a ação dos linfócitos T
sTim-3 (adverso)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Marcador de ativação e exaustão de linfócitos T em inflamação crônica e infecção viral como SARS-CoV-2 ○ Correlação negativa e positiva com relação PaO₂/FIO₂ e NT- ProNBT, respectivamente
sTNFRI e sTNFRII (adverso)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Aumentam nos casos de COVID-19 ○ Clivado por ADAM17 na inflamação crônica ○ Aumento do risco de mortalidade em doenças cardiovasculares ○ Correlacionado com a gravidade da doença em casos de COVID-19
sIL-2R (adverso)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Aumentam nos casos de COVID-19 ○ Causa de linfopenia e redução da resposta celular à IL-2 ○ Regulador negativo de linfócitos T reguladores, células NK e linfócitos B ○ Associação negativa com relação PaO₂/FiO₂ e correlação positiva com morbidade em casos de COVID-19
sIL-6R (adverso)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Papel na resposta epitelial do estroma à IL-6 ○ Agonista de IL-6 que é clivado por ADAM17 ○ Aumento de casos de HIV, influenza A e casos graves de COVID-19 ○ Causa aumento da liberação de MCP-1 das células endoteliais em casos de COVID-19 (causa de hiperinflamação)
sFlt-1 (adverso)	<p>Nível excessivo de sFlt-1 induz disfunção endotelial e está associado à sepse bacteriana</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Aumento na infecção por SARS-CoV-2, está correlacionado com a gravidade da doença, disfunção endotelial falha respiratória.
sACE2 (controverso)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Aumento de infecções virais como SARS-CoV-2 ○ Interage com o pico do SARS-CoV-2 e facilita a interação viral com o hospedeiro ○ Aumento de sACE2 tem correlação com resposta inflamatória e disfunção endotelial
sRAGE (adverso)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Associado a doenças inflamatórias, infecção bacteriana e danos pulmonares ○ Fator de diagnóstico para SDRA
suPAR (adverso)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Envolvido na via de ativação do plasminogênio, ○ Nível de suPAR tem correlação positiva com gravidade e mortalidade de HIV e SARS-CoV-2

Adaptado de Soltani-Zangbar et al. (29) sPDL-1, ligante 1 de morte celular programada solúvel; SPD-1, morte celular programada solúvel 1; sTim3, imunoglobulina solúvel de células T e domínio 3 de mucina; sTNFRI&II, receptor solúvel do fator de necrose tumoral 1&2; sIL6R, receptor solúvel de interleucina 6; sFlt-1, tirosina quinase-1 solúvel semelhante a fms; sACE2, enzima conversora de angiotensina solúvel 2; sRAGE, receptor solúvel para produtos finais de glicação avançada; suPAR, receptor ativador de plasminogênio tipo uroquinase solúvel; HIV, vírus da imunodeficiência humana; SDRA, síndrome do desconforto respiratório agudo.

A resposta do IFN durante a COVID-19 varia de acordo com o paciente e a gravidade da doença, mas tem sido demonstrado que uma resposta precoce do IFN pode ser protetora durante a infecção aguda. Em um estudo longitudinal da Universidade de Yale (Estados Unidos) sobre a resposta imune inata de 113 pacientes com COVID-19 foi observado que todos os pacientes com COVID-19 expressavam níveis elevados de IFN- α , interleucina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-17 e IL-12 p70 no plasma sanguíneo em relação a controles saudáveis, enquanto o IFN-III foi elevado apenas em pacientes graves. A elevação de IFN- α e/ou IFN-III correlacionou-se com maior duração da hospitalização e mortalidade. Vários outros estudos também relataram uma regulação positiva semelhante de IFN-II em pacientes gravemente enfermos, com elevação concomitante de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α .(31,32)

Além dos IFNs, muitas outras citocinas e quimiocinas são produzidas quando o RNA viral é detectado, levando à ativação de cascatas de sinalização, como a via fator nuclear kappa beta (NFkB), que em última análise resulta na expressão de uma ampla variedade de citocinas e quimiocinas. Ativação do domínio pirina do receptor NOD-like contendo inflamassoma 3 (NLRP3), que permite a clivagem e ativação de citocinas como IL-1 β e IL-18. Tal como acontece com a resposta do IFN, muitas destas respostas são desreguladas em pacientes com COVID-19 grave, com pacientes gravemente enfermos exibindo uma resposta mais substancialmente desregulada do que pacientes com doença leve ou moderada. Muitos estudos procuraram identificar os mediadores inflamatórios mais ligados a resultados graves e, embora um conjunto exato de marcadores inflamatórios não possa ser estabelecido devido à variabilidade de paciente para paciente, um fenótipo geral de níveis elevados de IL-6, IL-8, IL-10 e TNF, juntamente com uma mistura de quimiocinas elevadas, incluindo CCL2, CCL3 e CXCL8, foram observadas. (31,33,34)

Além da resposta inata de citocinas, a infecção por SARS-CoV-2 resulta no extenso recrutamento de macrófagos, monócitos, células dendríticas e neutrófilos para os pulmões; achados patológicos indicam que quimioatraentes de neutrófilos, como CXCL8, CXCL1 e CXCL2, e os quimioatraentes de monócitos CCL2 e CCL7, também são induzidos e regulados positivamente (31,35)

Acredita-se que grande parte da doença crítica associada à infecção por SARS-CoV-2 seja o resultado de um processo hiper inflamatório conhecido como hipercitocinemia.(36) A hipercitocinemia é uma resposta hiper inflamatória desregulada que resulta da disseminação sistêmica de uma resposta inflamatória localizada a uma infecção viral ou bacteriana.(37)

O perfil de citocinas observados na primeira coorte com 41 pacientes com COVID-19 em Wuhan na China mostrou que os pacientes graves e críticos

apresentaram níveis mais elevados de fatores estimulantes de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), de proteína 10 induzida por interferon gama (IP10), proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), macrófago proteína inflamatória 1 alfa (MIP1A) e fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) em comparação àqueles considerados não graves. Observações de outros 150 pacientes em Wuhan revelaram que aqueles que morreram de complicações da COVID-19 tinham níveis séricos mais elevados de proteína C reativa (PCR), IL-6 e ferritina, sugerindo um quadro hiper inflamatório subjacente ao processo.(38)

Em casos graves de COVID-19, é bem descrito que a hipercitocinemia nos pulmões leva a danos alveolares difusos, formação de membrana hialina e formação de trombos confirmada em pequenos vasos na autópsia.(39)

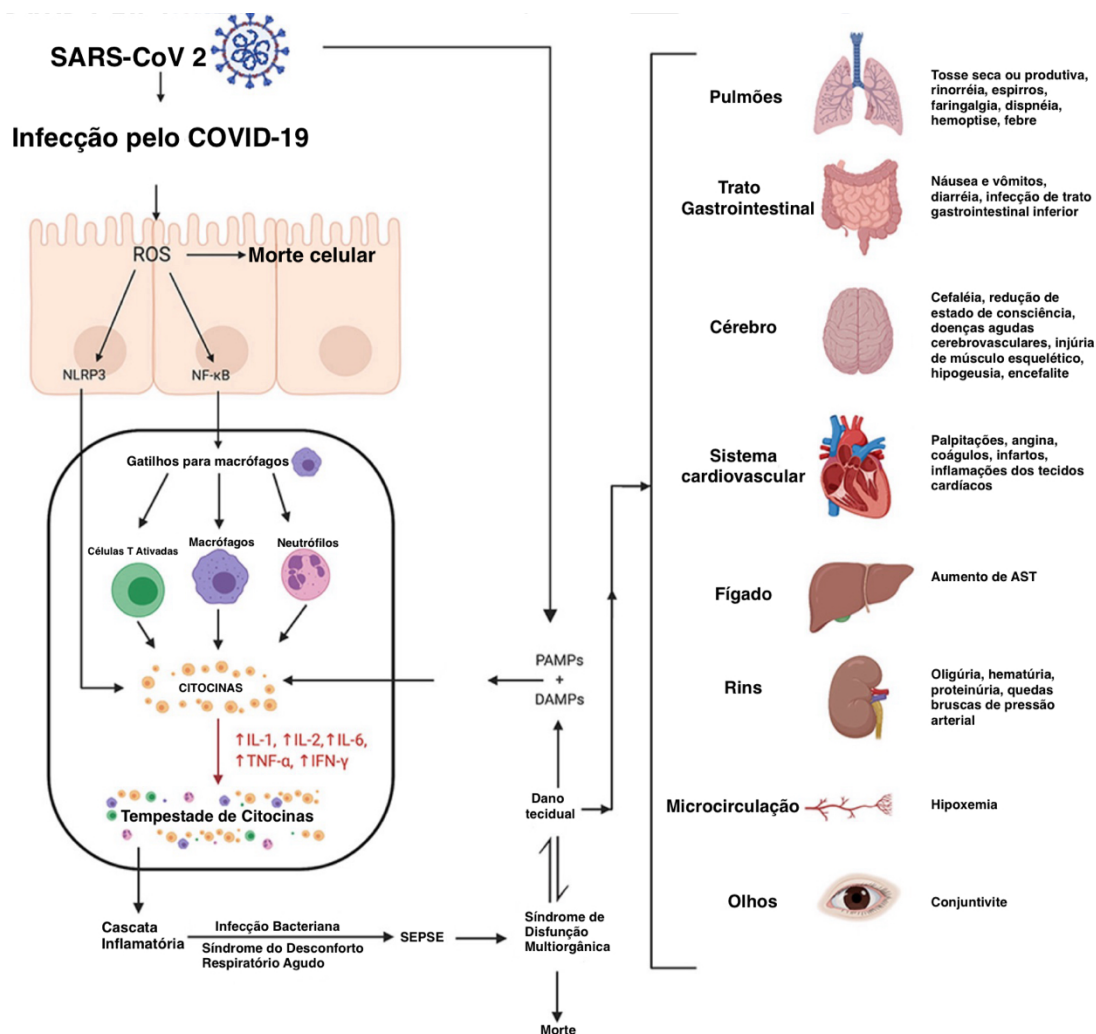
Níveis elevados de citocinas também resultam em disfunção endotelial, dano vascular e desregulação metabólica, danificando assim vários sistemas orgânicos. Os níveis de citocinas de resposta aguda (TNF- α e IL-1 β) e citocinas quimiotáticas (IL-8 e MCP-1) aumentam precocemente na hipercitocinemia, facilitando um aumento sustentado de IL-6. A IL-6 se liga ao receptor de IL-6 ligado à membrana (mIL-6R) ou ao receptor de IL-6 solúvel (sIL-6R), formando um complexo que atua na gp130, regula os níveis de IL-6, MCP-1 e GM- LCR através da via do transdutor de sinal Janus quinase e ativador da transcrição (JAK-STAT) e, assim, perpetua os processos inflamatórios. (37)

A IL-6, juntamente com outras citocinas pró-inflamatórias, conduz uma resposta de fase aguda que eleva a ferritina sérica, o complemento, a PCR e os fatores pró-coagulantes, muitos deles mensuráveis através de exames de sangue utilizados na prática clínica ao contrário da maioria dos mediadores solúveis que são mais utilizados em ambientes de pesquisas. A resposta de fase aguda da tempestade de citocinas é relativamente exagerada. Como os níveis séricos elevados de citocinas estão inversamente relacionados à contagem total de linfócitos, os níveis baixos de células T citotóxicas podem contribuir para a redução da depuração viral.(40)

Em reação à infecção por SARS-CoV-2, macrófagos e células dendríticas desencadeiam uma resposta imune inicial, incluindo linfocitose e liberação de citocinas. No entanto, a resposta inflamatória resulta na destruição de linfócitos na tentativa de impedir a infecção por SARS-CoV-2. A linfopenia é especialmente observada em pacientes graves ou críticos. A produção de citocinas torna-se rapidamente desregulada, danificando células saudáveis, normalmente primeiro nos pulmões, mas potencialmente espalhando-se para outros órgãos, incluindo rins, coração, vasos sanguíneos e cérebro. A cascata de danos associados à tempestade de citocinas começa com a ruptura da barreira epitelial nos pulmões. Foi sugerido que a ativação do

inflamassoma da proteína 3 contendo o domínio NOD, LRR e pirina (NLRP-3) e a resposta relativa embotada da histona desacetilase 2 no complexo do fator nuclear kappa beta (NFkB) estão associadas a tempestades de citocinas.(41) A ruptura da barreira epitelial expõe os pulmões ou outros tecidos à infecção bacteriana. A fisiopatologia dos mecanismos de ação dos mediadores solúveis na COVID-19 está ilustrada na **Figura 8**.(38)

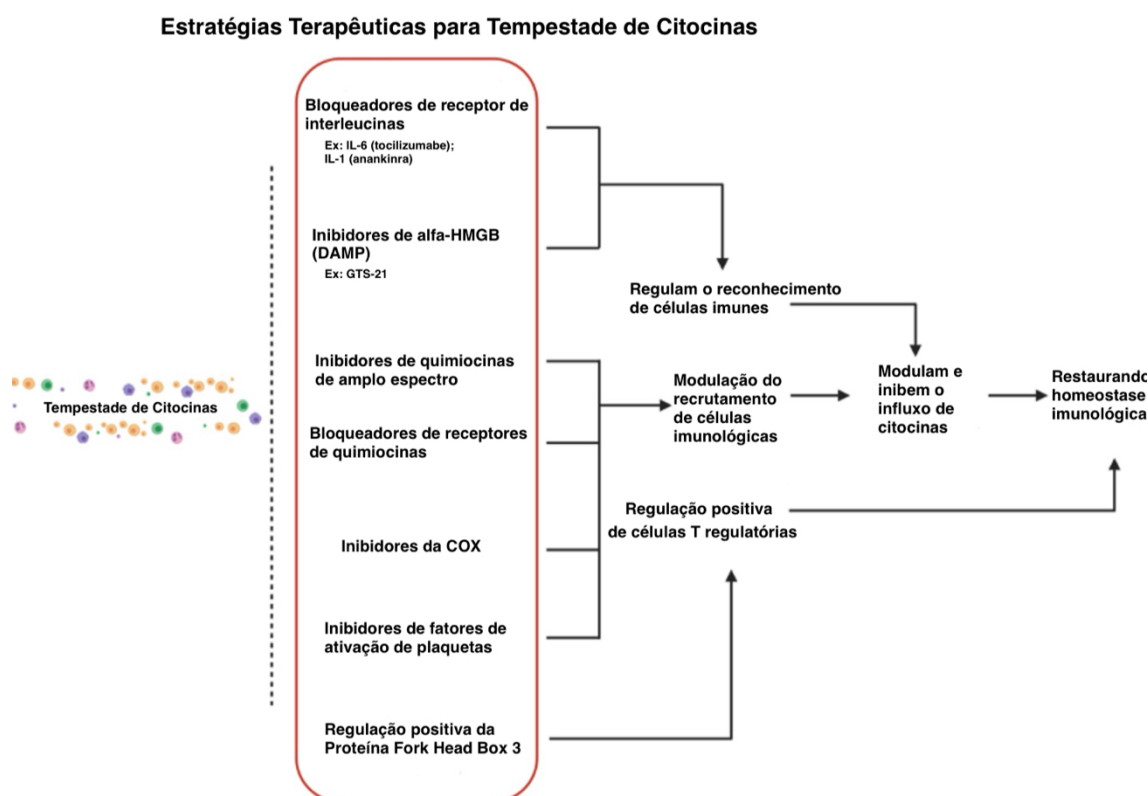
Figura 8: Mecanismos de ação de mediadores inflamatórios solúveis na infecção pelo SARS-CoV-2 e danos associados.



Adaptado de Bhaskar et al. SARS-CoV-2, síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2; COVID-19, doença por coronavírus 2019; ROS, espécies reativas de oxigênio; NLRP3, inflamassoma da proteína 3 do receptor semelhante a (NOD); NF-κB, fator nuclear potenciador da cadeia leve kappa de células B ativadas; IL, interleucina; TNF, fator de necrose tumoral; IFN, interferon; PAMPs, padrões moleculares associados a patógenos; DAMPs, padrões moleculares associados a danos; PRR, receptores de reconhecimento de padrões; AST, aspartato aminotransferase.

A infecção por SARS-CoV-2 pode estimular uma resposta imune hiperinflamatória, na qual a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) mediada por células epiteliais pode causar a morte celular e estimular a síntese de NLRP3 e NF-κB. Estas contribuem para o aumento dos níveis de citocinas e, portanto, para a tempestade de citocinas. Isto causa essencialmente invasão imunológica que pode levar a condições clinicamente relevantes, como SDR, sepse, disfunção de múltiplos órgãos e sistemas e potencialmente até morte. Os órgãos afetados como resultado da MODS e seus sintomas associados foram demonstrados. O trato gastrointestinal inferior (GI) é rico em receptores ACE2 e, portanto, apresenta maior risco de infecção pelo COVID-19. Vinte por cento dos pacientes com COVID-19 apresentam diarreia como sintoma. Vários estágios no mecanismo fisiopatológico de ação dos mediadores inflamatórios solúveis podem ser alvos de ferramentas terapêuticas (**Figura 9**). Nos primeiros meses da pandemia de COVID-19 foram iniciados vários ensaios clínicos direcionados à tempestade de citocinas e à hiper inflamação. O perfil imunológico e de comorbidades do paciente podem modular a resposta à terapia de modo individualizado. (38)

Figura 9: Estratégias terapêuticas para combater a tempestade de citocinas na COVID-19.



Adaptado de Bhaskar et al: HMGB, proteína 1 do grupo de alta mobilidade; DAMP, padrão molecular associado a dano; COX, ciclooxigenase.

1.4. COVID-19 na gestação

O sucesso da gravidez depende de uma comunicação imunológica coordenada entre a mãe e o feto. Todas as fases da gestação, desde a nidação até o parto, são suscetíveis a complicações decorrentes de fatores intrínsecos ou extrínsecos ao feto. As células imunes e as citocinas participam como mediadores desse processo para promover uma gravidez saudável. A implantação e o desenvolvimento da placenta são os principais pontos de vulnerabilidade durante os quais surgem a perda da gravidez. Ao mesmo tempo, certas infecções ou condições inflamatórias em mulheres grávidas causam doenças graves e têm impactos prejudiciais no feto em desenvolvimento (42).

As doenças infecciosas na gravidez são regularmente consideradas uma condição crítica. Algumas infecções contraídas durante a gravidez (infecção congênita), durante parto e nascimento (infecção perinatal) e durante o aleitamento materno (infecção pós-natal) podem ser transmitidas ao feto ou ao recém-nascido. Vírus, bactérias, protozoários e fungos podem ser agentes destas infecções. Entre os vírus alguns podem ser responsáveis por infecções congênitas como o citomegalovírus (CMV), herpes simples 1-2 (HSV 1-2), varicela zóster (ZV), rubéola (RuV), vírus da imunodeficiência (HIV), Parvovírus B19 e Zika vírus (ZIKV) (43).

Em relação ao SARS-CoV-2, vários estudos concluíram que as mulheres grávidas são uma população de alto risco para a COVID-19. As alterações fisiológicas durante a gravidez têm efeitos significativos na diminuição do volume pulmonar à medida que o feto cresce, no sistema imunológico, no sistema cardiopulmonar e na coagulação. Essas alterações podem resultar em uma resposta alterada à infecção por SARS-CoV-2 (44–48).

Além disso, vários efeitos adversos maternos têm sido significativamente maiores em mulheres grávidas com COVID-19 do que as não infectadas. Esses incluíram a morte materna, pré-eclâmpsia, cesárea e sofrimento fetal.(49)

O estudo INTERCOVID foi iniciado em março de 2020 em conjunto com o Consórcio Internacional de Crescimento Fetal e Neonatal para o Século 21 (INTERGROWTH-21st). Neste estudo foi proposta uma análise prospectiva, multinacional, multicêntrica e observacional com o propósito de avaliar os resultados maternos e neonatais em gestantes com COVID-19. Para cada gestante incluída no estudo com diagnóstico de COVID-19 eram inscritas duas gestantes sem o diagnóstico. Os resultados deste estudo revelaram que mulheres com diagnóstico de COVID-19 tiveram, com significância estatística, uma taxa mais alta de cesárea (52,8% vs 38,5%) e complicações relacionadas à gravidez, como distúrbios hipertensivos da gravidez e sofrimento fetal, quando comparadas às gestantes sem diagnóstico de COVID-19. O

diagnóstico materno de COVID-19 também mostrou significância estatística para desfechos neonatais desfavoráveis, como aumento da taxa de nascimentos prematuros, menores peso, comprimento e perímetro cefálico ao nascimento. (50)

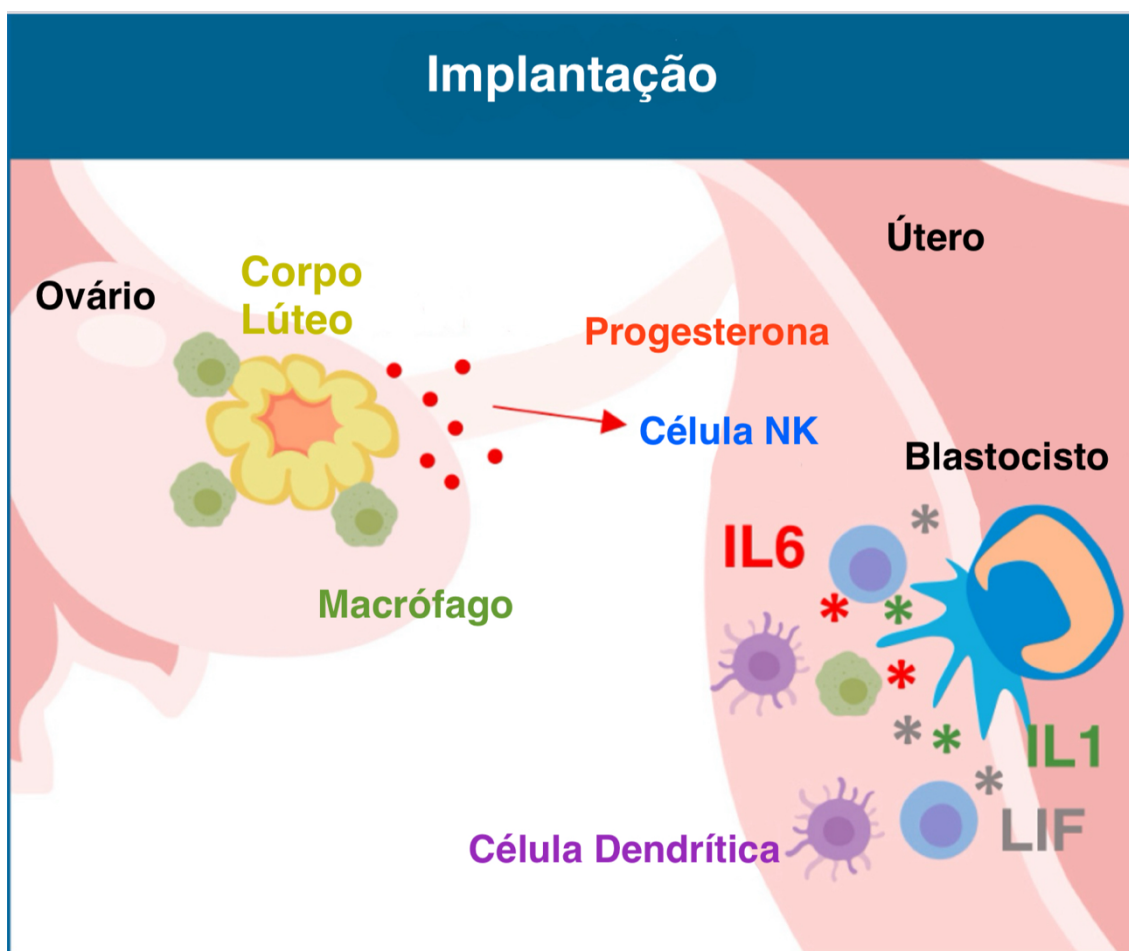
Os desfechos clínicos das gestantes infectadas por SARS-CoV-2 apresentaram algumas diferenças relacionadas às variantes dos vírus. Um estudo de coorte retrospectiva com gestantes de Istambul (Turquia) e Londres (Inglaterra) não vacinadas revelou que durante a onda Delta, em comparação com o período pré-Delta (cepa do tipo selvagem e variante Alpha de SARS-CoV-2), foi observada uma maior taxa de morte materna e maior necessidade de suplementação de oxigênio, ventilação mecânica e circulação extracorpórea de membrana. No entanto, a gravidade da doença e complicações na gravidez durante a onda Omicron foram semelhantes aos observados durante o período pré-Delta.(51) Em outro estudo, mulheres grávidas internadas em hospitais do Reino Unido durante o período de dominância das variantes Alpha e Delta do SARS-CoV-2 apresentavam risco aumentado de infecção moderada a grave em comparação com quando o tipo selvagem original era dominante.(52) A variante Delta também esteve associada a um incidência maior de partos prematuros. (53)

Os estudos que analisaram os desfechos relacionados à vacinação em gestantes mostraram a segurança e a eficácia das mesmas na gravidez.(54) As vacinas geraram imunidade humoral robusta em mulheres grávidas e lactantes, com imunogenicidade semelhante às observadas em mulheres não grávidas. As respostas imunes induzidas pela vacina foram significativamente maiores do que a resposta à infecção natural. Uma metanálise e revisão sistemática com mais 800.000 mulheres grávidas mostraram riscos reduzidos de infecção por SARS-CoV-2 em 60% (41%-73%), hospitalização por COVID-19 durante a gravidez em 53% (31%-69%) e internação em unidade de terapia intensiva (UTI) em 82% (12%–99%) entre as mulheres vacinadas. Não houve evidência de maior risco de resultados adversos em gestantes vacinadas, incluindo aborto espontâneo, diabetes gestacional, hipertensão gestacional, problemas cardíacos, oligodrâmnio, polidrâmnio, cesárea, hemorragia pós-parto, descolamento prematuro da placenta, índice de Apgar aos 5 minutos abaixo de 7, baixo peso ao nascer (menor que 2.500 g), muito baixo peso ao nascer (menor que 1.500 g), pequeno para a idade gestacional e anomalias fetais. (54) A transferência imunológica para neonatos ocorreu através da placenta e do leite materno. (55) Apesar dessas evidências, alguns estudos populacionais em diferentes regiões mostraram baixa adesão à vacinação na gestação.(56,57).

1.5. Mediadores inflamatórios solúveis e gestação

O sistema imunitário desempenha importante papel para o sucesso da gravidez, desde a implantação até o parto. A implantação provoca uma reação inflamatória, onde é observada a regulação positiva de citocinas inflamatórias, incluindo interleucina-6 (IL-6), IL-1 e fator inibidor de leucemia (LIF). Vários leucócitos são encontrados na decídua, incluindo células *natural killer* (NK) maternas, células dendríticas, macrófagos e linfócitos. Essas células interagem diretamente com os trofoblastos da placenta em desenvolvimento, e desvios no número e nas funções das células estão associados à aborto, pré-eclâmpsia e nascimento prematuro. (Figura 10). (42)

Figura 10: Implantação do blastocisto e resposta inflamatória.



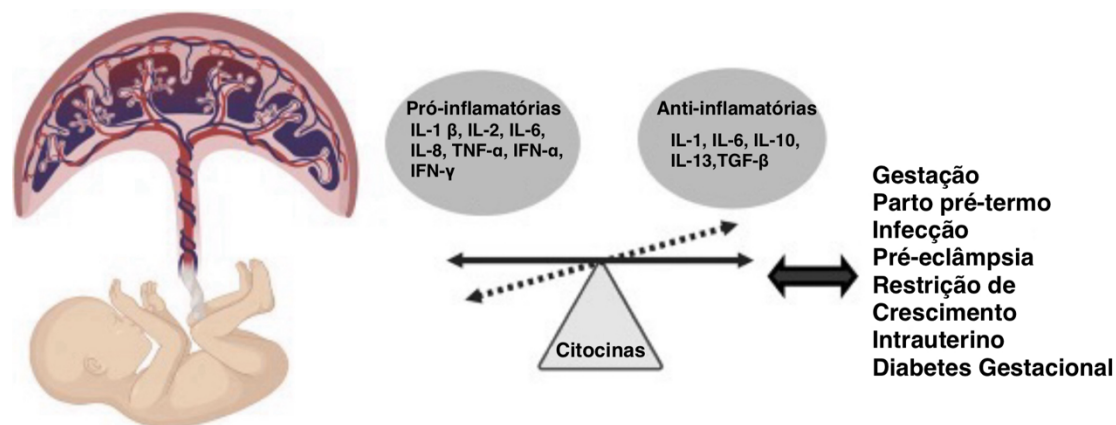
Adaptado de Laura J. Yockey and Akiko Iwasaki (42)

A expressão de citocinas é dinamicamente modificada durante a gestação, assim como no trabalho de parto prematuro, infecções, pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intrauterino (RCIU) e em situação de diabetes mellitus gestacional. (58,59)

Em uma gravidez saudável, observa-se uma inflamação sistêmica controlada em comparação a mulheres saudáveis não grávidas. Durante esse período, as células do sistema imunológico inato apresentam fenótipos ativados com níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β . (59,60) O impacto da infecção pelo SARS-CoV-2 neste processo ainda não está elucidado.(61)

A manutenção de um equilíbrio adequado de citocinas pró e anti-inflamatórias é necessária durante toda a gravidez. Algumas doenças, principalmente infecciosas, têm sido associadas a variações na expressão de citocinas. Ressalta-se que a infecção do compartimento uterino pode desregular o equilíbrio das citocinas, resultando em distúrbios maternos e fetais, como apresentados na **Figura 11**. (59,62)

Figura 11: Desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias.



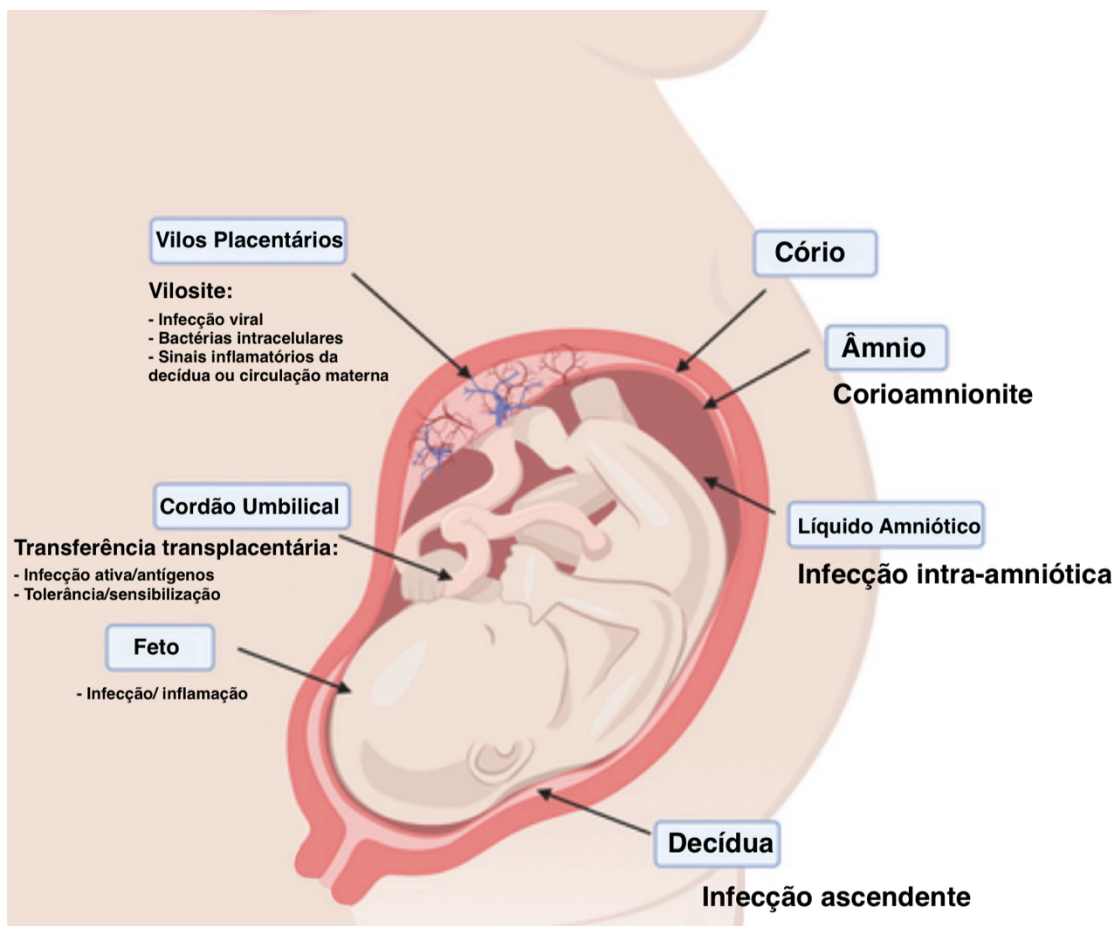
Adaptado de Munro et al (59). *IFN- γ* , interferon- γ ; *IL-6*, interleucina-6; *TGF- β* , fator transformador de crescimento- β ; *TNF- α* , fator de necrose tumoral- α

O trabalho de parto em todas as idades gestacionais é um evento caracterizado pela ativação da cascata inflamatória com evidência de células inflamatórias e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias no colo do útero, miométrio, membranas corioamnióticas e cavidade amniótica. As citocinas desempenham papéis críticos no parto, dilatação cervical, ruptura das membranas extra placentárias e contratilidade uterina. (59)

As citocinas regulam a disponibilidade de prostaglandinas nas membranas e as citocinas pró-inflamatórias também atuam promovendo o aumento da expressão de MMPs (metaloproteinases de matriz), que degradam a matriz extracelular do colo do útero e das membranas gestacionais. É aventado que uma correlação positiva entre TNF- α e MMP-9 está associada ao sucesso da gestação. Por outro lado, essas citocinas também são produzidas pelos tecidos gestacionais em resposta a agentes infecciosos. Geralmente, a infecção é ascendente, na qual microrganismos presentes na vagina atravessam o colo do útero e colonizam a decídua. Os microrganismos também podem

atravessar as membranas gestacionais, resultando em infecção intra-amniótica e/ou fetal (Figura 12) (59,63).

Figura 12: Sinalização inflamatória mediada por infecção na gravidez.



Adaptado de Munro et al (59).

O estudo anátomo-histológico dos tecidos gestacionais coletados de nascimentos prematuros mostra sinais evidentes de infecção microbiana em 25% a 40% dos casos e concentrações elevadas de citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α em amostras amnióticas e cérvico-vaginais. As questões em torno do papel da indução do parto por citocinas levaram a extensas investigações sobre alterações na expressão de citocinas que ocorrem durante a gestação, trabalho de parto (pré-termo), infecção e em diferentes patologias. Até o momento, há uma falta de consenso entre os estudos, o que é agravado pelas diferenças no tamanho das amostras, na fonte e nos fatores de confusão. As variáveis que podem influenciar os níveis de citocinas durante a gravidez incluem o índice de massa corporal materna, a idade e o estado anterior de parto prematuro. Como esses fatores têm maior influência do que o estágio da gestação, existe um grande grau de variação entre a população controle. Alterações nos níveis

específicos de proteínas de citocinas têm sido associadas a uma variedade de complicações na gravidez. Os níveis circulantes de TNF- α e IL-6, que já estão elevados em gestações saudáveis em comparação com controles não grávidas, são ainda mais elevados em pacientes com pré-eclâmpsia e hipertensão arterial gestacional. (64) Na COVID-19 tem sido observado padrão semelhante com uma exacerbação nos níveis circulantes de IL-6.(61)

O aumento nas citocinas pró-inflamatórias é ainda exacerbado pela diminuição da produção de IL-10 que está associada à pré-eclâmpsia. Alguns estudos, no entanto, não conseguiram detectar uma correlação entre níveis circulantes mais precoces de TNF- α e início mais tardio de pré-eclâmpsia. Isso sugere que a produção elevada de TNF- α pode ser uma consequência e não a causa da doença, embora os níveis de TNF- α se correlacionem com a progressão da doença. (59)

Alterações na expressão do TNF- α também foram associadas a um subconjunto de casos de RCIU. Na RCIU, níveis elevados de TNF- α foram observados em mulheres com disfunção placentária, mas não naquelas com perfusão placentária normal. É relatado que os níveis plasmáticos de IL-8 em mulheres com pré-eclâmpsia são mais elevados do que em gestantes normotensas. A IL-8 é uma quimiocina que pode atrair neutrófilos e outros mediadores de inflamação no endotélio, contribuindo para a patogênese e gravidade da pré-eclâmpsia. Outras citocinas pró-inflamatórias que são mais altas em mulheres com pré-eclâmpsia incluem IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-12 e IFN- γ . Correlações positivas entre IL-6 e IL-8 em todos os grupos sugerem a importância destas citocinas na regulação fisiológica. Uma correlação positiva entre IL-6 e IL-1 β foi observada em mulheres normotensas, mas não em mulheres com pré-eclâmpsia. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória potente e demonstrou, em modelos animais, ser um inibidor do trabalho de parto prematuro induzido por citocinas.(65)

1.6. Formas gráficas de análise e interpretação de mediadores inflamatórios solúveis

a) Mapas de Calor

Os mapas de calor representam tabelas bidimensionais de números codificados em tons de cores. Essa é uma técnica de plotagem popular em biologia usada para representar dados multivariados, bastante comum na análise de mediadores inflamatórios solúveis. A exibição densa e intuitiva torna os mapas de calor adequados para apresentação de dados de alto rendimento. Centenas de linhas e colunas podem

ser exibidas em uma tela. Os mapas de calor dependem fundamentalmente da codificação de cores e da reordenação significativa das linhas e colunas.

Os mapas de calor são normalmente usados para mostrar uma faixa de valores e projetar um mapa de cores apropriado é essencial para destacar uma ou ambas as extremidades desse espectro. Um gradiente de cores divergente definido por três matizes (por exemplo, do azul ao branco e ao vermelho) tornará os limites inferior e superior da faixa visualmente distintos. Em contraste, um gradiente criado pela variação da luminosidade de um único matiz é eficaz para destacar um extremo. Uma escala de cinza com faixa de 10 a 90% de preto funciona bem como um mapa de cores linear. Quando usado com escalas de cores adequadas, o agrupamento facilita a nossa capacidade de ver estruturas nos mapas. Depois que as linhas e colunas são organizadas de acordo com a similaridade, padrões anteriormente indetectáveis podem se tornar óbvios.(66)

b) Redes de Mediadores Inflamatórios

Modelos de redes biológicas auxiliados por computador são a base da biologia de sistemas. Vários modelos já foram desenvolvidos para simular reações bioquímicas, cinética de transcrição gênica, fisiologia celular e controle metabólico. Com estes modelos a investigação biológica é possível interrogar sistematicamente e verificar experimentalmente o conhecimento de um caminho; gerenciar a complexidade de centenas ou potencialmente milhares de componentes e interações celulares e revelar propriedades emergentes e consequências imprevistas de diferentes configurações de vias. (67)

A evolução na demanda de análises dos sistemas biológicos revelou a necessidade do desenvolvimento de um software capaz de integrar tanto as interações moleculares quanto as medições de estado em uma estrutura comum e, em seguida, unir esses dados a uma ampla variedade de parâmetros de modelo e outros atributos biológicos. (68)

O *Cytoscape* é um projeto de software de código aberto para integração de redes de interação biomolecular com dados de expressão de alto rendimento e outros estados moleculares em uma estrutura conceitual unificada. A ideia central do *Cytoscape* é um gráfico de rede, com espécies moleculares representadas como nós e interações intermoleculares representadas como ligações, ou seja, arestas, entre nós. Uma das ferramentas mais fundamentais para interpretar dados de interação molecular é a visualização de nós e arestas como uma rede bidimensional.(67)

1.7. COVID-19: Desfechos neonatais e pediátricos

Quando um novo vírus surge, a infecção pelo mesmo durante a gravidez levanta preocupações sobre as repercussões para a gestante e o feto. Considerando que a maioria das descrições se refere a gestantes cuja infecção por SARS-CoV-2 ocorreu pouco antes da resolução do parto, o tempo é restrito para que os mecanismos de transmissão ao concepto ocorram plenamente (69).

Os níveis de citocinas durante a gravidez podem ser responsáveis pelo *imprinting* metabólico, pois as citocinas são transferíveis da circulação materna para a fetal e são capazes de modular a transferência de nutrientes pela placenta. A inflamação materna pode induzir reprogramação metabólica em vários níveis, desde o período periconcepcional em diante. Tais processos e suas consequências nos períodos materno e perinatal ainda não foram amplamente estudados. Compreender tais fenômenos deve contribuir para o manejo adequado de crianças nascidas de mães infectadas com SARS-CoV-2 (70,71).

O efeito da tempestade de citocinas na paciente gestante exposta ao SARS-CoV-2 sobre o feto e ao recém-nascido ainda é uma história que está sendo descrita (72). Em muitos recém-nascidos, tanto a termo quanto pré-termo, o processo inflamatório pode estar relacionado com morte e diferenciação celular, causando lesões de células neuronais permanentes que podem levar à paralisia cerebral, epilepsia e limitações cognitivas e sensoriais (73–75).

Alguns efeitos de outras infecções virais adquiridas na gestação já estão bem descritas na literatura. Sabe-se que infecções congênitas podem levar a distúrbios de crescimento e neurodesenvolvimento da criança. Algumas infecções virais, como as causadas pelo ZYKV e CMV, podem prejudicar diretamente o crescimento infantil e o desenvolvimento do cérebro por meio da transmissão placentária. As infecções causadas pelo vírus Influenza, apesar de não terem transmissão transplacentária, podem levar a efeitos adversos no crescimento e neurodesenvolvimento infantil a partir de uma resposta imune materna (76)

O risco de transmissão vertical do SARS-CoV-2 tem uma plausibilidade biológica, mas é importante ter cautela na análise dos resultados devido à falta de coleta de amostras apropriadas de todos os tecidos da mãe e do recém-nascido em momentos apropriados e dados ainda relacionados com mais frequência a relatos e séries de casos, em vez de grandes estudos multicêntricos. Não há relatos de casos de efeitos teratogênicos relacionados à infecção pelo SARS-CoV-2 durante a gestação. A maioria dos estudos foram realizados com gestantes infectadas no final da gestação, quando a maturação dos órgãos fetais já está bem estabelecida. Um estudo multicêntrico

espanhol revelou que a incidência de mal formações congênitas em mulheres infectadas pelo SARS-CoV-2 durante a gestação é semelhante àqueles de mulheres não infectadas. (77)

Alguns estudos revelaram que a expressão de ACE2 nos tecidos placentários, fetais e neonatais pode mudar ao longo do tempo. É provável que haja um aumento entre o final da gestação e os primeiros dias de vida pós-natal (78). Isso justificaria a falta de relatos descrevendo desfechos negativos de infecção materna nos estágios iniciais da gestação, embora ainda não possamos excluir que existam. No entanto, este dado fala a favor de que a transmissão transplacentária é mais provável nas últimas semanas de gravidez.

A OMS estabeleceu um consenso sobre o sistema de classificação da transmissão vertical do SARS-CoV-2 com o objetivo de comparar os dados de diferentes estudos e entender melhor as consequências clínicas para os neonatos nascidos de mães infectadas (79). Em primeiro lugar, classificaram o momento da transmissão vertical (intraútero, intraparto e pós-natal precoce) em categorias mutuamente exclusivas, como segue: (a) confirmado; (b) possível (a evidência é sugestiva, mas não confirmatória para infecção); (c) improvável (pouco suporte para o diagnóstico, mas a infecção não pode ser completamente descartada); e (d) indeterminado (quando não foram realizados os testes necessários para definir a classificação). Uma infecção intrauterina pode ser definida como confirmada se houver 1) “evidência de infecção materna” a qualquer momento durante a gravidez e 2) “exposição fetal intrauterina” (quando pelo menos uma amostra neonatal for positiva para SARS-CoV-2 dentro 24 horas de vida) e 3) “Persistência de SARS-CoV-2 ou resposta imune no neonato” (pelo menos uma amostra neonatal positiva novamente em 24–48 horas de vida).

A necessidade da persistência viral/resposta imune no recém-nascido após 24 horas de vida é fundamental para estabelecer o diagnóstico de infecção pelo SARS-CoV-2. O relato de apenas um único RT-PCR positivo obtido precocemente em uma amostra respiratória neonatal pode indicar replicação viral ativa, fragmentos virais intraparto ou adquiridos pós-natal, ou apenas uma contaminação.

A maioria dos casos neonatais de SARS-CoV-2 descritos até o momento são adquiridos após o nascimento: os bebês podem ser expostos ao vírus por suas mães, profissionais de saúde ou outros membros da família, dificultando a avaliação da origem da infecção. Em relação ao leite humano, apesar da descoberta de partículas virais no mesmo, não há relatos de infecção neonatal pelo SARS-CoV-2 associada a amamentação. Isso sugere que a transmissão viral pelo leite, se houver, deve ser rara. Assim, as mães com suspeita ou confirmação de COVID-19, se estiverem em boas condições clínicas, podem amamentar os seus filhos, aplicando obrigatoriamente a

higienização adequada (80). Ainda hoje existem poucos dados para avaliar o impacto da infecção por COVID-19 na mãe na taxa de amamentação exclusiva (AME) e nas práticas de acompanhamento neonatal de rotina, incluindo imunização e parâmetros de crescimento (81).

A importância do seguimento do crescimento e desenvolvimento dos pacientes de filhos de mulheres infectadas por SARS-CoV-2 se deve ao fato de que aproximadamente 8% das crianças são diagnosticadas com algum tipo de defeito congênito aos 5 anos de idade. Anormalidades genéticas e exposições ambientais, como tabagismo, álcool, medicamentos e infecções no útero, são causas importantes de defeitos congênitos. No entanto, a maioria dos defeitos congênitos (aproximadamente 50% a 60%) não tem causas genéticas ou ambientais conhecidas (42).

As mulheres grávidas são vulneráveis não só aos efeitos diretos da infecção pelo SARS-Cov-2, mas também aos efeitos indiretos da interrupção dos serviços essenciais de saúde e das restrições à interação social. Contudo, o impacto indireto da pandemia nos resultados da gravidez, incluindo o peso ao nascer, permanece pouco claro. Em relação peso ao nascer, um indicador sensível do crescimento intrauterino, está bem documentado de que o estresse durante a gravidez, a precariedade dos cuidados pré-natais e as mudanças na vida social podem trazer resultados adversos. Como importante indicador preditivo da saúde neonatal, as prevalências de baixo peso ao nascer, muito baixo peso ao nascer, pequeno para a idade gestacional (PIG), muito pequeno para a idade gestacional em estudos recentes relacionados à pandemia de COVID-19 apresentam resultados inconsistentes.(82)

Alguns estudos concluíram que a pandemia da COVID-19 pode ter influenciado as intervenções obstétricas e nos desfechos perinatais. Um possível causa seriam as perturbações dos serviços de saúde materno-infantil e ao enorme estresse causado pelas consequências psicossociais e econômicas da pandemia. Os resultados mostram a disparidade considerável entre os países. (83)

No estudo INTERCOVID, previamente citado, no subgrupo de neonatos nascidos de mulheres com diagnóstico de COVID-19, os resultados pioraram quando o neonato também apresentou resultado positivo, com taxas mais altas de internação em unidade de terapia intensiva neonatal, febre, sintomas gastrointestinais e respiratórios e morte, mesmo após ajuste para prematuridade. A amamentação por mães com diagnóstico de COVID-19 e as práticas hospitalares de cuidados neonatais, incluindo contato pele a pele imediato e alojamento conjunto, não foram associadas a um risco aumentado de positividade do recém-nascido. (50) Além disso, outros estudos também mostraram que vários efeitos adversos fetais e neonatais tem sido mais observado em

nas mulheres infectadas pelo SARS-CoV-2 durante a gestação quando comparadas com outras gestantes não infectadas, tais como: prematuridade, baixo peso ao nascer, natimorto, baixo índice de Apgar no quinto minuto e internação em unidades de terapia intensiva neonatal. (49)

Em relação aos desfechos neonatais, a vacinação de gestantes foi associada a uma redução na taxa de natimorto e diminuição no risco de internação em UTI neonatal quando comparadas às não vacinadas. (54) Houve também diminuição nas chances de nascimentos prematuros(54,84). Ressalta-se que a vacinação materna não reduziu o risco de infecção neonatal por SARS-CoV-2 durante os primeiros 6 meses de vida durante o período Omicron.(54)

Em relação às crianças, estas são tão propensas quanto os adultos a se infectarem com o vírus, mas têm menos sintomas e menos doenças graves. Os sintomas mais comuns são tosse (19% a 100%), febre (11% a 100%) e faringite (11% a 100%). Outros sintomas são congestão nasal, rinorreia, taquipneia, sibilância, diarreia, vômito, cefaleia e fadiga. Os exames laboratoriais ficam minimamente alterados. Os achados radiológicos são inespecíficos e incluem infiltrados unilaterais ou bilaterais com, em alguns casos, opacidades em vidro fosco ou consolidação com um sinal de halo ao redor. As crianças raramente precisam de internação em unidades de terapia intensiva (3%) (85).

Um estudo prospectivo realizado na Polônia com 1.405 pacientes pediátricos com diagnóstico de COVID-19 analisou-os em três faixas etárias: menores de 1 ano de idade; entre 1 e 5 anos de idade e entre 5 e 18 anos de idade. A COVID-19 foi mais prevalente no sexo masculino. A maioria das crianças que necessitaram de hospitalização eram menores de 5 anos de idade. Os sintomas do trato respiratório superior foram mais comuns nas crianças menores de cinco de idade, enquanto os sintomas do trato respiratório inferior e gastrointestinais foram mais comuns nas crianças maiores. Os sintomas neurológicos foram semelhantes em todas as faixas etárias. A morbimortalidade foi maior em adolescentes. (86) Dados de registros de óbitos no Brasil também mostram maior mortalidade em adolescentes quando comparados às crianças.(87)

Embora a COVID-19 em crianças seja geralmente menos grave quando comparada a adultos, principalmente aos mais idosos, foi observada que algumas crianças infectadas podem evoluir a um quadro pós-infeccioso grave apresentando disfunção multiorgânica e inflamação sistêmica, denominada síndrome inflamatória multissistêmica pediátrica (SIM-P) associadas à COVID-19. Vários aspectos desta síndrome ainda não são claros. Inicialmente, o quadro clínico heterogêneo da SIM-P foi atribuído a condições como a doença de Kawasaki (DK) ou a síndrome do choque

tóxico, devido às semelhanças existentes.(88) A SIM-P costuma acometer crianças maiores de 5 anos de idade e a hipótese de uma possível associação temporal com a infecção pelo SARS-CoV-2 foi aventada, visto que as crianças afetadas testaram positivas para o vírus. O início dos sintomas tem sido relatado entre quatro e seis semanas após diagnóstico de COVID-19. A OMS define caso de SIM-P associada à COVID-19 como um quadro febril, com aumento dos marcadores inflamatórios por três ou mais dias, associado com diagnóstico prévio de COVID-19 ou contato com casos confirmados, acompanhados de duas das seguintes manifestações, excluídas outras causas infecciosas para o quadro inflamatório: i) erupção cutânea ou conjuntivite não purulenta bilateral ou sinais de inflamação mucocutânea (oral, mãos ou pés); ii) hipotensão ou choque; iii) características de disfunção miocárdica, pericardite, valvulite ou anormalidades coronárias (incluindo achados de ecocardiograma ou troponina elevada ou peptídeo natriurético N-terminal do tipo B); iv) evidência de coagulopatia (tempo de protrombina elevado, tempo de tromboplastina parcial e dímeros D elevados), e; v) problemas gastrointestinais agudos (diarreia, vômito ou dor abdominal).(87)

Estudos prévios revelam que o estresse de longa duração, como nos casos de pré-eclâmpsia, leva a um aumento significativo do nível de 17-OH-progesterona em prematuros. Dessa forma, o nível pós-natal de 17-OH-progesterona pode ser considerado uma medida da gravidade do estresse intrauterino e pode ser usado como um indicador individualizado para cuidados intensivos precoces.(89) Existem dados que sugerem risco de envolvimento adrenal em adultos com COVID-19. Foi observado que adultos gravemente doentes com doença COVID-19 apresentavam níveis de cortisol mais elevados do que aqueles sem COVID-19. O envolvimento adrenal também foi demonstrado por tomografia computadorizada (com infarto adrenal agudo). Embora as crianças possam, teoricamente, estar em risco de desenvolver doenças das glândulas adrenais quando infectadas pelo SARS-CoV-2, não há relatos dessa situação nos casos de COVID-19 e SIM-P. (90,91)

A prevalência e fatores de risco para sequelas pós-COVID-19 em crianças ainda não apresentam dados consistentes na literatura atual. A prevalência de sequelas pós-COVID-19 em crianças é altamente variável entre os estudos, os sintomas de humor, fadiga, tosse, dispnéia e problemas de sono são os mais comuns. A maioria dos estudos não consegue estabelecer uma relação causal entre as sequelas devido à falta de um grupo controle. Além disso, é difícil diferenciar se os sintomas neuropsiquiátricos em crianças após a infecção pelo SARS-CoV-2 se devem ao vírus ou ao resultado de confinamentos e restrições sociais impostos pela pandemia. (92)

1.8. Hipótese do Estudo

Frente aos dados atuais da literatura médica, a hipótese deste estudo é de que a COVID-19 altera o perfil de mediadores inflamatórios de mulheres grávidas infectadas nos diferentes trimestres gestacionais e de que essa infecção pode acarretar desfechos neonatais negativos.

1.9. Justificativa do Estudo

A infecção pelo SARS-CoV-2 durante a gestação abre um espectro de possibilidades de pesquisa quanto aos efeitos na saúde das gestantes e dos recém-nascidos e seu impacto ao longo da vida. A descrição do perfil dos mediadores inflamatórios durante a gestação (na fisiologia e na infecção por SARS-CoV-2), das consequências da infecção nos desfechos neonatais e da investigação dos mecanismos subjacentes podem contribuir a um melhor entendimento da doença e propiciar evidências para o melhor cuidado e tratamento da díade mãe-filho, baseados em achados científicos. Além disso, diante de uma pandemia que paralisou a economia mundial, é ainda perceptível o anseio de pesquisadores e toda a população em um processo de cooperação mútua na busca de respostas a essas questões, cujos detalhes do impacto na saúde populacional ainda estão sendo construídos e serão melhor conhecidos ao longo dos próximos anos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo primário

Descrever as mudanças na resposta imune de gestantes infectadas pelo SARS-CoV-2 em diferentes trimestres da gestação e correlacioná-las com desfechos clínicos e antropométricos dos seus recém-nascidos e ao longo do primeiro ano de vida.

2.2. Objetivos secundários

- i. Descrever o perfil fisiológico de mudanças nas concentrações séricas de mediadores inflamatórios solúveis ao longo da gestação saudável.
- ii. Comparar o panorama de mediadores inflamatórios solúveis de mulheres infectadas pelo SARS-CoV-2 durante a gestação com o panorama de um grupo de gestantes saudáveis obtido no período pré-pandêmico, de acordo com o trimestre de infecção.
- iii. Descrever desfechos clínicos e antropométricos neonatais e no primeiro ano de vida em filhos de mulheres infectadas pelo SARS-CoV-2 durante a gestação, de acordo com o trimestre de infecção e com a gravidade da infecção.
- iv. Descrever as concentrações séricas de 17-hidroxi-progesterona neonatal, como marcador bioquímico de estresse, em filhos de mães que tiveram COVID-19 durante a gestação e compará-las de acordo com o trimestre de infecção.

3. METODOLOGIA

3.1. Aspectos Gerais

Este estudo observacional prospectivo foi conduzido no Distrito Federal entre julho de 2020 e dezembro de 2021, durante a pandemia de COVID-19 e no período de circulação das cepas SARS-CoV-2 B.1.1.28 e B.1.1.33. Faz parte de uma pesquisa mais ampla denominada PROUDEST (*Pregnancy Outcome and Child Development – Effects of SARS-CoV-2 Infection Trial*)(93). Além deste estudo, o PROUDEST engloba:

- I. análises de desfechos clínicos de gestantes infectadas pelo SARS-CoV-2;
- II. estudo de mediadores inflamatórios solúveis em materiais biológicos coletados no momento do parto como sangue periférico materno, líquido amniótico, sangue de cordão umbilical e placenta;
- III. estudo longitudinal de desfechos relacionados ao neurodesenvolvimento dos filhos de mulheres infectadas pelo SARS-CoV-2 durante a gestação;
- IV. estudo de neuroimagem de recém-nascidos filhos de mulheres infectadas pelo SARS-CoV-2 durante a gestação;
- V. estudo do olfato de recém-nascidos filhos de mulheres infectadas pelo SARS-CoV-2 durante a gestação;
- VI. avaliação oftalmológica de recém-nascidos filhos de mulheres infectadas pelo SARS-CoV-2 durante a gestação;
- VII. avaliação oftalmológica de recém-nascidos filhos de mulheres infectadas pelo SARS-CoV-2 durante a gestação e
- VIII. avaliação de saúde mental materna durante a pandemia de COVID-19.

O presente estudo foi desenvolvido em duas fases. Na primeira fase foram analisados os mediadores inflamatórios solúveis em gestantes infectadas pelo SARS-CoV-2 de acordo com o trimestre de infecção. Estes resultados foram comparados com dados de gestantes saudáveis em todos os trimestres gestacionais, cujo material biológico foi colhido no período pré-pandêmico armazenados no biorrepositório mantido no Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Minas), na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais (65).

Na segunda fase do estudo foram analisados os desfechos clínicos e antropométricos, desde o nascimento até os 12 meses de idade, dos filhos de mulheres infectadas pelo SARS-CoV-2 na gestação, em uma amostra populacional do Distrito Federal, também de acordo com o trimestre de gestação em que ocorreu a infecção.

3.2. Primeira fase do estudo

3.2.1. População estudada

Na primeira fase, um total de 141 participantes foram inscritas como amostra não probabilística de conveniência, incluindo mulheres grávidas com infecção convalescente por SARS-CoV-2 (COVID, n = 89) em 3 a 20 semanas após o início dos sintomas durante o período gestacional (1º, 2º e 3º trimestres). Nessa fase, foi estudado também um grupo controle (GC, n=51) saudável composto por gestantes não infectadas cujos materiais biológicos para dosagem dos mediadores inflamatórios foram coletados e armazenados em um biorrepositório no período pré-pandêmico. Esses dois grupos foram pareados por idade gestacional. As gestantes do grupo COVID-19 foram recrutadas em dois hospitais públicos do Distrito Federal – Hospital Universitário de Brasília (HUB) e Hospital Regional da Asa Norte (HRAN). A escolha dos hospitais foi não aleatória, realizada por conveniência. O HRAN foi caracterizado pela Secretaria de Estado da Saúde do DF no início da pandemia como o hospital de referência para gestantes com COVID-19 e o HUB corresponde ao campo de atuação dos profissionais envolvidos no Estudo PROUDEST. As gestantes com diagnóstico de COVID-19, inicialmente acompanhadas no Setor de Ginecologia e Obstetrícia do HUB foram encaminhadas para continuar o seguimento no HRAN, uma vez que o HUB ficou caracterizado como serviço de suporte às gestantes sem COVID-19.

As participantes foram convidadas a integrar o estudo, o qual foi explicado em seus detalhes, e as que aceitaram assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme apresentado no Apêndice 1.

O grupo COVID compreendeu gestantes de 18 a 44 anos de idade, com mediana de idade de 31 anos. Esse grupo foi ainda categorizado em subgrupos de acordo com o trimestre gestacional, denominados: 1º (n=7), 2º (n=34) e 3º (n=48). O diagnóstico de COVID-19 foi confirmado por um teste RT-PCR positivo documentado, após coleta de material com um *swab* nasofaríngeo ou por um teste rápido (Biomanguinhos, FIOCRUZ, Brasil) para IgM ou IgG durante a gravidez. Foram excluídas as gestantes com condições que poderiam interferir na análise do estudo, como suspeita ou confirmação de outras infecções congênitas (como toxoplasmose, sífilis, rubéola, herpes, citomegalovírus, chagas e zika) e usuárias de álcool e tabaco durante a gravidez.

A caracterização do GC também envolveu amostragem não probabilística por conveniência, mas a partir de um biorrepositório mantido no Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Minas), na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. O GC foi composto por

gestantes, com idade entre 18 e 42 anos, com mediana de 28 anos. O GC foi ainda categorizado em subgrupos de acordo com o trimestre gestacional, denominados: 1° (n=21), 2° (n=10) e 3° (n=21). Deste grupo também foram excluídas gestantes com suspeita ou confirmação de outras infecções congênitas (como toxoplasmose, sífilis, rubéola, herpes, citomegalovírus, chagas e zika), além de usuárias de álcool e tabaco durante a gravidez.

3.2.2. Amostras biológicas

Amostras de sangue total (10 mL) foram coletadas através de punção venosa da veia cefálica ou basilica do antebraço de cada participante em tubos a vácuo sem anticoagulante no momento da inclusão no estudo. As amostras de soro foram obtidas por centrifugação (1400 xg, 10 min, 4 °C) das amostras originais dentro de até seis horas após a coleta de sangue. As amostras de soro foram aliquoteadas e armazenadas a uma temperatura de -80°C no freezer especialmente disponibilizado para essa pesquisa no Hospital Universitário de Brasília (HUB), até a quantificação dos mediadores inflamatórios solúveis séricos.

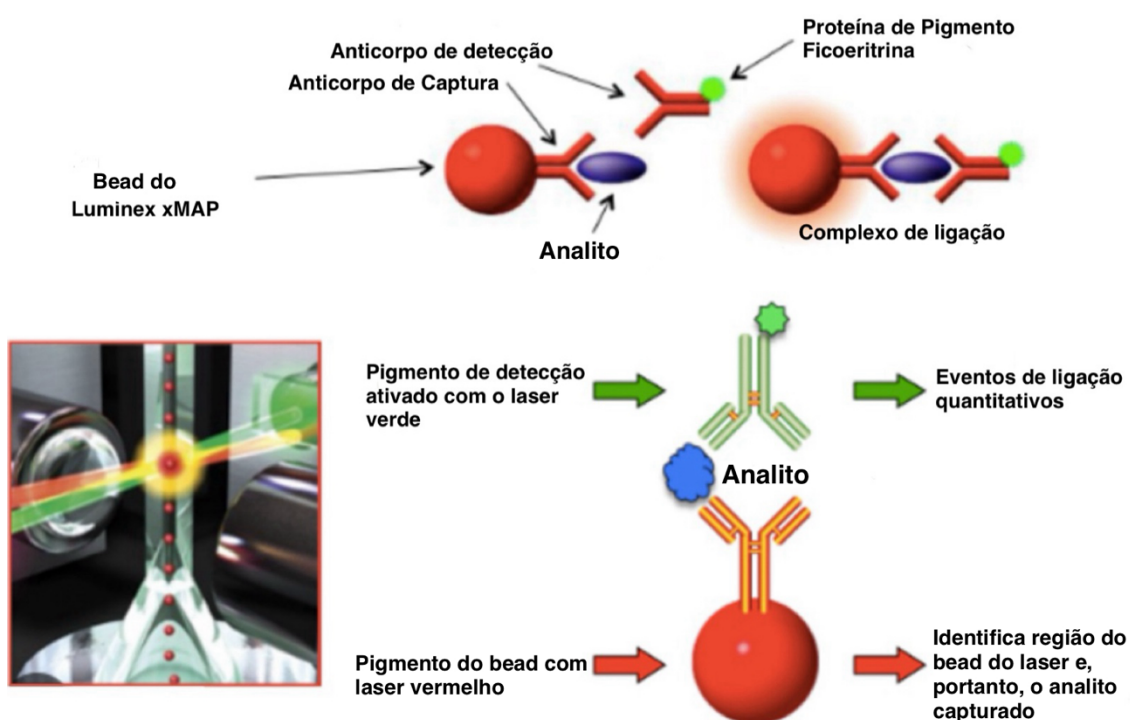
3.2.3. Quantificação de mediadores inflamatórios solúveis no soro

Os mediadores inflamatórios solúveis no soro foram quantificados por um ensaio multiplex de microbeads Luminex de alto rendimento (Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) no laboratório da FIOCRUZ-Minas em Belo Horizonte (MG). As instruções do fabricante foram seguidas para determinar as concentrações de quimiocinas (CXCL8; CCL11; CCL3; CCL4; CCL2; CCL5; CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1β; IL-6; TNF-α; IL-12; IFN-γ; IL-15; IL-17), citocinas regulatórias (IL-1Ra; IL-4; IL-5; IL-9; IL-10; IL-13) e fatores de crescimento (FGF-basic; VEGF; PDGF; G-CSF; GM-CSF; IL-2; IL-7). Os ensaios foram conduzidos em lotes paralelos por um técnico treinado no serviço de citometria de fluxo da FIOCRUZ-Minas. A alíquota utilizada nas análises foi de 50 μL por amostra. As concentrações de mediadores inflamatórios solúveis séricos (pg/mL) foram obtidas de acordo com uma curva logística de cinco parâmetros ajustados por regressão de curvas padrão.

A tecnologia Luminex usa um sinal digital capaz de classificar os ensaios baseados em esferas (pontos de concentração – *beads*) coradas com diferentes proporções de fluoróforos vermelhos e próximos ao infravermelho. Essas proporções definem o “endereço espectral” para cada população de esferas. Conjuntos de esferas individuais são revestidos com um anticorpo de captura qualificado para um analito

específico. O analito capturado de uma amostra é detectado usando um anticorpo biotinizado específico do analito que se liga ao epítipo apropriado do analito imobilizado, mais R-ficoeritrina conjugada com estreptavidina (©-RPE). O Luminex-100 faz a leitura das amostras através um sistema de detecção de sinal fluorescente de três cores. Duas cores classificam a microesfera e sua terceira cor permite a mensuração da intensidade de fluorescência. As esferas servem para detecção e quantificação simultânea de múltiplos analitos em única solução, garantindo alto rendimento ou economia de amostra. Esse método reduz significativamente o tempo e volume da amostra e analisa simultaneamente várias amostras e com vários parâmetros em comparação com outros métodos. Os resultados obtidos por meio desta técnica são mais precisos, uma vez que são resultados da média do número de beads adquiridos, cada um funcionando como sua própria replicata (Figura 13). (94,95)

Figura 13: Visão geral do processo de detecção do imunoenensaio Luminex.



Adaptado de: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/luminex-bead-based-immunoassays-drive-immunoassays-towards-higher-content-biomarker-discovery/>

(Acessado em 26 de setembro de 2023)

3.2.4. Análise estatística

A estatística descritiva foi realizada com o auxílio do programa de computador Prism 8.0.2 (*GraphPad Software*, San Diego, EUA). A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Considerando a distribuição não paramétrica de todos os conjuntos de dados nesta primeira fase do estudo, as variáveis foram descritas em

medianas (e respectivos intervalos interquartis) e as comparações múltiplas entre os subgrupos GC e COVID foram realizadas usando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Além disso, a análise comparativa entre GC e COVID em trimestres correspondentes foi realizada usando o teste de comparação entre medianas de Mann-Whitney. Em todos os casos, a significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.

As assinaturas de mediadores inflamatórios séricos solúveis foram calculadas como a proporção (%) de gestantes com níveis séricos acima dos valores de referência (*cut-off*) definidos como a mediana do Z-escore de cada mediador inflamatório solúvel detectado para todas as amostras do grupo controles saudável (GC) ao longo do 1º, 2º e 3º trimestres (CXCL8=-0,3; CCL11=-0,3; CCL3=-0,3; CCL4=-0,3; CCL2=-0,4; CCL5=-0,2; CXCL10=-0,2; IL-1 β =-0,3 ; IL-6=-0,3; TNF- α =-0,3; IL-12=-0,3; IFN- γ =-0,4; IL-15=-0,5; IL-17=-0,4; IL-1Ra=-0,4; IL-4=-0,3; IL-5=-0,2; IL-9=-0,2; IL-10=-0,2; IL-13=-0,4; FGF-basic=-0,5; PDGF=-0,4; VEGF=-0,4; G-CSF=-0,2; GM-CSF=-0,4; IL-2=-0,4; IL-7=-0,3).

Além disso, as assinaturas correspondentes ao trimestre foram reunidas considerando os valores de referência (*cut-off*) definidos como a mediana do Z-escore de cada mediador inflamatório solúvel detectado para os subgrupos do grupo controle (GC) no 1º trimestre: (CXCL8=0,2; CCL11=0,1; CCL3=0; CCL4=-0,6; CCL2=0,4; CCL5=-0,2; CXCL10=-0,7; IL1 β =-0,2; IL-6=1,6; TNF- α =-0,1; IL-12=-0,2; IFN- γ =0,1; IL-15=-0,5; IL-17=0,1; IL-1Ra=0,1; IL-4=-0,5; IL-5=-0,1; IL-9=0,5; IL-10=-0,2; IL-13=0,2; FGF-basic=0,3; PDGF=0,2; VEGF=0,1; G-CSF=-0,2; GM-CSF=0,1; IL-2=-0,4; IL-7=-0,2); 2º trimestre: (CXCL8=-0,3; CCL11=-0,2; CCL3=-0,3; CCL4=-0,2; CCL2=-0,5; CCL5=-0,1; CXCL10=-0,6; IL1 β =-0,3; IL-6=-0,4; TNF- α =-0,3; IL-12=-0,3; IFN- γ =-0,4; IL-15=0,2; IL-17=-0,2; IL-1Ra=-0,5; IL-4=0,2; IL-5 =-0,2; IL-9=-0,6; IL-10=-0,2; IL-13=-0,4; FGF-basic=-0,6; PDGF=-0,6; VEGF=-0,2; G-CSF=-0,1; GM-CSF=-0,6; IL-2=-0,1; IL-7=-0,2) e 3º trimestre: (CXCL8=-0,4; CCL11=-0,4; CCL3=-0,3; CCL4=0,3; CCL2=-0,5; CCL5 =0,1; CXCL10=0,6; IL1 β =-0,4; IL-6=-0,3; TNF- α =-0,3; IL-12=-0,3; IFN- γ =-0,4; IL-15=-0,5; IL-17=-0,4; IL-1Ra=-0,6; IL-4=-0,3; IL-5=-0,2; IL-9=-0,8; IL-10=-0,3; IL-13=-0,4; FGF-basic=-0,6; PDGF=-0,7; VEGF=-0,4; G-CSF=-0,2; GM-CSF=-0,7; IL-2=-0,5; IL-7=-0,3). Os mediadores inflamatórios solúveis séricos que apresentaram proporção acima de 50% em gestantes foram incluídos no conjunto de biomarcadores com níveis aumentados.

As construções dos mapas de calor (*heat maps*) foram elaboradas usando formatação condicional no Microsoft Excel® para ilustrar o perfil geral das assinaturas de mediadores inflamatórios solúveis séricos dos subgrupos COVID e GC ao longo dos trimestres de gravidez. A razão entre a proporção de gestantes com níveis séricos acima

dos valores de referência no grupo COVID em relação ao GC (%COVID/%GC) também foi avaliada por análise comparativa.

As redes de mediadores séricos solúveis foram construídas com base na análise de correlações (testes de Pearson e Spearman) entre pares de mediadores inflamatórios séricos solúveis. Apenas correlações fortes significativas ($p < 0,05$ e escores “ r ” $\geq |0,67|$) foram empregadas para construir as redes abrangentes. O software de código aberto *Cytoscape* (disponível em <https://cytoscape.org>) foi usado para criar layouts de rede de cluster compreendendo as quatro categorias de mediadores solúveis sérico- - quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento. A análise descritiva das redes de mediadores solúveis séricos foi realizada considerando o número ascendente de correlações fortes para identificar o conjunto de biomarcadores com cinco ou mais correlações fortes (≥ 5). A análise do Diagrama de Venn (disponível em (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)) foi realizada para avaliar os mediadores inflamatórios solúveis séricos preservados (comuns), perdidos ou adquiridos (seletivos) com cinco ou mais correlações fortes nos subgrupos COVID em comparação com GC correspondente ao trimestre.

3.3. Segunda fase do estudo

3.3.1. Desenho do estudo

Na segunda fase do estudo foi realizada uma análise longitudinal, prospectiva, comparativa e analítica referente ao seguimento de recém-nascidos filhos de mulheres expostas à infecção pelo SARS-CoV-2 durante a gestação.

3.3.2. Cálculo amostral

Não havia dados precisos sobre a prevalência da infecção por SARS-CoV-2 entre mulheres grávidas no Brasil na época do início do estudo, mas relatórios internacionais estimavam que até 15,3% de todas as gestações haviam sido expostas (96). Dados da fase inicial do estudo indicavam uma taxa de natalidade de 44.195 recém-nascidos por ano no Distrito Federal (97). Assim, considerando-se uma população “infinita” (> 20.000 mulheres grávidas) e assumindo uma prevalência de 15% de gestações expostas ao SARS-CoV-2, um nível de confiança de 95% e margem de erro de 5%, o tamanho mínimo para uma amostra aleatória amostra de mulheres expostas seria de 195, gerando um número esperado semelhante para as crianças expostas. Ao definirmos uma taxa de abandono esperada para o acompanhamento das crianças em até 20%, o número necessário de mães expostas aumentaria para 234.

3.3.3. Período e local do estudo

O estudo foi realizado no período de junho de 2020 e a dezembro de 2021 na cidade de Brasília – DF, com gestantes acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília (HUB) e no Hospital Regional da Asa Norte (HRAN).

3.3.4. Composição da Amostra

Um total de 262 recém-nascidos de gestantes que tiveram infecção por SARS-CoV-2 com início dos sintomas durante o período gestacional foram incluídos. Os recém-nascidos foram divididos em três grupos de acordo com o trimestre em que ocorreu a infecção materna, a saber: 1º trimestre (n=58), 2º trimestre (n=80) e 3º trimestre (n=124). A divisão de grupos por trimestre de infecção teve como objetivo manter o mesmo padrão de população da primeira fase do estudo.

A participação do RN no estudo estava vinculada ao aceite de sua mãe ou de seus pais, após explicação do estudo e assinatura do TCLE específico para essa fase (Apêndice 1).

a) Critérios de Inclusão

- I. Recém-nascidos expostos: comprovação de infecção materna pelo SARS-CoV-2 durante a gestação. O diagnóstico de COVID-19 materno foi confirmado por um teste RT-PCR positivo documentado usando um *swab* nasofaríngeo ou teste rápido (Biomanguinhos, FIOCRUZ, Brasil) para IgM ou IgG durante a gravidez.
- II. Não apresentar síndromes genéticas ou confirmação/suspeita de infecções congênitas.
- III. Dados completos nos prontuários.

b) Critérios de Exclusão:

- I. impossibilidade e acompanhamento sequencial até os 12 meses de vida, diagnóstico de síndromes genéticas ou de infecções congênitas posteriores ao início do estudo.

3.3.5. Procedimentos Operacionais

As mães foram classificadas de acordo com a gravidade da infecção por SARS-Cov-2 na gestação. Os critérios de gravidade materna da doença adotados neste estudo foram aqueles definidos pelo *National Institutes of Health* (NIH), atualizados em 21 de abril de 2021. As classificações são as seguintes: 1) *Doença Não Grave*: ausência de critérios que definem a COVID-19 como grave ou crítica. 2) *Doença grave*: saturação

de oxigênio menor que 90% em ar ambiente, sinais de taquipneia de insuficiência respiratória grave, com uso de musculatura acessória e incapacidade de completar frases. 3) *Doença Crítica*: Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), sepse, choque séptico, uso de ventilação mecânica (invasiva ou não invasiva) e uso de drogas vasoativas (98).

Ao nascimento, os recém-nascidos (RN) foram classificados de acordo com a idade gestacional em 1) prematuros: RN menores que 37 semanas de idade gestacional ao nascimento; 2) termo: RN com idade gestacional ao nascimento entre 37 semanas e 41 semanas e 6 dias; 3) pós-termo: RN com idade gestacional ao nascimento maior que 41 semanas e 6 dias. Após os cuidados iniciais de rotina, foram averiguadas medidas antropométricas dos recém-nascidos e calculados Z-escore para peso, comprimento e perímetro cefálico de acordo com a curva *Intergrowth-21*. Os RN foram classificados em: 1) adequados para a idade gestacional (AIG), quando o peso estava entre o percentil 10 e 90 da curva; 2) grande para a idade gestacional (GIG), quando o peso estava acima do percentil 90 da curva e 3) pequeno para a idade gestacional (PIG), quando o peso estava abaixo do percentil 10 da curva.(99).

A necessidade de internação em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), necessidade de fototerapia durante a internação, tipo de aleitamento na alta, Apgar de 1^o e 5^o minutos e tempo de permanência hospitalar também foram analisados. O teste de triagem neonatal foi coletado após 48 horas de vida, conforme a rotina, e a dosagem de 17-hidroxi-progesterona (17-OH-Progesterona) foi obtida posteriormente na base de dados de resgate dos resultados do Programa de Triagem Neonatal do Distrito Federal (PTN-DF).

Após o nascimento, estes recém-nascidos foram encaminhados ao ambulatório de seguimento pediátrico aos filhos de gestantes com diagnóstico de COVID-19 durante a gestação, realizado no Hospital Universitário de Brasília (HUB), para acompanhamento clínico. As consultas foram programadas para até 15 dias de vida, 1, 2, 3, 4, 6, 9 e 12 meses de vida. Os dados antropométricos (peso, comprimento e perímetro cefálico) do nascimento, 1 mês, 6 meses e 12 meses de vida foram catalogados para uma avaliação longitudinal de acordo com a curva *Intergrowth-21*. Os dados referentes a consulta de 1 mês foram considerados válidos quando a consulta foi realizada entre 28 e 40 dias de vida; para a consulta de 6 meses foram considerados válidos quando a consulta foi realizada com 6 meses até 6 meses e 15 dias e para as consultas de 12 meses foram considerados válidos até 12 meses e 15 dias. (Apêndice 2 e 3).

Os instrumentos de mensuração utilizados foram uma balança da marca Filizola, modelo BP BABY, nº 267, com divisões de 5g; um estadiômetro artesanal (de madeira) de mesa com divisão em centímetros e uma fita métrica com divisão em centímetros.

3.3.6. Análise estatística

As características analisadas ao nascimento expressas em frequência foram comparadas utilizando-se o teste de Qui-quadrado e aquelas expressas em média foram comparadas empregando-se análise de variância ou teste de Kruskal-Wallis. Nos casos, em que as associações entre as variáveis qualitativas se mostraram significativas, uma análise de resíduo padronizada foi empregada para se determinar em que sentido se apresentava a associação entre as variáveis. Resíduos padronizados maiores que dois, em módulo, indicam significância estatística. No caso, em que o teste ANOVA ou Kruskal-Wallis foi significativo comparações múltiplas foram empregadas pelo teste de Bonferroni ou Dwass, Steel, Critchlow-Fligne (DSCF). Considerou-se significativo $p < 0,05$. As análises foram realizadas empregando-se SAS 9.4

As avaliações longitudinais entre os grupos foram testadas empregando-se modelos lineares de efeitos mistos com estrutura de covariâncias autorregressiva de 1ª ordem com ajustamento pelos valores do nascimento. A equação do modelo seguiu a forma padrão de um experimento fatorial com os efeitos principais de grupo e tempo e com a interação de grupo com tempo. O foco principal da análise foi à mudança dos valores de *Z-score* no primeiro, sexto e décimo segundo mês em relação ao nascimento. Quando a interação entre grupo e tempo foi menor que 0,05, correção de Bonferroni foi utilizada para se ajustar as comparações entre os três grupos. Considerou-se significativo valor de $p < 0,05$. Empregou-se o programa SAS 9.4.

3.4. Aspectos éticos

Todos os participantes do estudo, nas duas fases, forneceram consentimento informado por escrito antes da inclusão de acordo com a Declaração de Helsinque e Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil para pesquisa envolvendo seres humanos. Este estudo foi registrado na Plataforma do Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC, RBR-65qxs2) e aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Brasil (CONEP, CAAE 32359620.0.0000.5558). (Anexo 1)

4. RESULTADOS

Os resultados desta tese estão apresentados em 7 tópicos.

4.1. Análise descritiva da população de gestantes da primeira fase do estudo

Na primeira fase do estudo, a maioria das gestantes do grupo COVID (97%, 86 de 89) apresentou a forma não grave da doença. Os sintomas mais comuns foram: anosmia (68%), coriza e/ou congestão nasal (68%), cefaleia (67%), ageusia (63%), mialgia (57%), tosse (43%), febre (43%), dispneia (31%), dor de garganta (31%), astenia (22%), diarreia (17%), náuseas e vômitos (11%), dor nas articulações (5%), tontura (4%) e doenças de pele (2%).

A infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez foi associada a importantes desfechos maternos e neonatais adversos, incluindo, em ordem de frequência, diabetes mellitus gestacional (37%), índice de Apgar no primeiro minuto ≤ 7 (22%), hipertensão arterial sistêmica materna (18%), restrição do crescimento fetal (11%), trabalho de parto prematuro (11%), sofrimento fetal agudo (8%), Apgar no quinto minuto ≤ 7 (5%) e pré-eclâmpsia (3%). (

Tabela 2). A obesidade foi caracterizada a partir das tabelas de índice de massa corporal específica para gestação.

Tabela 2 – Características da população do estudo

Características	GRUPOS	
	Grupo Controle – GC (n=52)	COVID-19 – COVID (n=89)
Idade, mediana (mín-máx)	28 (18-42)	31 (18-44)
Histórico Obstétrico		
Gestações Anteriores, mediana (mín-máx)	0% (0)	2 (0-6)
Abortos, mediana (mín-máx)	0% (0)	0 (0-2)
Complicações* % (n)	0% (0)	24% (21)
Estudo Atual		
Obesidade % (n)	0% (0)	11% (10)
HAS % (n)	0% (0)	18% (16)
Diabetes % (n)	0% (0)	37% (33)
Pré-eclâmpsia % (n)	0% (0)	3% (3)

HAS = hipertensão arterial sistêmica. *Obesidade, HAS, diabetes, pré-eclâmpsia.

4.2. Panorama geral dos mediadores inflamatórios solúveis séricos na COVID-19 convalescente em diferentes trimestres de gravidez

Os níveis de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento foram medidos em amostras de soro de mulheres grávidas com COVID-19 convalescente em 3 a 20 semanas após o início dos sintomas (COVID) e comparados àqueles detectados em correspondência de trimestres em gestantes não infectadas pré-pandêmicas como controle saudável (GC). Os resultados são apresentados na **Figura 14** e

Figura 15.

Figura 14: Quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias séricas em pacientes convalescentes com COVID-19 em diferentes trimestres de gravidez.

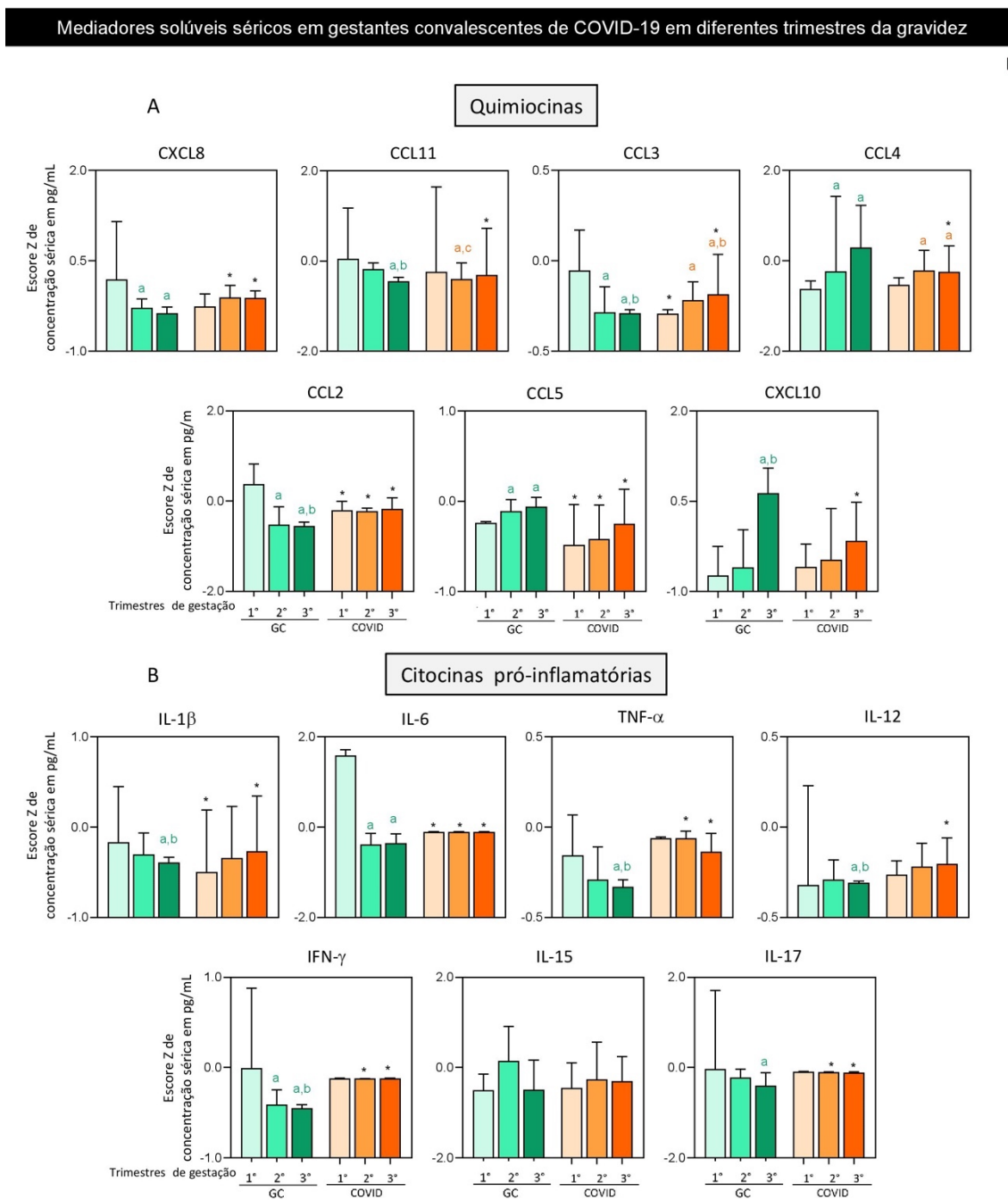
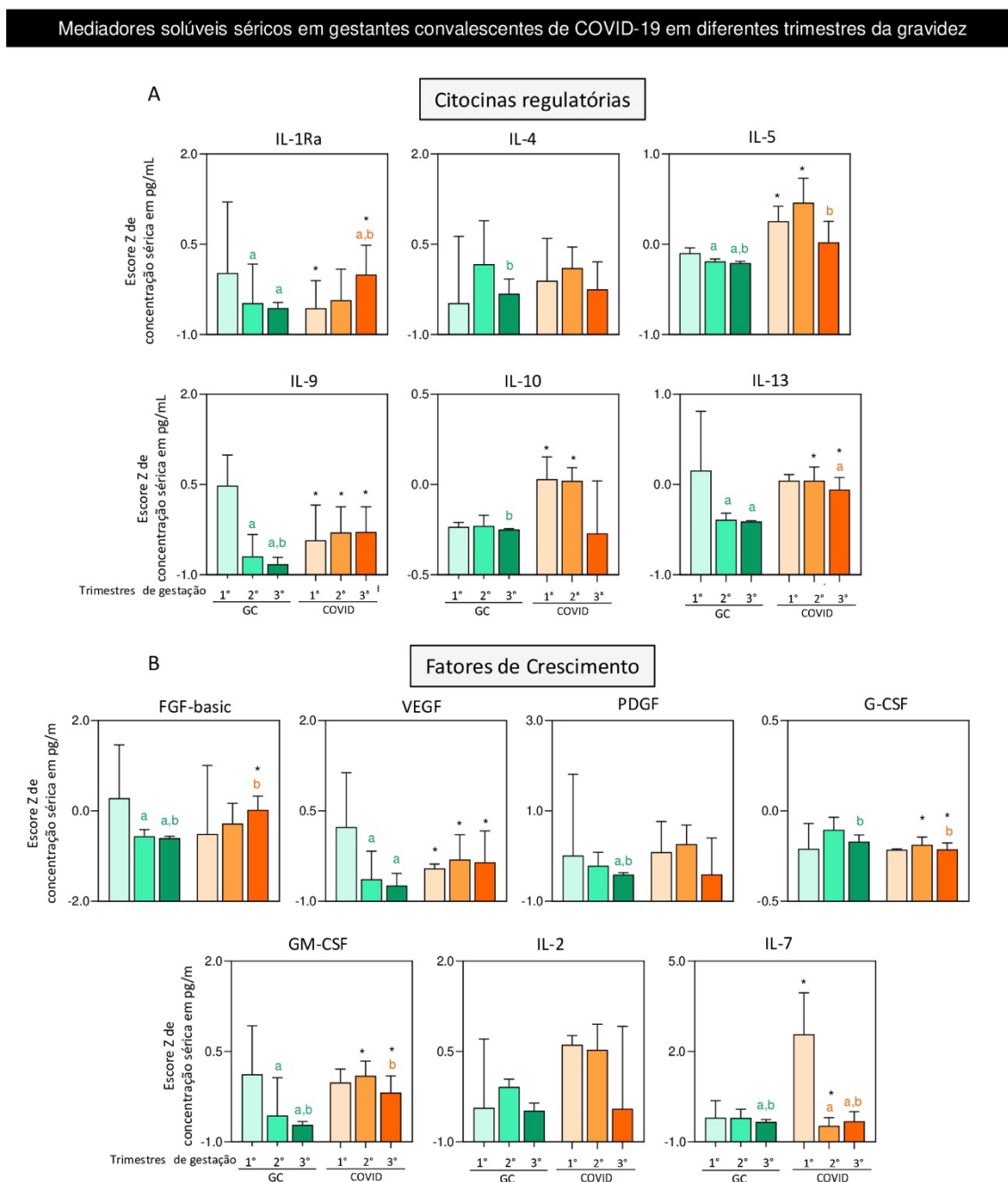


Figura 15: Citocinas reguladoras séricas e fatores de crescimento em pacientes convalascentes com COVID-19 em diferentes trimestres de gravidez.



A **Figura 14** ilustra os níveis de: (A) quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10) e (B) citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ e IL-17). A

Figura 15 ilustra os níveis de: (A) citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) e (B) fatores de crescimento (FGF-basic, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-7). Todos os mediadores solúveis citados foram medidos em amostras de soro de mulheres grávidas com COVID-19 convalescente em 3-20 semanas após o início dos sintomas (COVID, n = 89) e em mulheres grávidas não infectadas pré-pandêmicas como um controle saudável (GC, n=52). Os grupos GC e COVID foram posteriormente categorizados em subgrupos de acordo com o trimestre da gravidez, referidos como: GC 1º (□, n=21), GC 2º (■, n=10), GC 3º (■, n=21), e COVID 1º (□, n=7), COVID 2º (■, n=34), COVID 3º (■, n=48). As medições foram feitas por matriz de esferas multiplex de alto rendimento, conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados são apresentados em gráficos de barras de valores medianos e intervalos interquartil para o escore-Z de concentração sérica (pg/mL). A análise comparativa múltipla foi realizada por Kruskal-Wallis, seguida pelo pós-teste de Dunn e comparações entre COVID-19 e GC em trimestres de gravidez correspondentes avaliados pelo teste de Mann-Whitney. Em todos os casos, foi considerada significância para valores de $p < 0,05$. As diferenças intragrupo foram destacadas pelas letras “a”, “b” e “c” para comparações com o 1º, 2º e 3º trimestres, respectivamente. As diferenças intergrupos em trimestres de gravidez coincidentes foram destacadas indicadas por um asterisco (*).

As gestantes saudáveis apresentaram diminuição progressiva da maioria dos mediadores séricos solúveis no 2º e 3º trimestre de gestação, incluindo quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3 e CCL2); citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ e IL-17); citocinas regulatórias (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13) e fatores de crescimento (FGF-basic, VEGF, PDGF, GM-CSF e IL-7). Por outro lado, aumentos progressivos em CCL4, CCL5, CXCL10 e G-CSF foram observados no grupo HC (? GC). Nenhuma diferença foi observada no grupo GC para IL-15 e IL-2 (**Figuras 14 e 15**).

De uma maneira geral, os níveis mais altos dos mediadores inflamatórios solúveis foram observados em mulheres grávidas convalescentes com COVID-19 em comparação com controles saudáveis, especialmente no 2º e 3º trimestres, incluindo níveis mais altos de CXCL8; CCL11; CCL2; CCL3; IL-1 β ; IL-6 TNF- α ; IL-12; IFN- γ ; IL-17; IL-1Ra; IL-5; IL-9; IL-10; IL-13; FGF-basic; VEGF e GM-CSF. Por outro lado, níveis mais baixos de CCL4, CCL5, CXCL10, G-CSF e IL-7 foram observados no 2º e 3º trimestres no grupo COVID em comparação com o grupo GC (**Figura 14 e**

Figura 15).

Análises adicionais entre os subgrupos de COVID ao longo dos trimestres da gravidez demonstraram um perfil invertido de CCL3, IL-1Ra e FGF-basic para níveis mais elevados no 3º trimestre (**Figura 14 e**

Figura 15)

A Figura 16 resume as principais alterações observadas nos mediadores inflamatórios solúveis séricos ao longo dos trimestres da gravidez saudável e convalescente de COVID-19.

Figura 16: Resumo das principais alterações nos mediadores solúveis séricos em pacientes do grupo controle e do grupo convalescentes com COVID-19 em diferentes trimestres de gravidez.

Resumo das principais mudanças dos mediadores solúveis no soro ao longo dos trimestres de gravidez saudável e COVID-19 convalescente												
	GC			COVID-19			GC			COVID-19		
	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º	1º	2º	3º
Quimiocinas												
CXCL8		↓	↓							↑	↑	
CCL11			↓							↓	↑	
CCL3		↓	↓			↓			↓	↑	↑	↑
CCL4		↑	↑							↑	↓	
CCL2		↓	↓			↓			↓	↓	↑	
CCL5		↑	↑						↑	↓	↑	
CXCL10			↑								↓	
Citocinas pró-inflamatórias												
IL1-β			↓							↑	↑	
IL6		↓	↓						↓	↑	↑	
TNF-α			↓							↑	↑	
IL-12			↓							↑	↑	
INF-γ		↓	↓							↑	↑	
IL-15												
IL-17			↓							↑	↑	
Citocinas regulatórias												
IL1-Ra		↓	↓			↓				↓	↑	
IL-4			↓									
IL-5		↓	↓						↑	↑	↓	
IL-9		↓	↓						↓	↑	↑	
IL-10			↓						↑	↑		
IL-13		↓	↓						↑	↓	↑	
Fatores de crescimento												
FGF-basic		↓	↓								↓	↑
VEGF		↓	↓						↓	↑	↑	
PDGF			↓									
G-CSF			↓							↓	↓	↓
GM-CSF		↓	↓							↑	↓	↑
IL-2												
IL-7			↓							↑	↓	↓

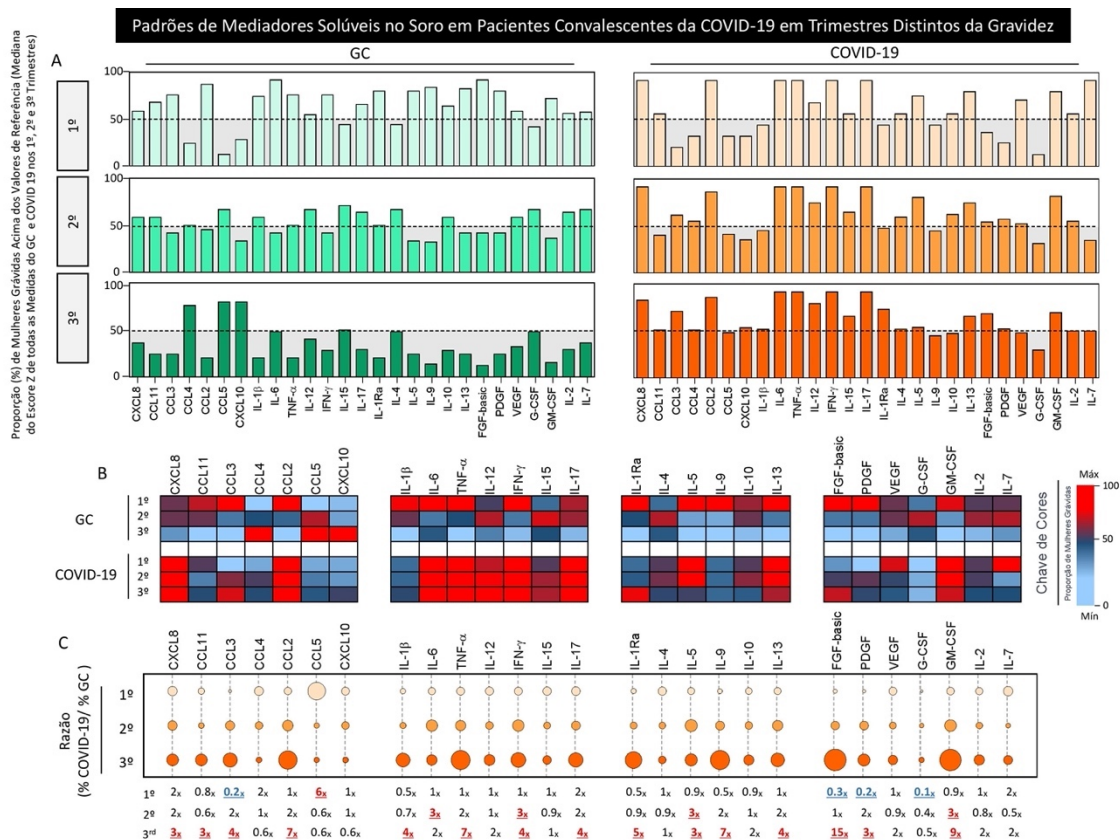
Na Figura 16, as diferenças significativas intragrupo foram sublinhadas por setas verdes e laranja, indicando diminuição (↓; ↓, setas vazias) ou aumento (↑; ↑, setas cheias) para comparações entre 2º vs 1º, 3º vs 1º e 3º vs 2º. Diferenças significativas entre grupos em trimestres de gravidez correspondentes foram identificadas por setas pretas, indicando diminuição (↓) ou aumento (↑) para comparações em 1º, 2º e 3º trimestres.

4.3. Assinaturas de mediadores solúveis séricos em pacientes convalescentes com COVID-19 em diferentes trimestres de gravidez

As assinaturas de mediadores solúveis séricos foram reunidas como a porcentagem de gestantes com níveis séricos acima dos valores de referência definidos como o Z-escore mediano de cada mediador inflamatório solúvel detectado em todos os controles saudáveis ao longo da gravidez. Os resultados são apresentados na

Figura 17.

Figura 17: Assinaturas de mediadores solúveis séricos em pacientes do grupo controle e do grupo de convalescentes com COVID-19 em diferentes trimestres de gravidez.



Na **figura 17**, as assinaturas de quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5 e CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-15 e IL-17), citocinas regulatórias (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13) e fatores de crescimento (FGF-basic, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2 e IL-7) foram reunidos para mulheres grávidas com COVID-19 convalescente em 3-20 semanas após o início dos sintomas (COVID, n = 89) e para grávidas não infectadas pré-pandêmicas como controle saudável (GC, n=52). Os grupos GC e COVID foram posteriormente categorizados em subgrupos de acordo com o trimestre da gravidez, referidos como: GC 1º (n=21), GC 2º (n=10), GC 3º (n=21) e COVID 1º (n=7), COVID 2º (n=34), COVID 3º (n=48). As medições foram feitas por matriz de esferas multiplex de alto rendimento, conforme descrito em **Material e Métodos**. Na parte A da figura os resultados são apresentados em gráficos de barras mostrando a proporção (%) de gestantes com níveis séricos acima dos valores de referência (*cut-off*) definidos como a mediana do Z-escore de cada mediador solúvel detectado para todas as GC ao longo do 1º, 2º e 3º trimestres, conforme descrito em **Material e Métodos**. Os mediadores solúveis séricos com proporção de gestantes acima de 50% (zona cinza, linha tracejada)

foram incluídos no conjunto de biomarcadores com níveis aumentados. Na parte B, as construções do mapa de calor (do inglês *heat map*) foram posteriormente montadas para ilustrar o perfil geral das assinaturas de mediadores solúveis séricos dos subgrupos COVID e GC ao longo dos trimestres de gravidez. Uma chave de cores foi usada para destacar os mediadores solúveis séricos com níveis diminuídos (proporção <50%, em direção ao azul claro), inalterados (proporção =50%, preto) ou aumentados (proporção >50%, em direção ao vermelho). Na parte C, a razão entre a proporção de gestantes com níveis séricos acima dos valores de referência no grupo COVID em relação à GC (%COVID/%GC) foi ainda calculada e apresentada em gráficos orbitais. As proporções de cada mediador solúvel sérico ao longo do 1º, 2º e 3º trimestres são fornecidas na figura, sublinhadas como diminuídas ($\leq 0,3x$, azul), inalteradas (0,4-2x, preto) ou aumentadas ($\geq 3x$, vermelho).

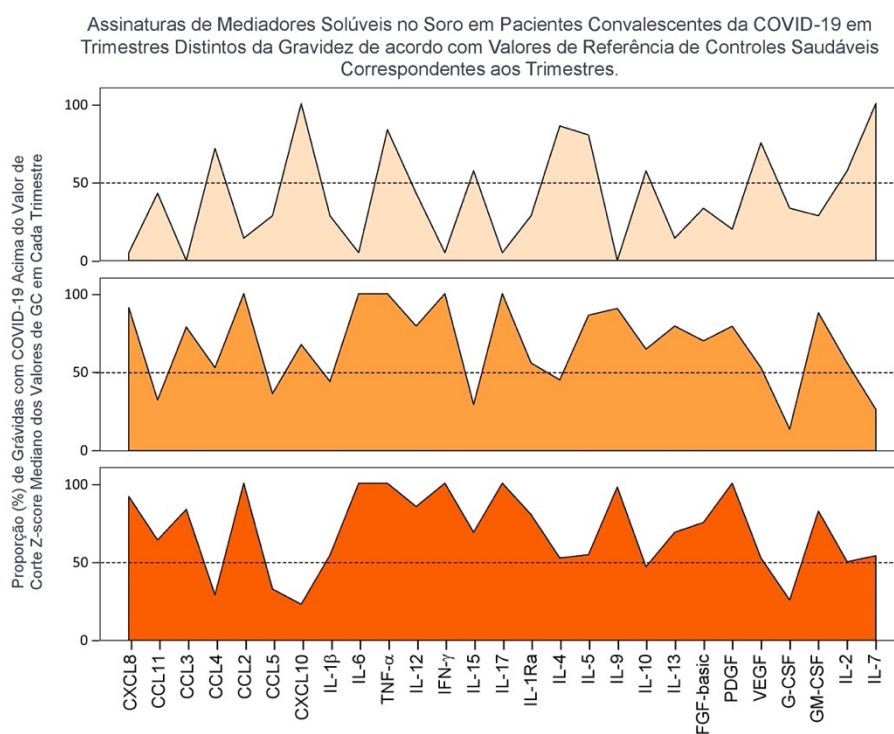
A análise dos dados demonstrou que a proporção de gestantes saudáveis com níveis elevados de mediadores solúveis séricos diminuiu progressivamente no 2º e 3º trimestres de gestação. Esses dados corroboram ainda que um curso de gravidez saudável apresenta uma diminuição progressiva da maioria dos mediadores séricos solúveis em direção ao 2º e 3º trimestres, exceto para CCL4, CCL5 e CXCL10 (**Figura 17 A**).

Por outro lado, a proporção de gestantes com COVID-19 convalescente apresentando altos níveis séricos de mediadores solúveis aumentou progressivamente do 1º ao 3º trimestre de gestação (**Figura 17 A**). O *heat map* ilustrara ainda que o maior aumento nos mediadores solúveis séricos observado em mulheres grávidas com COVID-19 convalescente ocorreu em citocinas pró-inflamatórias, ou seja, IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ e IL – 17 (**Figura 17B**).

O perfil de mediadores inflamatórios solúveis séricos foi ainda avaliado como a razão entre a proporção observada no grupo COVID em relação aos pacientes com GC no trimestre correspondente (%COVID/%GC). Usando essa estratégia, os resultados confirmaram que um conjunto maior de biomarcadores apresentou uma alta relação %COVID/%GC no 2º e 3º trimestres. No 2º trimestre de gestação, foram observadas razões aumentadas para IL-6, IFN- γ , IL-5 e GM-CSF (aumento de três vezes) no grupo COVID-19. Um conjunto maior de mediadores solúveis séricos com proporções aumentadas foi identificado para o 3º trimestre, incluindo CXCL8, CCL11, IL-5 e PDGF (aumento de três vezes), CCL3, IL-1 β , IFN- γ , IL-17 e IL-13 (aumento de quatro vezes), CCL2, TNF- α (aumento de sete vezes) junto com IL-1Ra, IL-9, GM-CSF e FGF-basic (aumento de cinco, nove, nove e quinze vezes, respectivamente) (**Figura 17C**).

As assinaturas de mediadores inflamatórios solúveis séricos também foram avaliadas considerando os valores de referência de controles saudáveis correspondentes ao trimestre. Os resultados são apresentados na **Figura 18**. Os dados reforçam que conjuntos maiores de mediadores inflamatórios solúveis séricos com proporções aumentadas foram identificados para o 2º e 3º trimestre de gravidez em comparação com controles correspondentes ao trimestre (**Figura 18**).

Figura 18: Assinaturas de mediadores solúveis séricos em pacientes convalescentes com COVID-19 em trimestres distintos de gravidez, de acordo com valores de referência de controles saudáveis correspondentes ao trimestre.

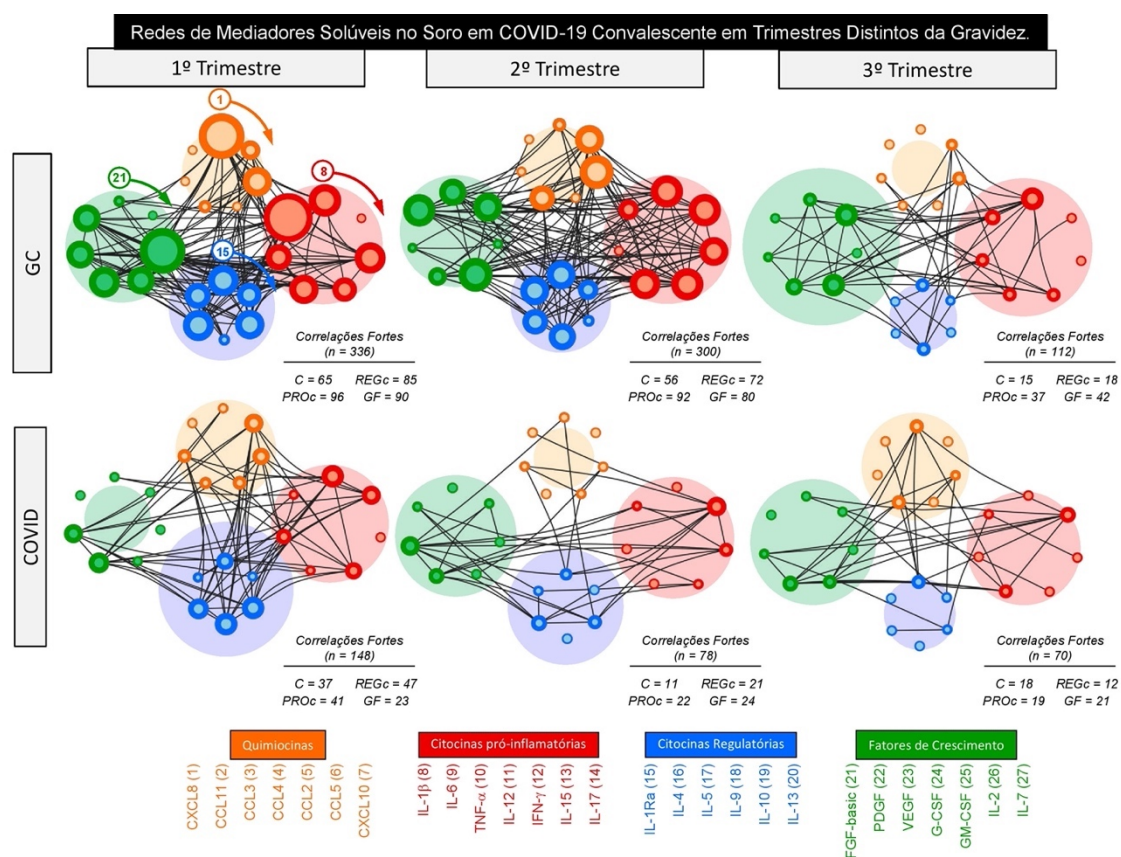


Na **Figura 18**, as assinaturas de quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5 e CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1b, IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-15 e IL-17), citocinas regulatórias (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13) e fatores de crescimento (FGF-basic, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2 e IL-7) são apresentadas em gráficos de linhas, destacando a área sob a curva, mostrando a proporção (%) de gestantes com níveis séricos acima dos valores de referência (cut-off) definidos como a mediana do Z-escore de cada mediador solúvel detectado para GC subgrupos no 1º, 2º e 3º trimestres conforme descrito em **Material e Métodos**. Os mediadores solúveis séricos com proporção de gestantes acima de 50% (linha tracejada) foram incluídos no conjunto de biomarcadores com níveis aumentados.

4.4. Redes de mediadores inflamatórios solúveis séricos em COVID-19 convalescente em diferentes trimestres de gravidez

Com o objetivo de avaliar o panorama da interação de mediadores inflamatórios solúveis séricos em mulheres grávidas convalescentes de COVID-19 e controles saudáveis, redes integrativas foram construídas com base na correlação geral entre pares de moléculas. Os resultados são apresentados na **Figura 19**.

Figura 19: Redes de mediadores solúveis séricos em pacientes convalescentes de COVID-19 em diferentes trimestres de gravidez



Redes abrangentes foram montadas para quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento observados em mulheres grávidas convalescentes de COVID-19 em 3-20 semanas após o início dos sintomas (COVID, n = 89), com gestantes não-infectadas pré-pandemia como controle saudável (GC, n=52). Os grupos GC e COVID foram ainda categorizados em subgrupos de acordo com o trimestre da gravidez, denominados: 1º (GC=21 e COVID=7), 2º (GC=18 e COVID=34) e 3º (GC= 21 e COVID=48). As medições foram feitas por matriz de esferas multiplex de alto rendimento, conforme descrito em **Material e Métodos**. A

análise dos dados foi realizada pelos testes de classificação de Pearson e Spearman com apenas correlações fortes significativas ($p < 0,05$ e escores “ r ” $\geq |0,67|$) empregadas para construir as redes abrangentes. Redes de layout de cluster foram montadas, compreendendo quatro categorias de mediadores séricos solúveis: Quimiocinas – C – (círculos laranjas: 1=CXCL8; 2=CCL11; 3=CCL3; 4=CCL4; 5=CCL2, 6=CCL5 e 7=CXCL10); Citocinas pró-inflamatórias – PROc (círculos vermelhos – 8= IL-1b ; 9=IL-6; 10= TNF α ; 11=IL-12; 12= IFN γ ; 13=IL-15 e 14=IL-17); Citocinas reguladoras – REGc (círculos azuis – 15=IL-1Ra; 16=IL-4; 17=IL-5; 18=IL-9; 19=IL-10 e 20=IL-13), e Fatores de Crescimento – GF (círculos verdes – 21=FGF-basic; 22=PDGF; 23=VEGF; 24=GCSF; 25=GM-CSF; 26=IL-2 e 27=IL-7). A espessura da borda do círculo é proporcional ao número de correlações fortes. As bordas de conexão (linhas pretas) são usadas para ligar pares de mediadores solúveis séricos que apresentam correlações significativas. O número de correlações fortes (C, PROc, REGc e GF) observadas para cada rede é fornecido na figura e usado para análise comparativa entre COVID e GC, bem como entre subgrupos. A área de fundo circular é proporcional ao número de correlações fortes de cada cluster dentro da respectiva rede.

A análise dos dados demonstrou que a gravidez saudável evolui para o 3º trimestre com uma diminuição geral na conectividade de rede (1º = 336; 2º = 300 e 3º = 112 correlações fortes). Embora as mulheres grávidas convalescentes de COVID-19 convalescente tenham exibido diminuição contínua semelhante na conectividade de rede no 3º trimestre (1º=146; 2º=78 e 3º=70 correlações fortes), o número de conexões foi notavelmente menor no grupo COVID-19 comparado ao GC (**Figura 19**).

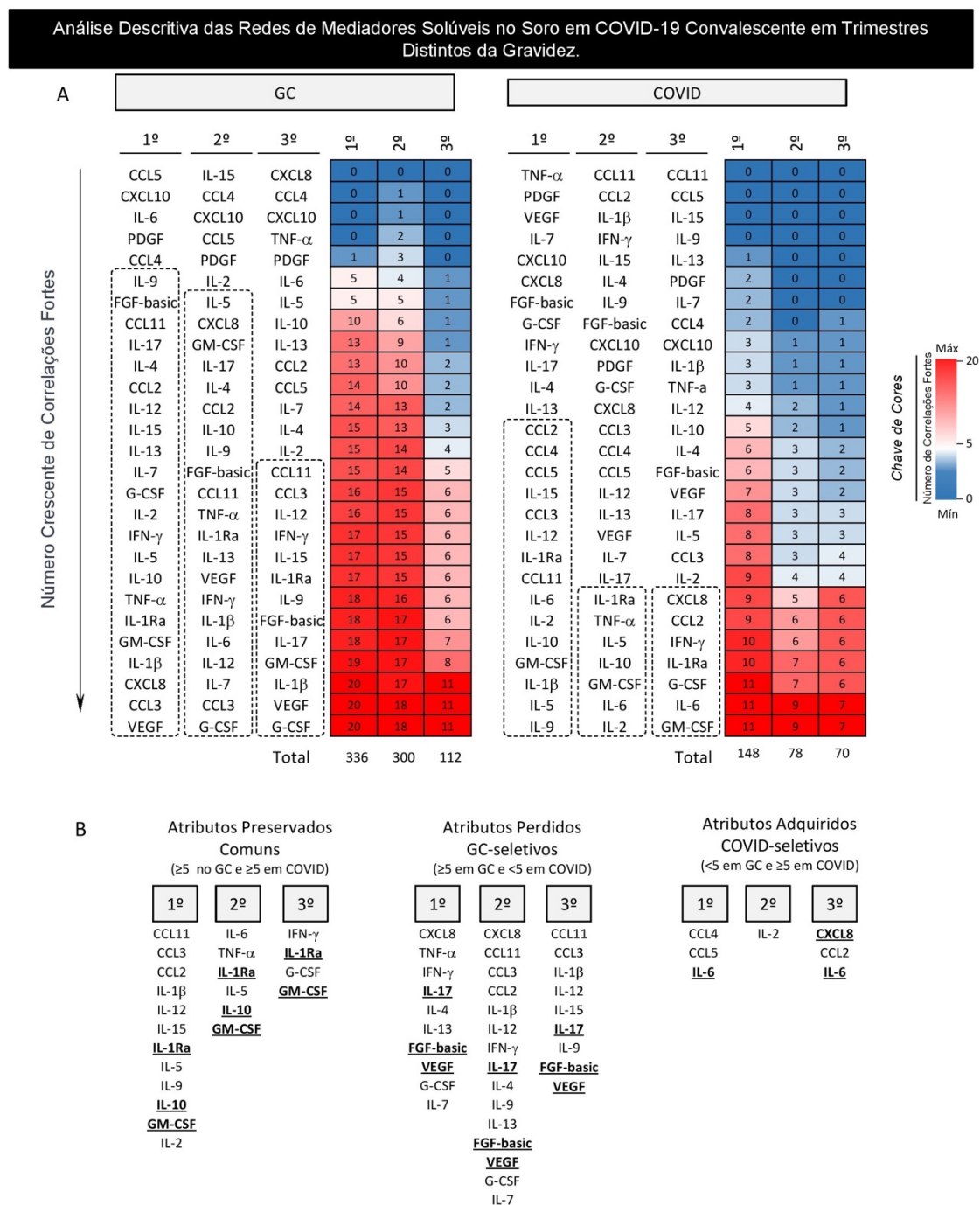
No geral, a análise da conectividade do cluster durante a gravidez saudável mostrou que as citocinas pró-inflamatórias apresentaram mais conexões no 1º e 2º trimestres (96 e 92 fortes correlações, respectivamente), com predominância do fator de crescimento no 3º trimestre (42 fortes correlações). Por outro lado, o grupo COVID apresentou predominância de citocinas reguladoras no 1º trimestre (47 correlações fortes) com predominância de fator de crescimento no 2º e 3º trimestres (24 e 21, respectivamente) (**Figura 19**). Em geral, a infecção convalescente por COVID-19 durante a gravidez levou a uma perda de conectividade de rede, com menos correlações fortes e mudanças na predominância de conectividade entre as categorias de mediadores séricos solúveis (**Figura 19**).

4.5. Análise descritiva de redes de mediadores solúveis séricos em pacientes convalescentes com COVID-19 em diferentes trimestres de gravidez

A fim de fornecer uma visão mais abrangente da conectividade de rede entre mediadores solúveis séricos em mulheres grávidas convalescentes de COVID-19 e controles saudáveis ao longo dos trimestres da gravidez, uma análise descritiva do diagrama de Venn foi realizada para identificar o conjunto de biomarcadores com preservação (comum), atributos perdidos ou adquiridos (seletivos) com cinco ou mais correlações fortes nos subgrupos COVID em comparação ao GC correspondente ao trimestre. Os resultados são apresentados na (

Figura 20).

Figura 20: Análise descritiva das redes de mediadores solúveis séricos em pacientes convalescentes com COVID-19 em diferentes trimestres de gravidez.



O perfil geral das redes de mediadores inflamatórios solúveis séricos foi avaliado em mulheres grávidas convalescentes de COVID-19 em 3 a 20 semanas após o início dos sintomas (COVID, n=89) e em mulheres grávidas não infectadas pré-pandêmicas como um controle saudável (GC, n=52). Os grupos GC e COVID foram ainda categorizados em subgrupos de acordo com o trimestre da gravidez, referidos como: 1º (GC=21 e COVID=7), 2º (GC=10 e COVID=34) e 3º (GC =21 e COVID=48). Na parte A

da figura, o número ascendente de correlações fortes foi organizado para identificar o conjunto de biomarcadores com cinco ou mais correlações fortes com outras moléculas em cada trimestre de gravidez nos subgrupos GC e COVID. O mapa de calor foi montado para ilustrar o perfil geral das redes de mediadores solúveis séricos dos subgrupos COVID e GC ao longo dos trimestres de gravidez. Uma chave de cores foi usada para sublinhar os mediadores solúveis séricos com cinco ou mais correlações fortes (em direção ao vermelho). Na parte B, um resumo dos atributos preservados (≥ 5 em GC e ≥ 5 em COVID), perdidos (≥ 5 em GC e < 5 em COVID) ou adquiridos (< 5 em GC e ≥ 5 em COVID) foram identificados pela análise do diagrama de Venn. Os atributos identificados ao longo dos trimestres são destacados pelo formato de sublinhado em negrito.

O mapa de calor foi montado para organizar os mediadores solúveis séricos com uma ordem crescente de correlações fortes e identificar o conjunto de biomarcadores com cinco ou mais correlações fortes em cada trimestre de gravidez nos grupos COVID e GC (

Figura 20 A).

A análise dos dados demonstrou que o número de atributos preservados referidos como comuns em GC e COVID (≥ 5 correlações fortes em GC e COVID) com cinco ou mais correlações diminuiu progressivamente do 1º (n=12) para o 2º (n= 6) e 3º trimestres (n=4). Em detalhe : 1º : CCL11, CCL3, CCL2, IL-1b, IL-12, IL-15, IL-1Ra, IL-5, IL-9, IL-10, GM-CSF, e IL-2 ; 2º : IL-6, TNF-a, IL-1Ra, IL-5, IL-10, GM-CSF e 3º :IFN- γ , IL-1Ra, G-CSF e GM-CSF. O número de atributos perdidos referidos como seletivos de GC (≥ 5 correlações fortes em GC e < 5 correlações fortes no grupo COVID) foi maior no 2º trimestre (n=15) em comparação com o 1º (n=10) e o 3º (n=9). Em detalhe: 1º :CXCL8, TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-13, FGF-basic, VEGF, G-CSF e IL-7; 2º: CXCL8, CCL11, CCL3, CCL2, IL-1 β , IL-12, IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-9, IL-13, FGF-basic, VEGF, G-CSF, e IL-7; 3º: CCL11, CCL3, IL-1 β , IL -12, IL-15, IL-17, IL-9, FGF-basic e VEGF. Um conjunto de atributos adquiridos, denominados seletivos para COVID (< 5 fortes correlações em GC e ≥ 5 fortes correlações em COVID) foram identificados em cada trimestre: 1º (n=3): CCL4, CCL5 e IL-6, 2º: (n=1) IL-2 e 3º (n=3) CXCL8, CCL2 e IL-6 (

Figura 20 B).

De uma perspectiva geral, uma diminuição pronunciada na conectividade de rede entre mediadores solúveis séricos foi observada na infecção convalescente por COVID-19 durante a gravidez, conforme demonstrado pelo menor número de moléculas que estabelecem fortes correlações impulsionadas por um desequilíbrio entre atributos preservados, perdidos e adquiridos no COVID grupo. Enquanto IL-1Ra, IL-10 e GM-CSF apresentaram um número preservado de correlações (≥ 5 correlações fortes em GC e COVID), IL-17, FGF-basic e VEGF perderam conectividade ao longo da gravidez. IL-6 (no 1^o e 3^o trimestres) e CXCL8 (no 3^o trimestre) foram incluídos em um conjunto de atributos adquiridos, denominados seletivos para COVID (≥ 5 correlações fortes em COVID e < 5 em GC) (

Figura 20 B, negrito atributos sublinhados).

4.6. Análise descritiva da amostra de recém-nascidos

A análise descritiva da amostra de recém-nascidos já se refere a segunda fase do estudo como descrito em **Material e Métodos**. A fim de descrever as características da amostra de recém-nascidos analisada na segunda fase do estudo foi elaborada a **Tabela 3**. Os recém-nascidos foram divididos em grupos de acordo com o trimestre de infecção materna.

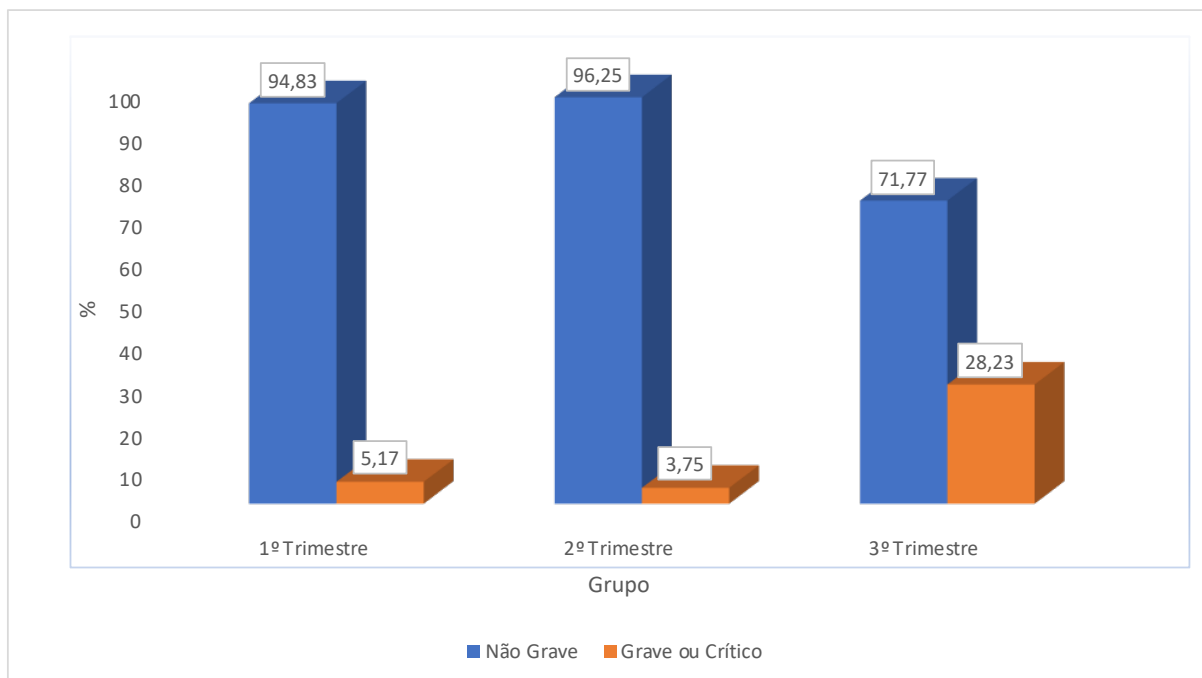
Tabela 3 – Características da população de recém-nascidos baseada no trimestre de infecção materna por SARS-CoV-2 na gestação.

Variável*	Grupo			p-valor
	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	
Gravidade Mãe				< 0,0001
Não Grave	55 (94,83) [2,49]	77 (96,25) [3,51]	89 (71,77) [-5,31]	
Grave ou Crítico	3 (5,17) [-2,49]	3 (3,75) [-3,51]	35 (28,23) [5,31]	
IG				0,0246
Pré Termo	1 (1,72) [-2,37]	7 (8,75) [-0,42]	18 (14,52) [2,36]	
Termo	57 (98,28) [2,37]	73 (91,25) [0,42]	106 (85,48) [-2,36]	
Classificação				0,9246
AIG	47 (81,03)	66 (82,50)	98 (79,03)	
GIG	5 (8,62)	7 (8,75)	10 (8,06)	
PIG	6 (10,34)	7 (8,75)	16 (12,90)	
Destino				0,1788
ALCON	56 (96,55)	70 (87,50)	113 (91,13)	
UTI	2 (3,45)	10 (12,50)	11 (8,87)	
Icterícia				0,1084
Não	35 (60,34)	53 (66,25)	64 (51,61)	
Sim	23 (39,66)	27 (33,75)	60 (48,39)	
Fototerapia				0,6160
Não	42 (72,41)	63 (78,75)	91 (73,39)	
Sim	16 (27,59)	17 (21,25)	33 (26,61)	
Aleitamento Materno				0,3125
Fórmula ou Misto	12 (20,69)	15 (18,75)	34 (27,42)	
SME	46 (79,31)	65 (81,25)	90 (72,58)	
Peso	3.187,90±501,33	3.187,40±525,10	3.082,77±547,51	0,2815
Z-escore Peso	-0,21±1,07	-0,05±1,00	-0,09±1,06	0,6502
Comprimento	48,44±2,46	48,27±2,59	48,19±2,62	0,8347
Z-escore Comprimento	-0,49±1,36	-0,43±1,24	-0,32±1,12	0,6467
Perímetro Cefálico	34,39±1,34	34,58±2,63	34,29±1,65	0,5821
Z-escore Perímetro Cefálico	0,22±1,07	0,54±2,02	0,43±1,17	0,4421
IMC	13,53±1,44	13,67±2,37	13,16±1,42	0,1132
Z-escore IMC	0,11±1,09	0,16±1,30	-0,07±1,08	0,3085
Apgar 1 minuto	8,00±2,00	8,00±1,00	8,00±2,00	0,1996
Apgar 5 minutos	9,00±0,00	9,00±0,00	9,00±0,00	0,8747
Tempo de Internação	3,00±1,32	3,34±1,77	4,31±4,11	0,1857
17OH-Progesterona[§]	4,61±1,99	6,63±4,38	6,56±6,61	0,0057

* Valores expressos em números absolutos (frequência, %); média ± desvio padrão ou mediana ± intervalo interquartil [resíduo padronizado]# p-valor calculado pelo teste de Qui-quadrado ou ANOVA ou Não paramétrico de Kruskal-Wallis & Comparações múltiplas utilizando o teste DSCF (1º x 2º - p-valor = 0,0023; 1º x 3º - p-valor = 0,2608; 2º x 3º - p-valor = 0,1530)

Existe uma associação significativa entre a gravidade do quadro materno (grave ou crítico) com o trimestre de infecção ($p < 0,0001$), no sentido de que entre as mães que foram infectadas no 3º trimestre houve maior frequência de casos em estado crítico ou grave. A **Figura 21** ilustra essa diferença que foi significativa na comparação entre os grupos.

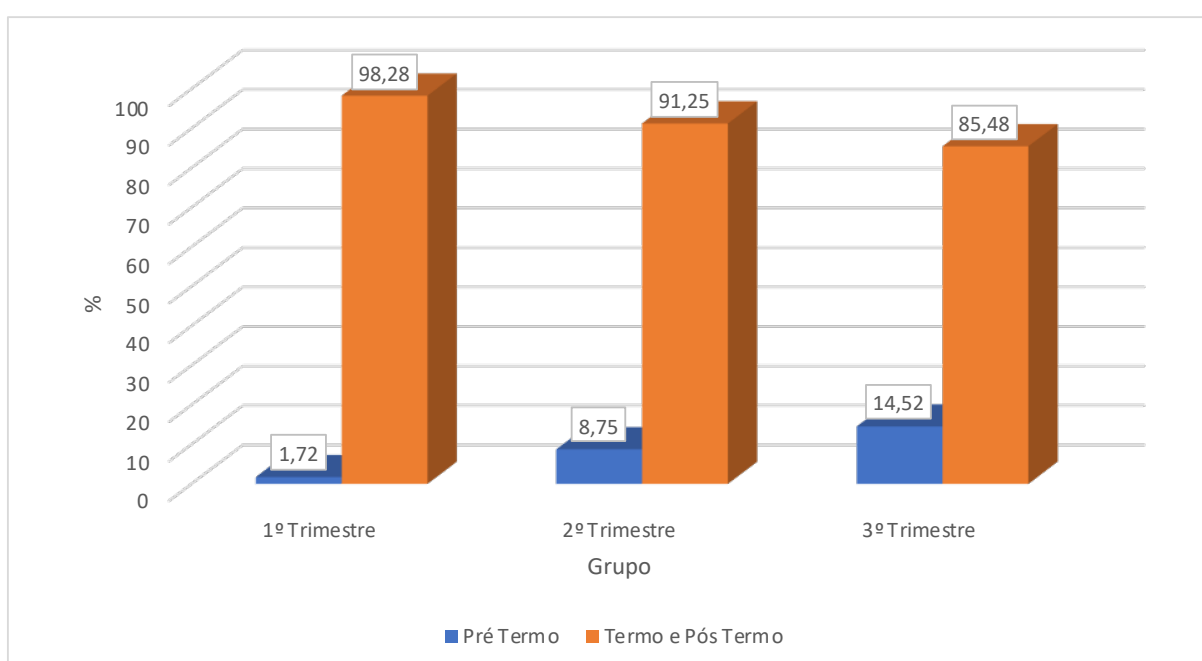
Figura 21: Distribuição de gestantes graves ou críticas e não graves por trimestre de gestação.



Outro ponto relevante que a análise da comparação entre os grupos trouxe foi a incidência de prematuridade. O grupo de mulheres infectadas no terceiro trimestre apresentou um número significativamente maior de recém-nascidos prematuros ($p = 0,0247$). A

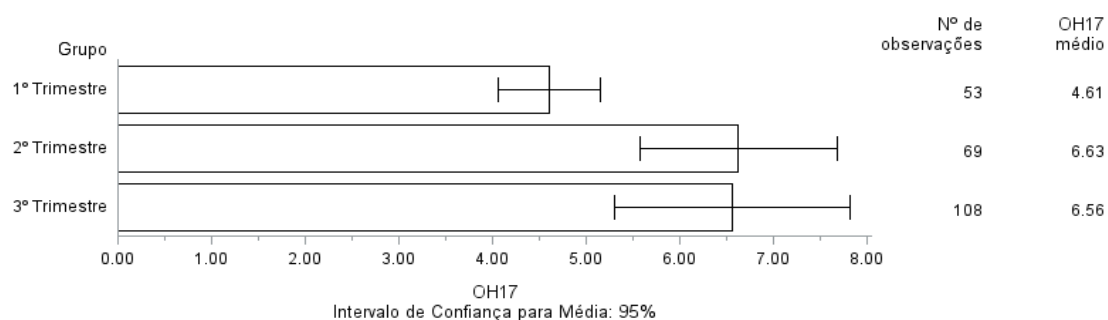
Figura 22 ilustra mais este ponto relevante da análise.

Figura 22: Proporção de recém-nascidos a termo e pré-termo por trimestre de gestação.



Outro objeto de análise que apresentou destaque foi o valor médio de 17-OH-progesterona. Ele difere significativamente entre pelo menos dois grupos ($p = 0,0057$), no sentido de que filhos das gestantes do grupo 1º trimestre apresentaram valores médios significativamente menores do que aqueles do grupo 2º trimestre ($p = 0,0023$). A **Figura 23** realça este ponto.

Figura 23: Variação dos valores médios de 17-OH-Progesterona (ng/mL) do recém-nascido de acordo com o trimestre de infecção materna.



Para as demais variáveis não houve associação ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Como a análise por trimestre revelou uma significância bastante relevante da gravidade do quadro clínico materno no terceiro trimestre, foi optado por ampliar a análise desfechos neonatais de acordo com a gravidade materna. Para esta nova perspectiva de análise, os recém-nascidos foram subdivididos em dois grupos: recém-nascidos de mulheres com quadros não graves durante a gestação e recém-nascidos de mulheres com quadros graves e críticos durante a gestação (**Tabela 4**).

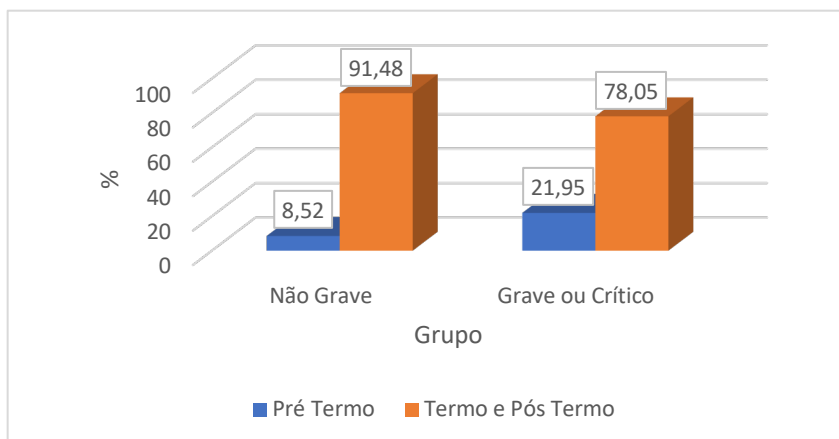
Tabela 4 – Características da população de recém-nascidos baseada na gravidade de infecção materna por SARS-CoV-2 na gestação.

Variável*	Grupo		OR (IC 95 %)	p-valor
	Não Grave	Grave ou Crítico		
IG			3,02 (1,26; 7,25)	0,0159
Termo e Pós Termo	204 (91,48)	32 (78,05)		
Pré Termo	19 (8,52)	9 (21,95)		
Destino			3,36 (1,32; 8,55)	0,0140
ALCON	208 (93,27)	33 (80,49)		
UTI	15 (6,73)	8 (19,51)		
Icterícia			1,36 (0,69; 2,64)	0,3702
Não	131 (58,74)	21 (51,22)		
Sim	92 (41,26)	20 (48,78)		
Fototerapia			1,29 (0,62; 2,71)	0,4922
Não	169 (75,78)	29 (70,73)		
Sim	54 (24,22)	12 (29,27)		
Aleitamento Materno			1,84 (0,90; 3,78)	0,0928
SME	174 (78,03)	27 (65,85)		
Fórmula ou Misto	49 (21,97)	14 (34,15)		
Classificação				0,7387
AIG	178 (79,82)	35 (85,37)		
GIG	19 (8,52)	3 (7,32)		
PIG	26 (11,66)	3 (7,32)		
Peso (g)	3155,62±525,18	3009,07±562,07		0,1055
Z-escore Peso	-0,12±1,04	0,01±1,04		0,4631
Comprimento (cm)	48,32±2,53	47,84±2,82		0,2739
Z-escore Comprimento	-0,42±1,22	-0,23±1,12		0,3582
Perímetro Cefálico (PC)	34,46±1,96	34,11±1,82		0,2935
Z-escore PC	0,42±1,50	0,51±1,28		0,7367
IMC (kg/m²)	13,46±1,81	13,03±1,54		0,1543
Z-escore IMC	0,06±1,18	-0,11±1,01		0,3859
Apgar 1 minuto	8,00±1,00	8,00±1,00		0,8325
Apgar 5 minutos	9,00±0,00	9,00±0,00		0,2192
Tempo de Internação	3,42±2,06	5,37±5,99		0,0872
17OH-Progesterona (ng/mL)	5,67±3,93	8,60±9,50		0,0334

* Valores expressos em frequência (%) ou média ± desvio padrão ou mediana ± intervalo interquartil
p-valor calculado pelo teste de Qui-quadrado ou exato de Fisher ou t-Student ou não paramétrico de Mann-Whitney

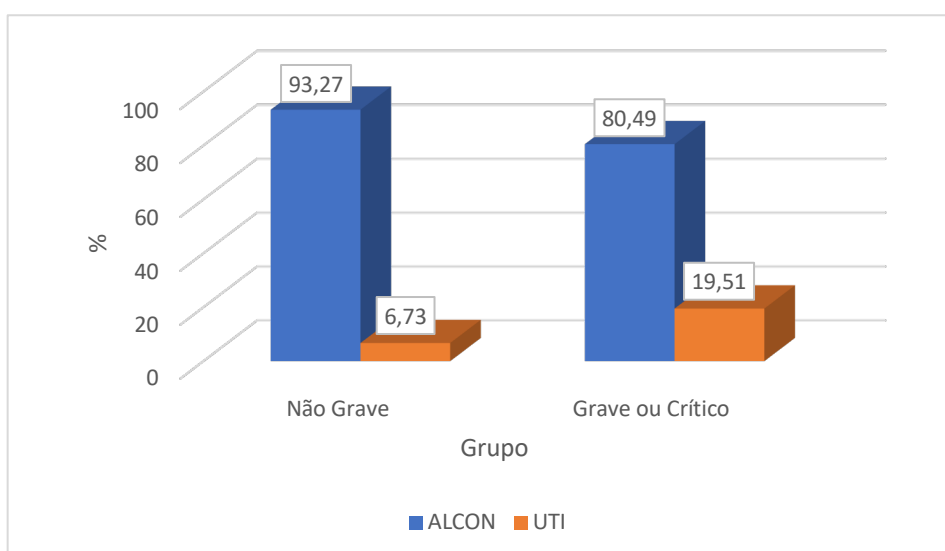
Nesta proposta de análise ficou evidente a associação entre mulheres que apresentaram quadros graves e críticos na gestação com o nascimento de crianças prematuras (p = 0,0159). A **Figura 24** dá destaque a este achado.

Figura 24: Proporção de recém-nascidos termo e pré-termo de acordo com a gravidade materna durante a COVID-19.



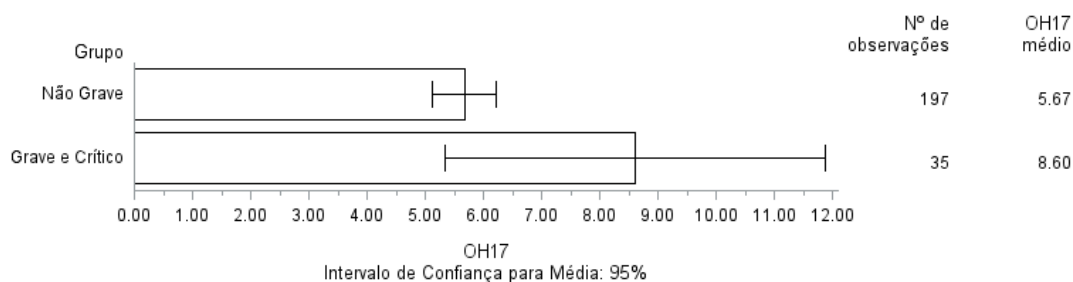
Outro ponto relevante que a análise por gravidade nos trouxe foi a necessidade de internação em unidades de terapia intensiva neonatal (UTIN). Os recém-nascidos de mulheres graves e críticas apresentaram quadros mais graves e maior necessidade de internação em UTIN ($p = 0,0140$). A **Figura 25** realça este dado.

Figura 25: Proporção de recém-nascidos com indicação de internação em UTI de acordo com a gravidade materna durante a COVID-19.



O valor médio de 17OH-Progesterona diferiu significativamente entre os grupos ($p = 0,0334$), no sentido de que aqueles do grupo grave ou crítico apresentam valores médios significativamente maiores daquelas do grupo não grave. A **Figura 26** destaca esse achado.

Figura 26: Variação dos valores médios de 17OH-Progesterona (ng/mL) do recém-nascido de acordo com a gravidade materna durante a COVID-19.



Para as demais variáveis não houve associação ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4.7. Análise longitudinal de dados antropométricos dos recém-nascidos

As avaliações longitudinais dos Z-escores das medidas antropométricas dos lactentes do nascimento até completarem 12 meses de idade também foram analisadas sob as perspectivas do trimestre de infecção como apresentado na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Comparações entre grupos para as variáveis Z-escore peso, Z-escore comprimento, Z-escore perímetro cefálico e Z-escore IMC de acordo com o trimestre de infecção materna

Variáveis	1º Trimestre	Grupo* 2º Trimestre	3º Trimestre	p-valor Interação grupo e tempo	1º x 2º	p-valor# 1º x 3º	2º x 3º
Z-escore				0,0152			
Peso							
Nascimento	-0,21 ± 0,14	-0,05 ± 0,11	-0,09 ± 0,10		-	-	-
Mudança ao 1º mês	-0,12 ± 0,13	-0,62 ± 0,11 ^c	-0,60 ± 0,08 ^c		0,0081	0,0054	1,0000
Mudança ao 6º mês	-0,22 ± 0,16	-0,13 ± 0,12	-0,03 ± 0,09		1,0000	0,8955	1,0000
Mudança ao 12º mês	-0,22 ± 0,19	-0,09 ± 0,13	0,09 ± 0,10		1,0000	0,4329	0,7509
Z-escore				0,2622			
Comprimento							
Nascimento	-0,49 ± 0,18	-0,43 ± 0,14	-0,32 ± 0,10				
Mudança ao 1º mês	0,15 ± 0,12	-0,17 ± 0,10	-0,20 ± 0,08 ^a				
Mudança ao 6º mês	-0,06 ± 0,14	0,01 ± 0,12	-0,10 ± 0,09				
Mudança ao 12º mês	0,10 ± 0,19	0,27 ± 0,12 ^a	0,10 ± 0,09				
Z-escore				0,3058			
Perímetro Cefálico							
Nascimento	0,22 ± 0,14	0,54 ± 0,23	0,43 ± 0,10				
Mudança ao 1º mês	-0,34 ± 0,13 ^b	-0,40 ± 0,11 ^c	-0,49 ± 0,07 ^c				
Mudança ao 6º mês	-0,19 ± 0,14	-0,31 ± 0,12 ^b	-0,49 ± 0,09 ^c				
Mudança ao 12º mês	-0,12 ± 0,18	-0,13 ± 0,12	-0,08 ± 0,09				
Z-escore				0,2993			
IMC							
Nascimento	0,11 ± 0,14	0,16 ± 0,15	-0,07 ± 0,10				
Mudança ao 1º mês	-0,29 ± 0,13 ^a	-0,42 ± 0,11 ^c	-0,28 ± 0,09 ^b				
Mudança ao 6º mês	-0,06 ± 0,16	0,08 ± 0,13	0,30 ± 0,10 ^b				
Mudança ao 12º mês	-0,27 ± 0,22	-0,19 ± 0,14	0,25 ± 0,11 ^a				

* Valores expressos em média ± erro padrão

valores para comparação entre grupos das mudanças no tempo de seguimento em relação ao basal foram calculadas com o uso de modelos de efeitos mistos com estrutura de covariância autorregressiva de 1ª ordem e foram reportadas quando o p-valor foi menor que 0,05 na interação entre grupo e tempo.

A P<0,05 para comparação dos valores médios no tempo seguimento com o valor médio no nascimento dentro do grupo foi calculado usando-se um modelo de efeitos mistos com estrutura de covariância autorregressiva de 1ª ordem.

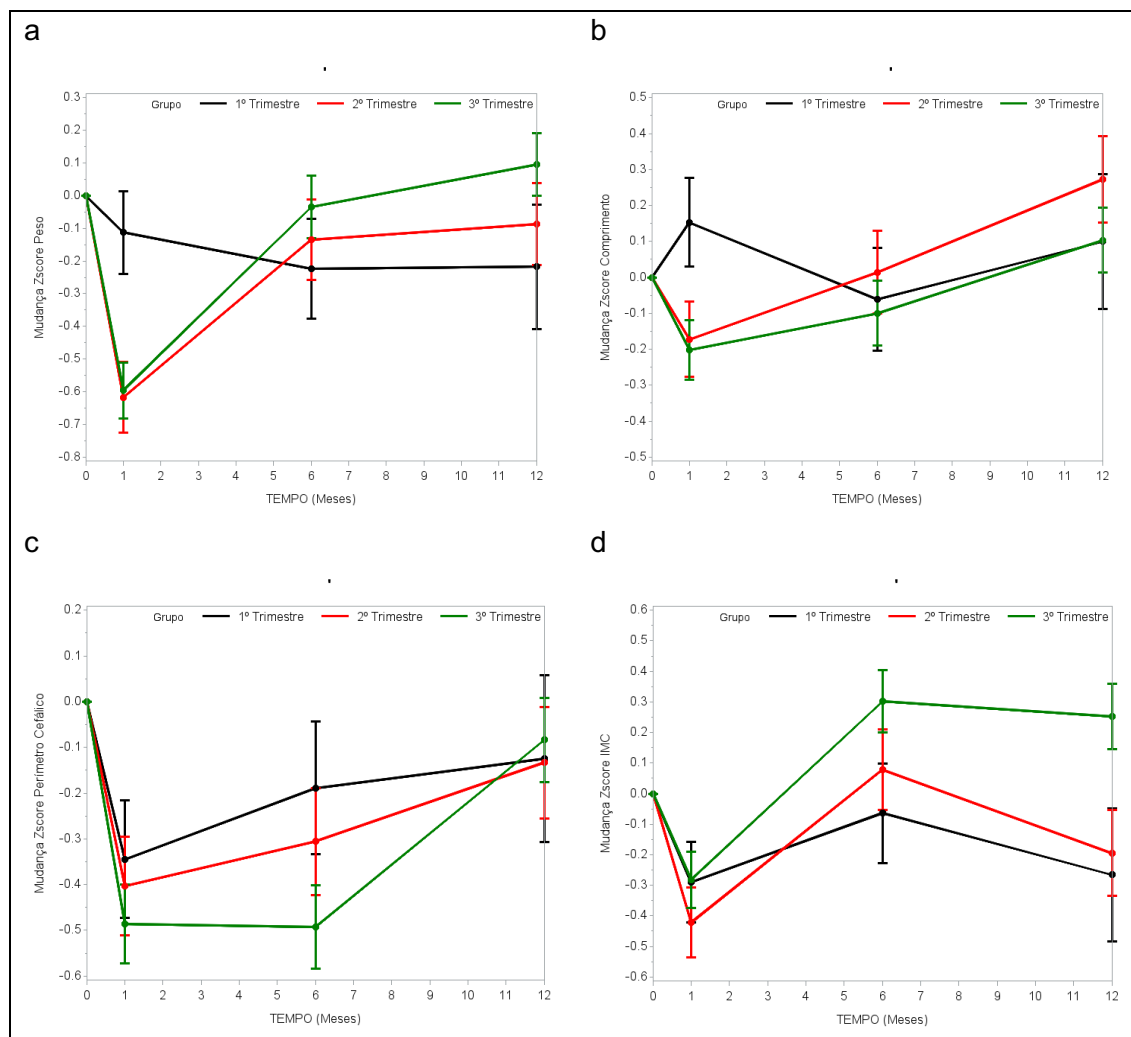
B P<0,01 para comparação dos valores médios no tempo seguimento com o valor médio no nascimento dentro do grupo foi calculado usando-se um modelo de efeitos mistos com estrutura de covariância autorregressiva de 1ª ordem.

C P<0,001 para comparação dos valores médios no tempo seguimento com o valor médio no nascimento dentro do grupo foi calculado usando-se um modelo de efeitos mistos com estrutura de covariância autorregressiva de 1ª ordem.

Na análise relacionada ao trimestre de infecção, o comportamento dos valores médios de Z-escore do peso diferiu significativamente entre os grupos ao longo do período de acompanhamento em relação ao nascimento ($p=0,0152$). Os valores médios de Z-escore do peso apresentou uma queda mais significativa no primeiro mês de acompanhamento em relação ao nascimento no grupo 2º trimestre e no grupo 3º trimestre do que no grupo 1º trimestre ($p = 0,0081$ e $p = 0,0054$, respectivamente). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos 1º e 2º trimestres e entre os grupos 1º e 3º trimestres para as mudanças em relação ao nascimento no sexto e no décimo segundo mês. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos 2º e 3º trimestres para as mudanças em relação ao nascimento no primeiro, sexto e no décimo segundo mês.

O comportamento dos valores médios de Z-escore de comprimento, perímetro cefálico e IMC não diferiram significativamente entre os grupos ao longo do período de acompanhamento em relação ao nascimento ($p = 0,2652$), ($p = 0,3058$), ($p = 0,2993$) respectivamente.

Figura 27: Variação do Z-escore médio de (a) peso, (b) comprimento, (c) perímetro cefálico e (d) IMC ao longo de 12 meses de acordo com o trimestre de infecção materna.



Nas análises intragrupos, os valores médios de Z-escore do peso no grupo 1º trimestre não apresentou tendência de queda significativa ao longo do período de acompanhamento em relação ao nascimento. Nos grupos 2º e 3º trimestres apresentaram uma queda significativa no primeiro mês de acompanhamento em relação ao nascimento ($p < 0,001$) e não apresentou alterações significativas no sexto e no décimo segundo mês em relação ao nascimento. (**Figura 27 a**)

Os valores médios de Z-escore do comprimento no grupo 1º trimestre não apresentaram alterações significativas ao longo do período de acompanhamento em relação ao nascimento. O grupo 2º trimestre não apresentou alterações significativas no primeiro e sexto mês e um aumento significativo no décimo segundo mês de acompanhamento em relação ao nascimento ($p < 0,05$). O grupo 3º trimestre apresentou uma queda significativa no 1 mês de acompanhamento em relação ao nascimento ($p <$

0,05) e não apresentou alterações significativas no sexto e no décimo segundo mês em relação ao basal (**Figura 27 b**).

Os valores médios de Z-score do perímetro cefálico no grupo 1º trimestre apresentaram uma queda significativa no primeiro mês de acompanhamento em relação ao nascimento ($p < 0,01$) e não apresentou alterações significativas no sexto e no décimo segundo mês em relação ao nascimento. No grupo 2º trimestre observou-se uma queda significativa no primeiro e sexto mês ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) e não apresentou alteração significativa no décimo segundo mês em relação ao basal. No grupo 3º trimestre observou-se uma queda significativa no primeiro e sexto mês ($p < 0,001$ em ambos) e não apresentou alteração significativa no décimo segundo mês em relação ao basal (**Figura 27 c**).

Os valores médios de Z-score do IMC no grupo 1º trimestre apresentou uma queda significativa no primeiro mês de acompanhamento em relação ao nascimento ($p < 0,05$) e não apresentou alterações significativas no sexto e no décimo segundo mês em relação ao nascimento. O grupo 2º trimestre apresentou uma queda significativa no primeiro mês ($p < 0,001$) e não apresentou alterações significativas no sexto e décimo segundo mês em relação ao nascimento. O grupo 3º trimestre apresentou uma queda significativa no primeiro mês ($p < 0,01$) e um aumento significativa no sexto e no décimo segundo mês em relação ao nascimento ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) (**Figura 27 d**).

Tabela 6 – Comparações entre grupos para as variáveis Z-Escore peso, Z-Escore comprimento, Z-Escore perímetro cefálico e Z-Escore IMC de acordo com a gravidade da infecção materna.

Variáveis	Grupo*		p-valor Interação entre grupo e tempo	p-valor# G x NG
	Grave ou Crítico (G)	Não Grave (NG)		
Z-Escore Peso			0,0026	
Nascimento	0,01 ± 0,16	-0,11 ± 0,07		-
Mudança ao 1º mês	-0,84 ± 0,15 ^c	-0,43 ± 0,07 ^c		0,0148
Mudança ao 6º mês	-0,10 ± 0,17	-0,09 ± 0,07		0,9686
Mudança ao 12º mês	0,38 ± 0,19 ^a	-0,07 ± 0,08		0,0296
Z-Escore Comprimento			0,3602	
Nascimento	-0,23 ± 0,17 ^a	-0,41 ± 0,08		
Mudança ao 1º mês	-0,32 ± 0,14	-0,09 ± 0,06		
Mudança ao 6º mês	-0,26 ± 0,16	-0,03 ± 0,07		
Mudança ao 12º mês	0,30 ± 0,18	0,12 ± 0,07		
Z-Escore PC			0,1647	
Nascimento	0,51 ± 0,20	0,43 ± 0,10		
Mudança ao 1º mês	-0,63 ± 0,15 ^c	-0,41 ± 0,06 ^c		
Mudança ao 6º mês	-0,53 ± 0,16 ^b	-0,36 ± 0,07 ^c		
Mudança ao 12º mês	0,12 ± 0,18	-0,16 ± 0,08 ^a		
Z-Escore IMC			0,0053	
Nascimento	-0,11 ± 0,16	0,06 ± 0,08		-
Mudança ao 1º mês	-0,56 ± 0,16 ^c	-0,25 ± 0,07 ^c		0,0826
Mudança ao 6º mês	0,41 ± 0,18 ^a	0,14 ± 0,08		0,1751
Mudança ao 12º mês	0,46 ± 0,20 ^a	-0,02 ± 0,08		0,0289

* Valores expressos em média ± erro padrão

valores para comparação entre grupos das mudanças no tempo de seguimento em relação ao nascimento foram calculadas com o uso de modelos de efeitos mistos com estrutura de covariância autorregressiva de 1ª ordem e foram reportadas quando o p-valor foi menor que 0,05 na interação entre grupo e tempo.

A P<0.05 para comparação dos valores médios no tempo seguimento com o valor médio no nascimento dentro do grupo foi calculado usando-se um modelo de efeitos mistos com estrutura de covariância autorregressiva de 1ª ordem.

B P<0.01 para comparação dos valores médios no tempo seguimento com o valor médio no nascimento dentro do grupo foi calculado usando-se um modelo de efeitos mistos com estrutura de covariância autorregressiva de 1ª ordem.

C P<0.001 para comparação dos valores médios no tempo seguimento com o valor médio no nascimento dentro do grupo foi calculado usando-se um modelo de efeitos mistos com estrutura de covariância autorregressiva de 1ª ordem.

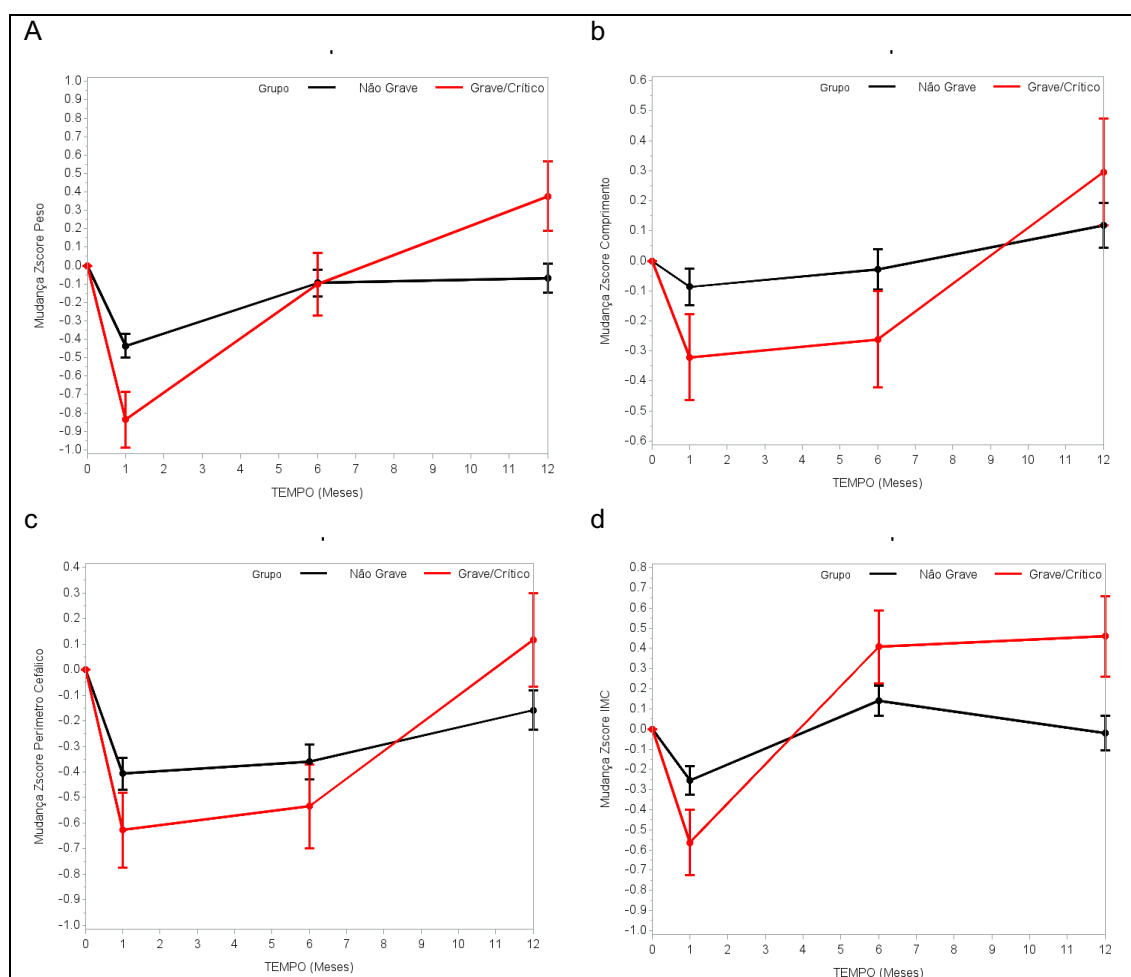
Os valores médios de Z-escore de peso diferiu significativamente entre os grupos ao longo do período de acompanhamento em relação ao nascimento ($p = 0,0026$). Além disso, o valor médio de Z-escore de peso apresentou uma queda mais significativa no primeiro mês de acompanhamento em relação ao nascimento no grupo grave/crítico que no grupo não grave ($p = 0,0148$). No décimo segundo mês o valor médio do Z-escore do peso foi significativamente maior em relação ao basal, no grupo grave e crítico do que no grupo não grave ($p = 0,0296$).

Os valores médios de Z-Escore do IMC também diferiu significativamente entre os grupos ao longo do período de acompanhamento em relação ao nascimento ($p = 0,0053$). Os valores médios de Z-Escore do IMC no primeiro e sexto meses de

acompanhamento em relação ao nascimento não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,0826$ e $p = 0,1751$, respectivamente). Por outro lado, no décimo segundo mês o valor médio do Z-Escore do IMC foi significativamente maior em relação ao basal, no grupo grave e crítico do que no grupo não grave ($p = 0,0289$).

O comportamento dos valores médios de Z-Escore do comprimento e perímetro cefálico não diferiram significativamente entre os grupos ao longo do período de acompanhamento em relação ao nascimento.

Figura 28- Variação do Z-escore médio de (a) peso, (b) comprimento, (c) perímetro cefálico e (d) IMC ao longo de 12 meses de acordo com a gravidade materna durante a COVID-19.



Nas avaliações intragrupos, o valor médio de Z-escore de peso no grupo grave ou crítico apresentou uma queda significativa no primeiro mês de acompanhamento em relação ao nascimento ($p < 0,001$). Não apresentou alteração significativa no sexto mês em relação ao nascimento. Já no décimo segundo mês houve aumento significativo em relação ao nascimento ($p < 0,05$). Em relação ao grupo não grave, o valor médio de Z-escore do peso no grupo apresentou uma queda significativa no primeiro mês de

acompanhamento em relação ao nascimento ($p < 0,001$) e não apresentou alterações significativas no sexto e no décimo mês em relação ao basal (**Figura 28 a**).

O valor médio de *Z-score* de estatura no grupo grave ou crítico apresentou uma queda significativa no primeiro mês de acompanhamento em relação ao nascimento ($p < 0,05$) e não apresentou alterações significativas no sexto e no décimo mês em relação ao basal. No grupo não grave não sofreram alterações significativas ao longo do período de acompanhamento (**Figura 28 b**).

Os valores médios de *Z-score* do perímetro cefálico no grupo grave ou crítico apresentaram uma queda significativa tanto no primeiro quanto no sexto mês de acompanhamento em relação ao nascimento ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) e não sofreu alteração significativa no décimo segundo mês em relação ao nascimento. No grupo não grave houve uma queda significativa no primeiro, no sexto mês e no décimo segundo mês de acompanhamento em relação ao nascimento ($p < 0,001$, $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) (**Figura 28 c**).

O valor médio de *Z-score* do IMC no grupo grave ou crítico apresentou uma queda significativa no primeiro mês de acompanhamento em relação ao nascimento ($p < 0,001$) e um aumento significativo no sexto e no décimo mês de acompanhamento em relação ao basal ($p < 0,05$ em ambos). No grupo não grave houve uma queda significativa no primeiro mês de acompanhamento em relação ao basal ($p < 0,001$) e não apresentou alterações significativas no sexto e no décimo mês de acompanhamento em relação ao basal.

As **Tabela 7 e Tabela 8** resumem, respectivamente, a evolução antropométrica inter e intragrupos ao longo do primeiro ano de vida dos lactentes, de acordo com a gravidade da COVID materna e com o trimestre gestacional em que ocorreu a COVID materna.

Tabela 7 – Resumo da comparação intergrupos da evolução antropométrica ao longo do primeiro ano de vida, de acordo com a gravidade da COVID materna e o trimestre gestacional em que ocorreu a infecção.

	Categoria de agrupamento	
	Gravidade da COVID materna	Trimestre gestacional de infecção pelo SARS-CoV-1
Peso	Grupo grave: menor ganho no 1º mês e maior ganho no 12º mês	Grupos 2º T e 3º T ganharam menos peso que o grupo 1º T no 1º mês. Sem alteração entre os grupos nos demais meses
Comprimento	Sem diferença nos ganhos entre os grupos	Sem diferenças entre os grupos
Perímetro cefálico	Sem diferença nos ganhos entre os grupos	Sem diferenças entre os grupos
IMC	Grupo grave: maior no 12º mês	Sem diferenças entre os grupos

Tabela 8 – Resumo da comparação intragrupos da evolução antropométrica ao longo do primeiro ano de vida, de acordo com a gravidade da COVID materna e com o trimestre gestacional em que ocorreu a infecção.

	Categoria de agrupamento	
	Gravidade da COVID materna	Trimestre gestacional de infecção pelo SARS-CoV-1
Peso	Grupo grave: menor ganho no 1º mês e maior ganho no 12º mês Grupo não grave: menor ganho no 1º mês	Grupos 2º T e 3º T: menor ganho de peso no 1º mês de vida
Comprimento	Grupo grave: menor ganho no 1º mês Grupo não grave: sem alterações	Grupo 2º T: maior ganho no 12º mês Grupo 3º T: queda no ganho no 1º mês
Perímetro cefálico	Grupo grave: menor ganho no 1º e 6º meses Grupo não grave: menor ganho no 1º, 6º e 12º meses	Grupo 1º T: queda no 1º mês Grupos 2º T e 3º T: queda no 1º e 6º meses
IMC	Grupo grave: menor ganho no 1º mês e maior ganho no 6º e 12º meses Grupo não grave: menor ganho no 1º mês	Grupos 1º, 2º e 3º T: queda no 1º mês Grupo 3º T: aumento no 6º e 12º meses

5. DISCUSSÃO

A gravidez desencadeia um estado imunológico único a fim de garantir o adequado desenvolvimento fetal até o nascimento. Vários estudos relatam que o sistema imunológico desempenha um papel de equilíbrio durante a gravidez com mudanças constantes de acordo com dinâmica das demandas maternas e fetais (100,101). Alterações fisiológicas no estado imunológico ao longo da gravidez são frequentemente caracterizadas pela progressão de diferentes perfis de imunidade mediada por células e respostas humorais do 1º ao 3º trimestre.

As gestantes são particularmente susceptíveis à COVID-19 devido a variações fisiológicas nas concentrações dos distintos componentes do sistema imunológico e que podem resultar em uma resposta alterada à infecção por SARS-CoV-2. Além disso, a infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez pode interromper a homeostase da resposta imune e afetar o desfecho da gravidez (61,102). Já foi relatado que os impactos adversos da pandemia de COVID-19 na saúde materna não se limitaram à morbimortalidade causada pela própria doença, mas também associaram-se a desfechos adversos da gravidez, incluindo pré-eclâmpsia, parto prematuro e natimorto (102).

A infecção pelo SARS-CoV-2 induz disfunção do endotélio pulmonar e isso representa um importante fator de risco para fenótipos maternos de pré-eclâmpsia quando a infecção ocorre durante a gravidez. A pré-eclâmpsia tem mecanismos patológicos parecidos com a COVID-19, como por exemplo a isquemia placentária e a má perfusão intraplacentária, o que resulta em uma placenta hipóxica que secreta citocinas inflamatórias, as quais, em última análise, causam destruição endotelial. No geral, parece que tanto a pré-eclâmpsia quanto a COVID-19 podem causar um desequilíbrio imunológico, que por sua vez ativa vias inflamatórias sistêmicas associadas à ativação do sistema renina-angiotensina.(103) De acordo com um estudo espanhol observacional prospectivo, gestantes com infecções graves por SARS-CoV-2 podem desenvolver uma síndrome semelhante à pré-eclâmpsia. (104) Da mesma forma, um estudo de coorte multinacional relatou um risco maior de desenvolver fenótipo de pré-eclâmpsia em gestantes infectadas pelo SARS-CoV-2. (105) Já um estudo multicêntrico nacional brasileiro (iniciativa REBRACO) indicou que a frequência de pré-eclâmpsia era alta entre as participantes, mas não variou significativamente entre mulheres com e sem casos confirmados de COVID-19. (106)

Em relação ao parto prematuro e natimortos existem muitos estudos que mostram que a infecção pelo SARS-CoV-2 está associada a uma maior prevalência destes

desfechos.(103) O nosso estudo mostrou uma prevalência maior de partos prematuros em gestantes infectadas no 3º trimestre da gestação e naquelas que apresentaram quadros graves ou críticos.

No estudo COVID-NET realizado em 13 estados dos Estados Unidos, de março a agosto de 2020, encontrou-se uma prevalência de 12,6% de partos prematuros em gestantes que tiveram COVID-19 e de 10% nas gestantes não infectadas. Nesse mesmo estudo a prevalência de partos prematuros em mulheres sintomáticas foi de 23,6%.(107)

Dados coletados do sistema de saúde britânico entre maio de 2020 e janeiro de 2021 revelaram que das 342.080 mulheres que deram à luz naquele período, 3.527 apresentaram COVID-19 durante a gestação. No grupo de mulheres infectadas houve maior prevalência de parto prematuro (razão de probabilidade 2,17; intervalo de confiança 95%, intervalo 1,96-2,42; $p < 0,001$) e de morte fetal (razão de probabilidade 2,21; intervalo de confiança 95%, intervalo 1,58-3,11; $p < 0,001$). (108)

O estudo de Dumitriu *et al* comparou recém-nascidos de mulheres infectadas por SARS-CoV-2 na cidade de Nova Iorque (Estados Unidos) que desenvolveram quadro clínico grave ou crítico com aquelas com quadros clínicos não-graves. Este estudo demonstrou que no grupo de pacientes graves e críticas havia adiantamento do parto em uma semana quando comparadas às não-graves. Esse achado corrobora os dados encontrados em nosso estudo (109).

Já Hughes *et al* fizeram uma coorte retrospectiva que analisou desfechos obstétricos e neonatais em gestantes infectadas pelo SARS-CoV-2 com idade gestacional menor que 28 semanas e mostraram que houve um discreto aumento de desfechos adversos. Esse estudo envolveu uma população de 2.326 gestantes infectadas antes de 28 semanas de idade gestacional e um grupo controle de 11.705 gestantes não-infectadas. As análises mostraram que o grupo apresentou infecção pelo SARS-CoV-2 antes de 28 semanas de gestação teve um risco subsequente aumentado de morte fetal ou neonatal (2,9% x 1,5%; RR 1,97; IC95%= 1,01–3,85), parto prematuro tardio (menor que 37 semanas e maior que 34 semanas de idade gestacional) [19,6% x 13,8%; RR = 1,29; IC95% = 1,02–1,63]. Não houve diferença nas taxas de nascimento prematuro antes de 34 semanas de gestação, de qualquer malformação congênita importante ou do tamanho do recém-nascido para idade gestacional. Além disso, não houve diferença significativa na taxa de hipertensão gestacional geral ou pré-eclâmpsia com características graves (110).

A recente metanálise e revisão sistemática de Simbar *et al* corrobora os achados desses estudos do início da pandemia. Na publicação foram analisados 79 estudos que

mostraram uma prevalência maior de partos prematuros em gestantes que tiveram diagnósticos de COVID-19. (111)

Muitos estudos têm revelado que uma porcentagem significativa de gravidezes é interrompida prematuramente por cesariana nas mulheres infectadas pelo SARS-CoV-2. Esta situação está relacionada à maior gravidade e riscos de complicações com o recém-nascido.(112) Entretanto, são necessários novos estudos que analisem as indicações dessas cesarianas.

A maioria das informações sobre o impacto da infecção por SARS-CoV-2 na gravidez foi derivada de série de casos sobre infecção sintomática aguda (113). No entanto, poucos dados estão disponíveis sobre o impacto a longo prazo da infecção por SARS-CoV-2 na gravidez durante a fase convalescente da doença e as particularidades de cada trimestre da gestação.

Em vista disso, a primeira fase deste estudo foi desenvolvida como uma investigação exploratória pioneira para realizar uma análise descritiva e panorâmica da interação de mediadores solúveis séricos em gestantes durante a fase convalescente da infecção por SARS-CoV-2 durante o pré-natal. Este estudo compreendeu uma investigação inovadora do impacto duradouro da infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez, com foco na análise da resposta imune durante a fase convalescente, compreendendo 3 a 20 semanas após o início dos sintomas.

Os resultados demonstram que, em geral, os mediadores inflamatórios solúveis séricos têm diferentes trajetórias durante a gravidez saudável e que estas trajetórias são perturbadas em mulheres grávidas com infecção convalescente por SARS-CoV-2.

Neste estudo, gestantes saudáveis apresentaram diminuição progressiva da concentração da maioria dos mediadores inflamatórios séricos solúveis em direção ao 2º e 3º trimestre de gestação, incluindo quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas regulatórias e fatores de crescimento. Estudos anteriores corroboram nossos achados em gestações saudáveis. Os níveis de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias geralmente atingem o pico no primeiro trimestre da gravidez e diminuem no 2º e 3º trimestres, enquanto as citocinas regulatórias e os fatores de crescimento têm trajetórias diversas (114,115).

Os achados deste estudo destacaram que níveis mais altos da maioria dos mediadores inflamatórios solúveis foram observados no grupo COVID em comparação ao GC. O maior aumento ocorreu nas citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6, TNF- α e IFN- γ e um conjunto maior de biomarcadores com razões COVID/GC elevadas observadas no 2º (aumento de três vezes) e 3º (aumento de três a quinze vezes) trimestres de gravidez.

Estudos de mediadores imunológicos na infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez permanecem escassos. Foi proposto que a imunomodulação observada durante a gravidez pudesse proteger pacientes grávidas com COVID-19 de sofrer uma tempestade de citocinas (101,116). No entanto, nenhum estudo com foco na análise comparativa de perfis imunológicos de COVID-19 e mulheres grávidas saudáveis em trimestres de gravidez correspondentes foi relatado. Vale ressaltar que, devido às alterações fisiológicas na resposta imune durante a gravidez, a inclusão de controles saudáveis com compatibilidade trimestral é essencial para permitir análises conclusivas. Portanto, este estudo é pioneiro em fornecer um perfil detalhado de mudanças duradouras durante a infecção convalescente por COVID-19 na gravidez, pois fez uma comparação direta com controles saudáveis pareados por trimestre gestacional. Nossos achados não sustentam a hipótese de que um perfil imunomodulador seja desencadeado pela infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez.

De fato, os níveis mais baixos de mediadores inflamatórios solúveis relatados anteriormente em gestantes convalescentes de COVID-19 foram comparados aos observados em não gestantes e não consideraram as alterações fisiológicas desencadeadas pela gravidez ou alterações nos mediadores inflamatórios solúveis inerentes aos trimestres (116). Além disso, outros estudos propondo o estado imunomodulador para infecção aguda por COVID-19 durante a gravidez em comparação com gestantes saudáveis não consideraram a estratificação por trimestres gestacionais (101). De acordo com os achados deste estudo, foram observados níveis mais altos de mediadores inflamatórios solúveis séricos para infecção convalescente por COVID-19 durante a gravidez, especialmente IL-6, TNF- α e IFN- γ em comparação com mulheres grávidas saudáveis em trimestres de gravidez correspondentes.

A gravidez bem-sucedida requer uma comunicação finamente coordenada entre os microambientes materno e fetal. As vias de sinalização de citocinas participam como mediadores dessas comunicações para garantir uma gravidez saudável. A partir dos dados existentes disponíveis, não há uma tendência consensual para as alterações observadas para IL-6, TNF- α e IFN- γ durante a gravidez (100). Vários estudos demonstraram que as concentrações de IL-6, TNF- α e IFN- γ aumentaram significativamente entre o 1º, 2º e 3º trimestres de gravidez saudável (117–122). No entanto, corroborando os achados deste estudo, outros autores detectaram reduções significativas de IL-6, TNF- α e IFN- γ nas concentrações séricas maternas entre o 1º e o 3º trimestres (114,123,124).

Infecções ou condições inflamatórias, como a COVID-19 durante a gravidez, podem ter um impacto negativo no desenvolvimento fetal e também contribuir para

condições patológicas associadas à gravidez (42). Apesar dos dados conflitantes sobre o perfil geral de IL-6, TNF- α e IFN- γ durante a gravidez saudável, há um consenso de que o estabelecimento de um microambiente pró-inflamatório está associado ao risco de desenvolvimento de condições patológicas associadas à gravidez, incluindo perda gestacional, pré-eclâmpsia e diabetes mellitus gestacional (125). Nesse sentido, a regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias em mulheres grávidas com COVID-19 convalescente pode sugerir que essas pacientes são mais vulneráveis a desenvolver resultados adversos na gravidez.

A análise de rede integrativa demonstrou que tanto as gestações do GC quanto as convalescentes com COVID-19 evoluem com conectividade decrescente entre os mediadores solúveis séricos no terceiro trimestre. No entanto, o grupo COVID exibiu um número notavelmente menor de conexões. No geral, IL-1Ra, IL-10 e GM-CSF apresentaram um número preservado de correlações ao longo da gravidez.

Mais pesquisas são necessárias para determinar o perfil preciso de IL-10 durante a gravidez saudável (100). Alguns estudos relataram que a IL-10 aumenta significativamente do 1º para o 2º e 3º trimestres na gravidez saudável (122,126). No entanto, corroborando nossos achados, outros estudos detectaram que a IL-10 diminuiu entre o 1º e 3º trimestres (127,128). Considerando o papel crítico da IL-10 como principal citocina anti-inflamatória, o eixo de conectividade preservado da IL-10 observado durante o 1º e 2º trimestres pode representar um mecanismo para proteger o feto da rejeição pró-inflamatória materna e garantir o desenvolvimento fetal até o nascimento.

Nossos dados demonstraram que o IL-1Ra diminuiu em mulheres grávidas convalescentes com COVID-19 no 1º trimestre, mas aumentou no 3º trimestre. Estudos anteriores relataram que os níveis de IL-1Ra aumentaram durante a resposta inflamatória para controlar a inflamação aguda e prevenir eventos imunopatológicos (129). O antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) é uma citocina anti-inflamatória que bloqueia as funções de IL-1 α e IL-1 β e modula seus efeitos biológicos (130). Foi previamente demonstrado em modelos experimentais que altos níveis de IL-1Ra no início da gravidez podem levar ao aborto espontâneo devido à adesão embrionária prejudicada (129) e dados de estudos em humanos mostraram que níveis mais altos de IL-1Ra circulante foram relatados em resultados adversos da gravidez, incluindo pré-eclâmpsia (131). Em relação às mudanças nos níveis de IL-1Ra observadas no grupo COVID convalescente ao longo dos trimestres da gravidez, nossos achados de perfil de correlação preservado entre IL-1Ra e outros mediadores solúveis ao longo da gravidez podem sugerir que um intrincado microambiente de mediadores solúveis é relevante para garantir a sobrevivência e o desenvolvimento fetal até o nascimento.

Nossos dados também demonstraram que os níveis de GM-CSF apresentaram correlação preservada com outros mediadores solúveis ao longo da gestação. Foi relatado anteriormente que, após a implantação do embrião, o GM-CSF participa de uma rede de citocinas e fatores de crescimento que regulam o desenvolvimento morfológico e funcional da placenta (132).

Por outro lado, apesar dos aumentos de IL-17, FGF-basic e VEGF, foi observada perda de conectividade durante a gravidez. A IL-17 regula positivamente a expressão de uma variedade de moléculas biológicas com propriedades angiogênicas, incluindo VEGF (133–137). O VEGF desempenha um papel central na vasculogênese e angiogênese, o que aumenta a proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais vasculares. Além disso, dados de estudos anteriores mostraram que a IL-17 pode induzir estresse oxidativo placentário e disfunção vascular, resultando em hipertensão e aumento do risco de pré-eclâmpsia (138). A perda da conexão da rede de IL-17 e VEGF com outros mediadores solúveis ao longo da gravidez pode levar à disfunção vascular intrínseca que resulta em comprometimento do desenvolvimento neonatal. Estudos de acompanhamento pós-natal podem contribuir para identificar crescimento e desenvolvimento do recém-nascido prejudicados relacionados à angiogênese alterada.

Nossos dados também demonstraram que IL-6 e CXCL8 foram incluídos no conjunto de atributos que adquiriram forte correlação no 3º trimestre de gravidez, denominados correlações seletivas de COVID. Implicações de IL-6 e CXCL8 em condições patológicas associadas à gravidez, como perda da gravidez, pré-eclâmpsia, diabetes mellitus gestacional e infecção/inflamação foram relatadas (125). Esses dois mediadores solúveis são abundantemente produzidos na interface feto-maternal durante a gravidez e demonstraram participar de vários eventos relacionados à gravidez. A expressão/secreção desequilibrada de IL-6 e CXCL8 na interface feto - materna tem sido indicada na perda gestacional inexplicável (125). Um estudo das conexões dinâmicas da rede de mediadores solúveis na pré-eclâmpsia identificou correlação positiva entre IL-6 e CXCL8, sugerindo que essas moléculas estão implicadas na fisiopatologia dessa doença associada à gravidez (65,125). Além disso, uma metanálise e uma revisão sistemática sugeriram um papel do CXCL8 na formação do microambiente imunológico no diabetes mellitus gestacional (139).

Na segunda fase deste estudo, um grupo de recém-nascidos foi analisado de acordo com o período de infecção materna durante a gestação. Foi realizada a mesma divisão de grupos por trimestre de gestação da primeira fase do estudo

Um dos desfechos clínicos encontrados que chamou a atenção nesta segunda fase foi o grau de gravidade clínica materna em relação à infecção pelo SARS-CoV-2

durante a gestação. Os nossos achados indicam que as mulheres infectadas no último trimestre de gestação apresentaram maior prevalência de quadros graves ou críticos em relação aos demais trimestres. Estes desfechos podem justificar os achados da primeira fase do estudo que mostraram mulheres convalescentes no 3º trimestre da gestação com um quadro hiper inflamatório. Como foi descrito, no 3º trimestre de gestação houve maior aumento nas citocinas pró-inflamatórias e um conjunto maior de biomarcadores com razões COVID/GC elevadas no 3º (aumento de três a 15 vezes) trimestres de gravidez daquela população.

As alterações fisiológicas decorrentes do processo gravídico aumentam a suscetibilidade a diversas condições, principalmente às infecções virais que, quando contraídas, têm maior probabilidade de agravamento nessa população. As gestantes apresentam alterações importantes no trato respiratório causadas pela ação de altas doses de hormônios esteroides, redução da expansão pulmonar e aumento do volume dos líquidos intersticiais principalmente no 3º trimestre de gestação (140).

No início da pandemia de COVID-19, havia preocupações significativas de que o SARS-CoV-2 pudesse ser transmitido verticalmente, como observado nos surtos do vírus Zika (ZIKV) apenas alguns anos antes.(141) As evidências científicas atuais sugerem uma baixa taxa de transmissão vertical pelo SARS-CoV-2. Em estudo realizado logo no início da pandemia por Edlow *et al* com uma coorte de 127 gestantes da cidade de Boston (Estados Unidos), em 2020, nenhuma evidência de infecção placentária ou transmissão vertical definitiva de SARS-CoV-2 foi encontrada nas 64 pacientes que testaram positivo para SARS-CoV-2.(142)

Uma revisão sistemática realizada por Robaina-Castellanos *et al* de 87 estudos de 2020 investigou possíveis relatos de infecção congênita/intraparto/pós-parto por SARS-CoV-2 durante a gravidez. Os investigadores identificaram 53 recém-nascidos notificados que testaram positivo para SARS-CoV-2 nas primeiras 48 horas de vida, mostrando a presença do vírus por testes PCR ou IgM. O momento da infecção correspondeu à transmissão congênita ou intraparto em 39,6% (21 de 53) dos recém-nascidos positivos para COVID-19, e à transmissão pós-parto em 15,1% (8 de 53), com os restantes 45,3% (24 de 53) sendo inespecífico. Os investigadores estimaram que as infecções congênitas ou intraparto ocorrem em apenas 1,8%-8,0% dos recém-nascidos de gestantes com COVID-19 no final da gravidez, levando à conclusão de que tais infecções no feto/recém-nascido são possíveis, mas raras.(143)

Em uma revisão sistemática e metanálise mais recente, Al-Kuraishy *et al* fazem referência a escassez de estudos clínicos que enfocam a infecção por COVID-19 em diferentes trimestres da gravidez. Além disso, afirmam que o risco de transmissão vertical tem sido principalmente especulativo. No entanto, esta revisão também produziu

evidências de que a transmissão vertical do SARS-CoV-2 durante a gravidez é rara, mas possível. (144) O que se traz de novidade neste estudo é a definição de um risco maior ou menor para a possibilidade de transmissão vertical. Dessa forma, nas pacientes que apresentam um processo hiper inflamatório causado por citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias pode haver rompimento nas barreiras placentárias e favorecer a transmissão vertical de infecções por SARS-CoV-2. Consequentemente, o efeito citopático direto da infecção por SARS-CoV-2 e a hiper inflamação associada durante a gravidez podem induzir disfunção placentária e aumentar o risco desse tipo de transmissão.(144–146)

Em nosso estudo não percebemos evidências clínicas de transmissão vertical em recém-nascidos. Não estava na rotina do estudo a realização de testes RT-PCR para a pesquisa do SARS-CoV-2 em nasofaringe de recém-nascidos filhos de mulheres que tiveram COVID-19 na gestação. Mesmo assim alguns testes foram realizados no hospital de referência para acompanhamento de gestantes com COVID no DF (Hospital Regional da Asa Norte – HRAN) para quadros mais graves de COVID-19 na gestação. Nem todos os pacientes que realizaram o teste fizeram o seguimento ambulatorial no estudo PROUDEST e, por consequência, foram excluídos do estudo, mas dados de prontuário revelam que dos 176 recém-nascidos que foram testados no HRAN, 15 (8,5%) apresentaram resultados positivos no RT-PCR coletado nas primeiras 48h de vida. Este achado vai de encontro ao que tem sido observado na literatura como citato anteriormente.

O nosso estudo também corrobora os achados da revisão sistemática e metanálise de Al-Kuraishy *et al* (144) na parte que refere que gestantes infectadas pelo SARS-CoV-2 no 3º trimestre apresentam um estado hiper inflamatório. Os autores da metanálise ainda sugerem que o estado hiper inflamatório da gestante poderia facilitar um raro processo de transmissão vertical. Nossos dados não conseguem confirmar está hipótese. A condição social vivida na pandemia dificultou o seguimento longitudinal de todos os recém-nascidos filhos das mulheres incluídas na primeira fase do estudo.

Em relação a outros desfechos neonatais tem surgido na literatura médica atual vários estudos que tentam contar a história do efeito da infecção gestacional por COVID-19 nos neonatos.

O estudo INTERCOVID (Giuliani *et al*, 2022) analisou uma coorte com 586 recém-nascidos de mulheres infectadas por SARS-CoV-2 e um grupo controle com 1.535 recém-nascidos. Nesse estudo foram incluídas gestantes que se infectaram em qualquer fase da gestação ou estavam infectadas no momento do parto, mas o trimestre de infecção e a gravidade materna não foram levados em consideração. Os achados do INTERCOVID também revelaram evidência do desfecho prematuridade nos casos de

gestantes com COVID-19 ($p < 0.001$) como em outros estudos previamente citados, além de baixo peso ao nascer ($p < 0.001$) (50). O estudo PAN-COVID (Mullins *et al*, 2022) que recrutou 8.239 gestantes para um estudo prospectivo observou, da mesma forma, uma incidência maior de prematuridade em gestantes com COVID-19 (113).

Vários estudos relataram desfechos de curto prazo para neonatos filhos de mães com SARS-CoV-2, incluindo a necessidade de internação em UTIN e suporte respiratório, mas pouco se sabe sobre os fatores específicos associados à infecção neonatal. No entanto, parece existir impacto na saúde neonatal decorrente principalmente pela influência do parto prematuro devido ao agravamento da doença materna. Dessa forma, a prematuridade aumenta o risco de resultados adversos diretos e indiretos à saúde dos neonatos (147–149).

Na recente metanálise e revisão sistemática de Simbar *et al* (2023) a comparação dos resultados em pacientes com ou sem COVID-19 nos estudos analíticos incluídos mostrou uma diferença significativa nos resultados de admissão na UTIN e peso ao nascer (111,150). A comparação dos resultados neonatais nos períodos antes e durante a pandemia de COVID-19 não foi a mesma. Alguns estudos relataram um aumento na mortalidade neonatal, enquanto outros não mostraram nenhuma mudança. (111) Estes dados relacionados ao aumento na taxa de admissão em UTIN expostos na metanálise vão de encontro aos dados encontrados em nosso estudo. Este trabalho mostrou que recém-nascidos de pacientes gestantes graves ou críticas tiveram maior taxa de internação em UTIN.

Em relação à frequência de internação na UTI Neonatal, este estudo aponta prevalência de 7% de internações entre os casos não graves e 24% nos casos graves e críticos. Este fato reforça a evidência dos desfechos negativos em pacientes que evoluíram para quadros mais graves de COVID-19 na gestação. Di Toro *et al*, em metanálise, observaram prevalência de 2% de internação em UTIN dos filhos de mulheres infectadas com COVID-19 durante a gestação, sem diferenciar o grau de gravidade materna ou o período de infecção (151). Jafari *et al*, também em metanálise, observaram uma necessidade maior de internação em UTIN em filhos de mulheres infectadas por SARS-CoV-2. (149)

No estudo de Gupta *et al* foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre mulheres grávidas SARS-CoV-2 negativas e SARS-CoV-2 positivas com base em resultados perinatais. A prematuridade, peso mais baixo ao nascer e índice de Apgar de 5º minuto mais baixo estão relacionados à positividade materna para COVID-19. (150) Em contraponto, relação ao peso de nascimento, Yao *et al* observaram, numa metanálise e revisão sistemática, que os filhos de mulheres infectadas pelo SARS-CoV-2 apresentavam em médio peso de nascimento

maiores(82). A justificativa para o maior peso de nascimento destes neonatos pode estar relacionada a desfechos maternos que relacionados a COVID-19 materna, como por exemplo, o possível aumento de prevalência de diabetes mellitus gestacional como citado anteriormente. O presente estudo não mostrou diferença entre os desfechos relacionados ao peso de nascimento e ao Apgar de 5º quando analisou por trimestre de infecção ou por critério de gravidade materno.

Ao contrário do descrito por Dumitriu *et. al*, que referem necessidade de fototerapia em 30% dos recém-nascidos filhos de mães com COVID-19 grave e em 7% dos recém-nascidos filhos de mães com infecções não-graves (109), nosso estudo não evidenciou incidência maior de icterícia e nem necessidade maior de fototerapia na população estudada. Os fatores relacionados à icterícia neonatal que não foram analisados em ambos os estudos podem ter contribuído para esta diferença. Além disso, momentos diferentes de análise e situação vacinal podem ter contribuído para estas diferenças.

Nosso estudo ainda evidenciou que o valor médio de 17-OH-Progesterona foi maior nos grupos de gravidade materna crítica ou grave e no grupo de infecção no terceiro trimestre. A dosagem de 17-OH-progesterona é rotineiramente utilizada para triagem neonatal para hiperplasia adrenal congênita. No entanto, após a percepção de valores elevados em prematuros, esse composto passou a ser estudado recentemente como marcador de estresse intrauterino. Juntamente com o cortisol e o ACTH, esses biomarcadores apresentam-se em altas concentrações em recém-nascidos afetados por infecções amnióticas ou pré-eclâmpsia. Assim, situações estressantes parecem estimular a síntese de esteroides pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical fetal. No entanto, ao comparar situações de estresse intrauterino agudo e crônico, a 17-OH-progesterona apareceu como um marcador mais confiável para indicar sofrimento fetal prolongado (89)(152). Os resultados deste estudo sugerem que os recém-nascidos de mães que tiveram COVID-19 mais grave e/ou no terceiro trimestre gestacional foram submetidos a maiores níveis de estresse que os demais grupos, compatível com a hiper resposta inflamatória observada e caracterizada nesse grupo de gestantes. Esse fato deve estar correlacionado a um maior tônus córtico-adrenal nesse grupo de neonatos, iniciado já na vida intrauterina, com consequente síntese aumentada de cortisol, no mecanismo de fuga e luta da homeostase sistêmica que se instala em eventos agressores. Uma questão importante nessa área e que merece investigação e o seguimento dessa coorte a longo prazo é sobre as repercussões desse tônus adrenal aumentado ao longo da vida dessas crianças, em seus vários aspectos metabólicos, como vulnerabilidade a uma maior adipogênese, distúrbios do metabolismo glicêmico, distúrbios cardiometabólicos e hemodinâmicos e, inclusive, em aspectos sociocomportamentais.

Nosso estudo é pioneiro na avaliação de parâmetros de crescimento dos neonatos nascidos de mães positivas para COVID-19 de acordo com o trimestre gestacional de infecção e com a gravidade de COVID materna, tanto ao nascimento como no seguimento com 1, 6 e 12 meses de idade.

Verificou-se que não houve diferença significativa na média de peso, perímetro cefálico e comprimento entre grupos ao nascimento, seja em relação à gravidade da COVID materna ou ao período gestacional em que ocorreu a infecção. Esse achado mostra que os grupos de filhos de mães com COVID grave e/ou de mães com infecções adquiridas no terceiro trimestre gestacional, apesar de terem sido submetidos a uma resposta inflamatória mais intensa e a um maior tônus estressor no período pré-natal, teve sua nutrição fetal transplacentária preservada, assegurando-se o adequado ganho de massa (peso e comprimento) e do crescimento cerebral (perímetro cefálico) nessa fase. Hipotetiza-se que, concomitante ao evento estressor, mecanismos protetores tenham-se instalado para assegurar que a placenta mantivesse sua função na nutrição fetal. Dados interessantes poderiam vir do estudo anatomopatológico da placenta desse grupo, o que não fez parte do estudo. Uma metanálise sobre o impacto da COVID-19 na placenta humana não encontrou um padrão histopatológico típico nessa condição e descreve que a incidência de lesões vasculares e inflamatórias no tecido placentário eram semelhantes à descrita em gestações sem COVID-19.(153)

Em relação à evolução antropométrica dos lactentes no primeiro ano de vida, observou-se menor ganho de peso no primeiro mês de vida de filhos de mães que tiveram COVID grave e/ou foram infectadas nos 2º/3º trimestres de gestação em comparação ao grupo COVID não grave e com infecção no 1º trimestre, respectivamente. Entretanto, esse padrão de menor ganho ponderal não se manteve nos meses subsequentes e nem foi observado em relação ao perfil de ganho de comprimento ou de perímetro cefálico ao longo dos primeiros 12 meses de vida. O desenho deste estudo não permite estabelecer uma relação de causalidade entre gravidade de COVID materna ou período gestacional de infecção e perfil de ganho ponderal nesse grupo de lactentes, apenas descrever uma associação entre esses parâmetros. Essa associação pode ter sido influenciada por fatores que tenham interferido no ganho ponderal no primeiro mês de vida, como a maior proporção de recém-nascidos pré-termos ($p=0,0159$) e de neonatos encaminhados à UTIN ($p=0,014$) entre os filhos de mãe com COVID grave, assim como maior proporção de mães que tiveram COVID grave ($p<0,0001$) e de recém-nascidos pré-termos ($p=0,0246$) entre os filhos de mães infectadas no terceiro trimestre de gestação. A não diferença no padrão de ganho ponderal após o primeiro mês de vida entre os grupos reflete que os fatores subjacentes que levaram a um menor ganho no primeiro mês de vida foram resolvidos. Entretanto o

grupo de filho de mães com COVID grave apresentou um ganho de peso proporcionalmente maior no final do primeiro ano de vida (delta no Z-escore de peso entre o primeiro e o 12º mês: +1,22 DP), em relação ao grupo de filho de mães com COVID não grave (delta no Z-escore de peso entre o primeiro e 12º mês: +0,5 DP; $p = 0,0296$). Esse achado pode refletir tanto a mais efetiva recuperação de peso no grupo COVID materna grave ao longo do primeiro ano de vida (*catch up growth*), como também decorrer de fatores ambientais, como uma maior oferta calórica pela família a esse grupo COVID materna grave, espelhando, hipoteticamente, maior ansiedade da família quanto ao peso do lactente. Apesar de não dispomos de mais dados que nos permitam, nesse momento, maiores inferências sobre fatores envolvidos, uma observação semelhante foi descrita recentemente por Ockene et al (2023) para um grupo de lactentes filhos de mães com COVID na gestação, nos Estados Unidos. Aquele grupo de lactentes, que havia nascido com peso menor que o grupo de crianças filhas de mães sem COVID na gestação, apresentou um rápido ganho de índice de massa corporal no primeiro ano de vida, sem diferenças em relação à trajetória do comprimento nesse período entre os grupos com e sem COVID na gestação.(154) Esse achado direcionada a um cuidado especial em relação ao acompanhamento desse grupo de crianças ao longo da vida, uma vez que é bem conhecida, a partir de outras condições clínicas, a correlação positiva entre um rápido ganho ponderal no primeiro ano de vida com aumento do risco de doenças cardiometabólicas na vida adulta.(155)

Na avaliação da evolução antropométrica intragrupos, observou-se que todos os grupos (independente da gravidade da COVID materna e do período de infecção) apresentaram menores ganhos de peso e perímetro cefálico no primeiro mês de vida, caracterizado pela diminuição significativa dos respectivos Z-escores no período neonatal, exceto o grupo filho de mães com infecção no primeiro semestre em relação ao Z-escore de peso. Esse menor ganho nos parâmetros antropométricos no primeiro mês de vida pode refletir um período de adaptação pós-natal inicial, após a hiper resposta imunológica do final da gestação, uma vez que esse padrão da evolução de ganhos de peso, comprimento e perímetro cefálico não se manteve nos meses subsequentes.

Entretanto, uma observação importante diz respeito ao perfil de evolução do perímetro cefálico. O grupo de filhos de mães com COVID grave só apresentou melhora no Z-escore de perímetro cefálico ao final do primeiro ano, e do grupo de filhos de mães com COVID não grave manteve um menor ganho de perímetro cefálico ao longo de todo o primeiro ano de vida. Ao mesmo tempo, avaliando-se pela categoria período da infecção materna, observou-se que os grupos 2º e 3º trimestres mantiveram um ganho inadequado do perímetro cefálico no 6º mês, recuperando-o apenas no 12º mês. Nesse

contexto, apesar de não termos mais dados que nos permitam entender possíveis fatores que levaram a esse comportamento do perímetro cefálico, entendemos ser necessário um aprofundamento nessa investigação e inclusive comparar esses dados com aqueles referentes ao neurodesenvolvimento dessas crianças no primeiro ano de vida (objeto de um dos braços do PROUDEST), ou até mesmo organizar um estudo para avaliação imagenológica (ultrassonografia transfontanelar, por exemplo) do cérebro dessas crianças no primeiro ano de vida.

Em uma coorte realizada em Nova Déli, Índia, não se mostrou diferença em parâmetros antropométricos da população estudada. Foram incluídos naquele estudo 62 neonatos filhos de mulheres com COVID-19 na gestação e 62 neonatos filhos de mulheres não-infectadas. Os parâmetros antropométricos foram reavaliados aos três meses de idade e não foi encontrada qualquer diferença. Atualmente, a literatura publicada sobre estudos de acompanhamento em neonatos nascidos de mães positivas para COVID-19 é amplamente focada na avaliação dos resultados do neurodesenvolvimento e nenhum dos estudos avaliou o impacto da infecção por COVID-19 em mães nos parâmetros de crescimento dos bebês (81). Os aspectos de neurodesenvolvimento deste grupo serão apresentados nos resultados dos outros braços do estudo PROUDEST.

Limitações do Estudo

Este estudo apresenta algumas limitações. O baixo número de mulheres grávidas incluídas em cada trimestre de gravidez reforça a necessidade de validar nossos achados com uma amostragem mais robusta. Além de disso, este trabalho, em ambas as etapas, foi realizado durante a circulação das cepas B.1.1.28 e B.1.1.33 do SARS-CoV-2 no DF e, portanto, o impacto de outras variantes nos perfis imunológicos e nos desfechos neonatais ainda precisa ser abordado. Outro ponto que deve ser levado em consideração é que as gestantes com COVID-19 incluídas no estudo são de uma fase anterior à disponibilidade de vacinas contra SARS-CoV-2. Dessa forma, não é possível analisar o impacto de vacinas nas variáveis do nosso estudo.

Apesar do pioneirismo desta investigação exploratória na primeira fase do estudo, o desenho observacional com comparações múltiplas sem correções para comorbidades ou outras variáveis de confusão também constitui uma limitação do estudo.

Apesar deste estudo se apresentar como uma das escassas análises disponíveis sobre o impacto do período de infecção materna com desfechos neonatais e no primeiro ano de vida, a falta de um grupo controle pareado também se constitui em uma limitação. Entretanto, o ambiente sanitário, dificuldades econômicas e mudanças sociais

inerentes à pandemia como *lockdown*, escassez de recursos, restrição de consultas presenciais em vários serviços de saúde e o próprio receio da população foram alguns dos fatores que comprometeram o seguimento de um grupo controle neste estudo.

Apesar dessas limitações, este estudo contribui com importantes dados sobre a dinâmica do perfil imunológico das gestantes com COVID-19 ao longo dos vários períodos gestacionais. Descreve também o impacto da doença em desfechos clínicos maternos, neonatais e na evolução antropométrica ao longo do primeiro ano de vida desse grupo de crianças, de acordo com a gravidade da COVID materna e com o trimestre gestacional em que a gestante teve infecção pelo SARS-CoV-2.

Os aspectos fisiopatológicos da COVID-19 descritos neste estudo são característicos da população materno-infantil do Distrito Federal. Entretanto, em um contexto maior, e dentro dos devidos limites científicos, os achados deste estudo podem ser partilhados, complementados e associados aos dados que descrevem o comportamento esperado e/ou observado dessas mesmas variáveis em outras populações, dentro e fora do país, contribuindo com a provisão de evidências científicas mais inclusivas, robustas e com maior força de recomendação na incorporação de novas ações de políticas públicas de assistência global à saúde materno-infantil no contexto da COVID-19.

É fato que nessa área do conhecimento ainda é de grande importância que haja mais estudos longitudinais prospectivos com esse grupo de crianças expostas à COVID-19 intraútero para um melhor entendimento da extensão dos efeitos diretos e/ou indiretos dessa infecção na saúde física, psíquica e social ao longo da fase de crescimento e desenvolvimento e nas outras etapas da vida.

6. CONCLUSÃO

A pandemia de COVID-19, além dos impactos globais na saúde pública mundial, trouxe a necessidade de pesquisas que contribuíssem com maior conhecimento sobre os variados efeitos na saúde das mulheres grávidas e de seus recém-nascidos, principalmente devido ao impacto social e financeiro a toda população mundial.

Neste estudo, foram estudadas as correlações entre as mudanças na resposta imunológica de gestantes infectadas pelo SARS-CoV-2 em diferentes trimestres da gestação com desfechos clínicos neonatais. De uma maneira geral, os mediadores inflamatórios solúveis séricos, em especial as citocinas pró-inflamatórias, encontraram-se mais elevados em gestantes infectadas no 3º trimestre da gestação. Em paralelo, na análise de desfechos neonatais, houve maior prevalência de prematuridade no grupo de recém-nascidos cujas mães forem infectadas no 3º trimestre de gestação.

A comparação do panorama de mediadores inflamatórios solúveis de mulheres infectadas pelo SARS-CoV-2 durante a gestação com um grupo de gestantes pré-pandêmico mostrou que no grupo pré-pandêmico, a maioria dos mediadores solúveis séricos diminuiu progressivamente no 2º e 3º trimestre de gravidez, enquanto níveis mais altos de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento foram observados no grupo de pacientes que foram infectadas pelo SARS-CoV-2. Além disso, foi observado um aumento de 15 vezes de citocinas pró-inflamatórias no 3º trimestre no grupo COVID-19 quando comparado ao grupo controle.

A análise de rede integrativa demonstrou que a gravidez no grupo controle evoluiu com conectividade decrescente entre pares de mediadores inflamatórios solúveis séricos em direção ao 3º trimestre. Embora o grupo COVID-19 tenha apresentado um perfil semelhante, o número de conexões foi notavelmente menor ao longo da gravidez. Sob uma perspectiva geral, um aumento pronunciado nos níveis séricos de mediadores inflamatórios solúveis no 3º trimestre, com diminuição da interação da rede entre eles, demonstrou um desequilíbrio na resposta imunológica na infecção convalescente por COVID-19 durante a gravidez, o que pode contribuir para o manejo ou mesmo a recuperação de complicações tardias na fase pós-sintomática da infecção por SARS-CoV-2 em mulheres grávidas.

Este estudo mostra ainda que o período de infecção materna e a gravidade da infecção materna pelo SARS-CoV-2 podem estar relacionados com desfechos neonatais negativos.

Em relação aos desfechos neonatais relacionados ao trimestre de infecção materna na gestação, este estudo revela que os resultados mais adversos ocorrem nos

filhos daquelas mulheres infectadas no terceiro trimestre de gestação. Neste grupo, houve maior incidência de prematuridade, maiores concentrações séricas de 17-OH progesterona, além de ganho de peso menor no primeiro mês de vida quando comparados aos grupos de 1º e 2º trimestre. Além da hiper inflamação no final da gestação, como sugere a primeira fase do estudo, o ambiente sanitário e as dificuldades inerentes à pandemia, como *lockdown* e escassez de recursos, podem justificar estes desfechos.

Em relação aos desfechos neonatais relacionados à gravidade materna durante a infecção pelo SARS-CoV-2, este estudo mostrou que os resultados mais adversos ocorrem naqueles recém-nascidos de mulheres que apresentaram quadro graves ou críticos de COVID-19 na gestação. Neste grupo, percebe-se uma prevalência maior de prematuridade e concentrações séricas de 17-OH-progesterona mais elevada. Acrescenta-se ainda a observação, na avaliação longitudinal até os 6 meses de vida, de menor ganho de peso, comprimento e perímetro cefálico no grupo dos filhos das mulheres que tiveram quadros mais graves. O processo hiper inflamatório típico dos pacientes mais graves e o ambiente sanitário podem justificar estes desfechos.

Por fim, entende-se que esta pesquisa aponta diversas perspectivas de estudos futuros como, por exemplo, investigação dos impactos a longo prazo, a segurança e eficácia das vacinas em gestantes, fatores de risco relacionados às intervenções terapêuticas, impacto psicológico, estratégias de saúde pública e o impacto das variantes do vírus além de programas de educação para melhor compreender e abordar os riscos e medidas de prevenção, visando aprimorar a saúde materna e neonatal globalmente.

7. REFERÊNCIAS

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020;382(8):727–33.
2. Organização Mundial da Saúde. Dados do Painel de Controle do Coronavírus da OMS (COVID-19). [Internet]. [cited 2023 Aug 3]. Available from: <https://covid19.who.int>
3. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* [Internet]. 2020 Mar 2;5(4):536–44. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41564-020-0695-z>
4. Zhou J, Chu H, Li C, Wong BH-Y, Cheng Z-S, Poon VK-M, et al. Active Replication of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus and Aberrant Induction of Inflammatory Cytokines and Chemokines in Human Macrophages: Implications for Pathogenesis. *J Infect Dis* [Internet]. 2014 May 1;209(9):1331–42. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jit504>
5. Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2019 Mar 10;17(3):181–92. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41579-018-0118-9>
6. Gusev E, Sarapultsev A, Solomatina L, Chereshnev V. SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Feb 2;23(3):1716. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/3/1716>
7. Mariano G, Farthing RJ, Lale-Farjat SLM, Bergeron JRC. Structural Characterization of SARS-CoV-2: Where We Are, and Where We Need to Be. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2020 Dec 17;7. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2020.605236/full>
8. Kostoulas P, Eusebi P, Hartnack S. Diagnostic Accuracy Estimates for COVID-19 Real-Time Polymerase Chain Reaction and Lateral Flow Immunoassay Tests With Bayesian Latent-Class Models. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2021 Aug 1;190(8):1689–95. Available from: <https://academic.oup.com/aje/article/190/8/1689/6206818>
9. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2020 Feb 15;395(10223):497–506. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31986264>
10. Brandt JS, Hill J, Reddy A, Schuster M, Patrick HS, Rosen T, et al. Epidemiology of coronavirus disease 2019 in pregnancy: risk factors and associations with adverse maternal and neonatal outcomes. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2021 Apr;224(4):389.e1-389.e9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937820311340>
 11. Metz TD, Clifton RG, Hughes BL, Sandoval GJ, Grobman WA, Saade GR, et al. Association of SARS-CoV-2 Infection With Serious Maternal Morbidity and Mortality From Obstetric Complications. *JAMA* [Internet]. 2022 Feb 22;327(8):748. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2788985>
 12. Yao X-H, He Z-C, Li T-Y, Zhang H-R, Wang Y, Mou H, et al. Pathological evidence for residual SARS-CoV-2 in pulmonary tissues of a ready-for-discharge patient. *Cell Res* [Internet]. 2020 Jun 28;30(6):541–3. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41422-020-0318-5>
 13. Darif D, Hammi I, Kihel A, El Idrissi Saik I, Guessous F, Akarid K. The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: What goes wrong? *Microb Pathog* [Internet]. 2021 Apr;153:104799. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401021000711>
 14. Merad M, Blish CA, Sallusto F, Iwasaki A. The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science* (80-) [Internet]. 2022 Mar 11;375(6585):1122–7. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abm8108>
 15. Hussman JP. Cellular and Molecular Pathways of COVID-19 and Potential Points of Therapeutic Intervention. *Front Pharmacol* [Internet]. 2020 Jul 29;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2020.01169/full>
 16. Hirano T, Murakami M. COVID-19: A New Virus, but a Familiar Receptor and Cytokine Release Syndrome. *Immunity* [Internet]. 2020 May;52(5):731–3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761320301618>
 17. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol* [Internet]. 2021 Jan 30;93(1):250–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.26232>
 18. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-280.e8.
 19. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *J Infect* [Internet]. 2020 Jun;80(6):607–13. Available from:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445320301651>
20. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020;20(June):363–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
 21. Bakhshandeh B, Jahanafrooz Z, Abbasi A, Goli MB, Sadeghi M, Mottaqi MS, et al. Mutations in SARS-CoV-2; Consequences in structure, function, and pathogenicity of the virus. *Microb Pathog* [Internet]. 2021 May;154:104831. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401021001030>
 22. Mistry P, Barmania F, Mellet J, Peta K, Strydom A, Viljoen IM, et al. SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Jan 3;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.809244/full>
 23. Burki T. Understanding variants of SARS-CoV-2. *Lancet* [Internet]. 2021 Feb;397(10273):462. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673621002981>
 24. Grint DJ, Wing K, Williamson E, McDonald HI, Bhaskaran K, Evans D, et al. Case fatality risk of the SARS-CoV-2 variant of concern B.1.1.7 in England, 16 November to 5 February. *Eurosurveillance* [Internet]. 2021 Mar 18;26(11). Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.11.2100256>
 25. Abdool Karim SS, de Oliveira T. New SARS-CoV-2 Variants — Clinical, Public Health, and Vaccine Implications. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 May 13;384(19):1866–8. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc2100362>
 26. Freitas ARR, Beckedorff OA, Cavalcanti LP de G, Siqueira AM, Castro DB de, Costa CF da, et al. The emergence of novel SARS-CoV-2 variant P.1 in Amazonas (Brazil) was temporally associated with a change in the age and sex profile of COVID-19 mortality: A population based ecological study. *Lancet Reg Heal - Am* [Internet]. 2021 Sep;1:100021. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2667193X21000132>
 27. Campbell F, Archer B, Laurenson-Schafer H, Jinnai Y, Konings F, Batra N, et al. Increased transmissibility and global spread of SARS-CoV-2 variants of concern as at June 2021. *Eurosurveillance* [Internet]. 2021 Jun 17;26(24). Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100509>
 28. Callaway E, Ledford H. How bad is Omicron? What scientists know so far.

- Nature [Internet]. 2021 Dec 9;600(7888):197–9. Available from:
<https://www.nature.com/articles/d41586-021-03614-z>
29. Soltani-Zangbar MS, Parhizkar F, Abdollahi M, Shomali N, Aghebati-Maleki L, Shahmohammadi Farid S, et al. Immune system-related soluble mediators and COVID-19: basic mechanisms and clinical perspectives. *Cell Commun Signal* [Internet]. 2022 Aug 29;20(1):131. Available from:
<https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-022-00948-7>
 30. Schultze JL, Aschenbrenner AC. COVID-19 and the human innate immune system. *Cell* [Internet]. 2021 Apr;184(7):1671–92. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286742100218X>
 31. Lowery SA, Sariol A, Perlman S. Innate immune and inflammatory responses to SARS-CoV-2: Implications for COVID-19. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2021 Jul;29(7):1052–62. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312821002328>
 32. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* [Internet]. 2020 Aug 20;584(7821):463–9. Available from:
<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2588-y>
 33. Rodrigues TS, de Sá KSG, Ishimoto AY, Becerra A, Oliveira S, Almeida L, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J Exp Med* [Internet]. 2021 Mar 1;218(3). Available from:
<https://rupress.org/jem/article/218/3/e20201707/211560/Inflammasomes-are-activated-in-response-to-SARS>
 34. Mulchandani R, Lyngdoh T, Kakkar AK. Deciphering the COVID-19 cytokine storm: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest* [Internet]. 2021 Jan 2;51(1). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eci.13429>
 35. Zheng J, Wang Y, Li K, Meyerholz DK, Allamargot C, Perlman S. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2–Induced Immune Activation and Death of Monocyte-Derived Human Macrophages and Dendritic Cells. *J Infect Dis* [Internet]. 2021 Mar 3;223(5):785–95. Available from:
<https://academic.oup.com/jid/article/223/5/785/6024654>
 36. Vaninov N. In the eye of the COVID-19 cytokine storm. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020 May 6;20(5):277–277. Available from:
<https://www.nature.com/articles/s41577-020-0305-6>
 37. Panigrahy D, Gilligan MM, Huang S, Gartung A, Cortés-Puch I, Sime PJ, et al. Inflammation resolution: a dual-pronged approach to averting cytokine storms in

- COVID-19? Cancer Metastasis Rev [Internet]. 2020 Jun 8;39(2):337–40. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s10555-020-09889-4>
38. Bhaskar S, Sinha A, Banach M, Mittoo S, Weissert R, Kass JS, et al. Cytokine Storm in COVID-19—Immunopathological Mechanisms, Clinical Considerations, and Therapeutic Approaches: The REPROGRAM Consortium Position Paper. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Jul 10;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.01648/full>
 39. Dolhnikoff M, Duarte-Neto AN, de Almeida Monteiro RA, da Silva LFF, de Oliveira EP, Saldiva PHN, et al. Pathological evidence of pulmonary thrombotic phenomena in severe COVID-19. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2020 Jun;18(6):1517–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1538783622014465>
 40. Favalli EG, Ingegnoli F, De Lucia O, Cincinelli G, Cimaz R, Caporali R. COVID-19 infection and rheumatoid arthritis: Faraway, so close! *Autoimmun Rev* [Internet]. 2020 May;19(5):102523. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568997220300781>
 41. Schulert GS, Cron RQ. The genetics of macrophage activation syndrome. *Genes Immun* [Internet]. 2020 May 15;21(3):169–81. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41435-020-0098-4>
 42. Yockey LJ, Iwasaki A. Interferons and Proinflammatory Cytokines in Pregnancy and Fetal Development. *Immunity* [Internet]. 2018 Sep;49(3):397–412. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761318303376>
 43. Auriti C, De Rose DU, Santisi A, Martini L, Piersigilli F, Bersani I, et al. Pregnancy and viral infections: Mechanisms of fetal damage, diagnosis and prevention of neonatal adverse outcomes from cytomegalovirus to SARS-CoV-2 and Zika virus. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2021 Oct;1867(10):166198. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443921001319>
 44. Khoury R, Bernstein PS, Debolt C, Stone J, Sutton DM, Simpson LL, et al. Characteristics and Outcomes of 241 Births to Women With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection at Five New York City Medical Centers. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2020 Aug;136(2):273–82. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/AOG.0000000000004025>
 45. Allotey J, Fernandez S, Bonet M, Stallings E, Yap M, Kew T, et al. Clinical manifestations, risk factors, and maternal and perinatal outcomes of coronavirus disease 2019 in pregnancy: living systematic review and meta-analysis. *BMJ* [Internet]. 2020 Sep 1;m3320. Available from:

- <https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.m3320>
46. Villar J, Ariff S, Gunier RB, Thiruvengadam R, Rauch S, Kholin A, et al. Maternal and Neonatal Morbidity and Mortality Among Pregnant Women With and Without COVID-19 Infection. *JAMA Pediatr*. 2021 Aug 1;175(8):817.
 47. Huntley BJF, Huntley ES, Di Mascio D, Chen T, Berghella V, Chauhan SP. Rates of Maternal and Perinatal Mortality and Vertical Transmission in Pregnancies Complicated by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2020 Aug;136(2):303–12. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/AOG.0000000000004010>
 48. Savasi VM, Parisi F, Patanè L, Ferrazzi E, Frigerio L, Pellegrino A, et al. Clinical Findings and Disease Severity in Hospitalized Pregnant Women With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Obstet Gynecol* [Internet]. 2020 Aug;136(2):252–8. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/AOG.0000000000003979>
 49. Pathirathna ML, Samarasekera BPP, Dasanayake TS, Saravanakumar P, Weerasekara I. Adverse Perinatal Outcomes in COVID-19 Infected Pregnant Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Healthcare* [Internet]. 2022 Jan 20;10(2):203. Available from: <https://www.mdpi.com/2227-9032/10/2/203>
 50. Giuliani F, Oros D, Gunier RB, Deantoni S, Rauch S, Casale R, et al. Effects of prenatal exposure to maternal COVID-19 and perinatal care on neonatal outcome: results from the INTERCOVID Multinational Cohort Study. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2022 Sep;227(3):488.e1-488.e17. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937822002915>
 51. Birol Ilter P, Prasad S, Mutlu MA, Tekin AB, O'Brien P, von Dadelszen P, et al. Maternal and perinatal outcomes of <sc>SARS-CoV</sc> -2 infection in unvaccinated pregnancies during Delta and Omicron waves. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2022 Jul;60(1):96–102. Available from: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/uog.24916>
 52. Vousden N, Ramakrishnan R, Bunch K, Morris E, Simpson NAB, Gale C, et al. Severity of maternal infection and perinatal outcomes during periods of SARS-CoV-2 wildtype, alpha, and delta variant dominance in the UK: prospective cohort study. *BMJ Med* [Internet]. 2022 Feb;1(1):e000053. Available from: <https://bmjmedicine.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjmed-2021-000053>
 53. Deng J, Ma Y, Liu Q, Du M, Liu M, Liu J. Association of Infection with Different SARS-CoV-2 Variants during Pregnancy with Maternal and Perinatal Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2022 Nov 29;19(23):15932. Available from:

- <https://www.mdpi.com/1660-4601/19/23/15932>
54. Rahmati M, Yon DK, Lee SW, Butler L, Koyanagi A, Jacob L, et al. Effects of COVID-19 vaccination during pregnancy on SARS-CoV-2 infection and maternal and neonatal outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol* [Internet]. 2023 May 10;33(3). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmv.2434>
 55. Gray KJ, Bordt EA, Atyeo C, Deriso E, Akinwunmi B, Young N, et al. Coronavirus disease 2019 vaccine response in pregnant and lactating women: a cohort study. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2021 Sep;225(3):303.e1-303.e17. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937821001873>
 56. Blakeway H, Prasad S, Kalafat E, Heath PT, Ladhani SN, Le Doare K, et al. COVID-19 vaccination during pregnancy: coverage and safety. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2022 Feb;226(2):236.e1-236.e14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937821008735>
 57. Gencer H, Özkan S, Vardar O, Serçekeş P. The effects of the COVID 19 pandemic on vaccine decisions in pregnant women. *Women and Birth* [Internet]. 2022 May;35(3):317–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871519221000822>
 58. Lobo TF, Borges C de M, Mattar R, Gomes CP, de Angelo AGS, Pendeloski KPT, et al. Impaired Treg and NK cells profile in overweight women with gestational diabetes mellitus. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2018 Mar;79(3):e12810. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/aji.12810>
 59. Munro SK, Balakrishnan B, Lissaman AC, Gujral P, Ponnampalam AP. Cytokines and pregnancy: Potential regulation by histone deacetylases. *Mol Reprod Dev* [Internet]. 2021 May 26;88(5):321–37. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.23430>
 60. Ferguson KK, Meeker JD, McElrath TF, Mukherjee B, Cantonwine DE. Repeated measures of inflammation and oxidative stress biomarkers in preeclamptic and normotensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2017 May;216(5):527.e1-527.e9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937816464653>
 61. Chen G, Zhang Y, Zhang Y, Ai J, Yang B, Cui M, et al. Differential immune responses in pregnant patients recovered from COVID-19. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2021 Jul 29;6(1):289. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00703-3>
 62. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: One syndrome, many causes.

- Science (80-) [Internet]. 2014 Aug 15;345(6198):760–5. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1251816>
63. Basu J, Agamasu E, Bendek B, Salafia CM, Mishra A, Lopez JV, et al. Correlation Between Placental Matrix Metalloproteinase 9 and Tumor Necrosis Factor- α Protein Expression Throughout Gestation in Normal Human Pregnancy. *Reprod Sci* [Internet]. 2018 Apr 1;25(4):621–7. Available from: <https://link.springer.com/10.1177/1933719117725819>
 64. Li Y, Wang Y, Ding X, Duan B, Li L, Wang X. Serum Levels of TNF- α and IL-6 Are Associated With Pregnancy-Induced Hypertension. *Reprod Sci* [Internet]. 2016 Oct 1;23(10):1402–8. Available from: <https://link.springer.com/10.1177/1933719116641760>
 65. Pinheiro MB, Martins-Filho OA, Mota APL, Alpoim PN, Godoi LC, Silveira ACO, et al. Severe preeclampsia goes along with a cytokine network disturbance towards a systemic inflammatory state. *Cytokine* [Internet]. 2013 Apr;62(1):165–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466613000999>
 66. Gehlenborg N, Wong B. Heat maps. *Nat Methods* [Internet]. 2012 Mar 28;9(3):213–213. Available from: <https://www.nature.com/articles/nmeth.1902>
 67. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res* [Internet]. 2003 Nov;13(11):2498–504. Available from: <http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.1239303>
 68. Holten D, van Wijk JJ. Force-Directed Edge Bundling for Graph Visualization. *Comput Graph Forum* [Internet]. 2009 Jun;28(3):983–90. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1467-8659.2009.01450.x>
 69. Chen Y, Peng H, Wang L, Zhao Y, Zeng L, Gao H, et al. Infants Born to Mothers With a New Coronavirus (COVID-19). *Front Pediatr* [Internet]. 2020 Mar 16;8. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fped.2020.00104/full>
 70. Parisi F, Milazzo R, Savasi VM, Cetin I. Maternal Low-Grade Chronic Inflammation and Intrauterine Programming of Health and Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Feb 9;22(4):1732. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/4/1732>
 71. Varma P, Lybrand ZR, Antopia MC, Hsieh J. Novel Targets of SARS-CoV-2 Spike Protein in Human Fetal Brain Development Suggest Early Pregnancy Vulnerability. *Front Neurosci*. 2021;14(January):1–11.
 72. Zeng H, Xu C, Fan J, Tang Y, Deng Q, Zhang W, et al. Antibodies in Infants Born to Mothers With COVID-19 Pneumonia. *JAMA* [Internet]. 2020 Mar 26;

- Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2763854>
73. Berger I, Peleg O, Ofek-Shlomai N. Inflammation and early brain injury in term and preterm infants. *Isr Med Assoc J*. 2012;14(5):318–22.
 74. Leviton A, Dammann O, Durum SK. The adaptive immune response in neonatal cerebral white matter damage. *Ann Neurol*. 2005;58(6):821–8.
 75. Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed* [Internet]. 2007 Jul 18;93(2):F153–61. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 76. Shook LL, Sullivan EL, Lo JO, Perlis RH, Edlow AG. COVID-19 in pregnancy: implications for fetal brain development. *Trends Mol Med*. 2022;28(4):319–30.
 77. Croveto F, Crispi F, Llubra E, Pascal R, Larroya M, Trilla C, et al. Impact of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection on Pregnancy Outcomes: A Population-based Study. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2021 Nov 16;73(10):1768–75. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/73/10/1768/6131375>
 78. Li M, Chen L, Zhang J, Xiong C, Li X. The SARS-CoV-2 receptor ACE2 expression of maternal-fetal interface and fetal organs by single-cell transcriptome study. Chan RWY, editor. *PLoS One* [Internet]. 2020 Apr 16;15(4):e0230295. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0230295>
 79. WHO COVID-19 LENS (Living Evidence Synthesis) working group, Definition and Categorization of the Timing of Mother-to-child Transmission of SARS-CoV-2. [Internet]. 2021. p. 1–14. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-mother-to-child-transmission-2021.1>
 80. Raschetti R, Vivanti AJ, Vauloup-Fellous C, Loi B, Benachi A, De Luca D. Synthesis and systematic review of reported neonatal SARS-CoV-2 infections. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Oct 15;11(1):5164. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-18982-9>
 81. Maria A, Singh BK, Agrawal P, Bandyopadhyay T. A short-term follow-up study on breastfeeding practices, growth parameters and immunization practices among babies born to COVID-19 positive mothers in a tertiary care hospital. *J Trop Pediatr* [Internet]. 2022 Dec 5;69(1). Available from: <https://academic.oup.com/tropej/article/doi/10.1093/tropej/fmad006/7008359>
 82. Yao XD, Li Y, Jiang H, Ma J, Wen J. COVID-19 pandemic and neonatal birth weight: a systematic review and meta-analysis. *Public Health* [Internet]. 2023

- Jul;220:10–7. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0033350623001324>
83. Yao XD, Zhu LJ, Yin J, Wen J. Impacts of COVID-19 pandemic on preterm birth: a systematic review and meta-analysis. *Public Health* [Internet]. 2022 Dec;213:127–34. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0033350622002980>
 84. Marchand G, Masoud AT, Grover S, King A, Brazil G, Ulibarri H, et al. Maternal and neonatal outcomes of COVID-19 vaccination during pregnancy, a systematic review and meta-analysis. *npj Vaccines* [Internet]. 2023 Jul 15;8(1):103. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41541-023-00698-8>
 85. Zimmermann P, Curtis N. Coronavirus infections in children including COVID-19: An overview of the epidemiology, clinical features, diagnosis, treatment and prevention options in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2020;39(5):355–68.
 86. Stopyra L, Kowalik A, Stala J, Majchrzak I, Szebla J, Jakosz M, et al. The Age-Related Course of COVID-19 in Pediatric Patients—1405 Cases in a Single Center. *J Clin Med* [Internet]. 2022 Dec 10;11(24):7347. Available from:
<https://www.mdpi.com/2077-0383/11/24/7347>
 87. Moura EC de, Cavalcante FV, Oliveira LG de, Barreto IC de HC, Fernandes GM, Frio GS, et al. Síndrome Inflamatória Multissistêmica e Covid-19 em crianças e adolescentes: aspectos epidemiológicos, Brasil, 2020-2021. *Saúde em Debate* [Internet]. 2022;46(134):682–92. Available from:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-11042022000300682&tlng=pt
 88. Silva Luz M, Lemos FFB, Rocha Pinheiro SL, Marques HS, de Oliveira Silva LG, Calmon MS, et al. Pediatric multisystem inflammatory syndrome associated with COVID-19: Insights in pathogenesis and clinical management. *World J Virol* [Internet]. 2023 Jun 25;12(3):193–203. Available from:
<https://www.wjgnet.com/2220-3249/full/v12/i3/193.htm>
 89. Ersch J, Beinder E, Stallmach T, Bucher HU, Torresani T. 17-Hydroxyprogesterone in premature infants as a marker of intrauterine stress. *J Perinat Med* [Internet]. 2008 Jan 1;36(2). Available from:
<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/JPM.2008.013/html>
 90. Miller R, Ashraf AP, Gourgari E, Gupta A, Kamboj MK, Kohn B, et al. SARS-CoV-2 infection and paediatric endocrine disorders: Risks and management considerations. *Endocrinol Diabetes Metab* [Internet]. 2021 Jul 3;4(3). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/edm2.262>

91. Memar EHE, Mohsenipour R, Sadrosadat ST, Rostami P. Pediatric endocrinopathies related to COVID-19: an update. *World J Pediatr* [Internet]. 2023 Sep 8;19(9):823–34. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s12519-022-00662-x>
92. Kumar P, Jat KR. Post-COVID-19 Sequelae in Children. *Indian J Pediatr* [Internet]. 2023 Jun 8;90(6):605–11. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s12098-023-04473-4>
93. Fernandes GM, Motta F, Paravidine Sasaki LM, Da Silva ÂP, Miranda AM, De Carvalho AO, et al. Pregnancy outcomes and child development effects of SARS-CoV-2 infection (PROUDEST Trial): Protocol for a multicenter, prospective cohort study. *JMIR Res Protoc*. 2021;10(4).
94. ELSHAL M, MCCOY J. Multiplex bead array assays: Performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA☆. *Methods* [Internet]. 2006 Apr;38(4):317–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202306000107>
95. Carson RT, Vignali DA. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J Immunol Methods* [Internet]. 1999 Jul;227(1–2):41–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175999000691>
96. Sutton D, Fuchs K, D’Alton M, Goffman D. Universal Screening for SARS-CoV-2 in Women Admitted for Delivery. *N Engl J Med*. 2020;1–2.
97. BRASIL - Ministério da Saúde -MS/SVS/DASIS. Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos - SINASC [Internet]. [cited 2020 Sep 2]. Available from: <http://http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinasc/cnv/nvdf.def>
98. WHO. Living guidance for clinical management of COVID-19 - 23 November 2021 | COVID-19: Clinical care. 2021.
99. Villar J, Ismail LC, Victora CG, Ohuma EO, Bertino E, Altman DG, et al. International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet* [Internet]. 2014 Sep;384(9946):857–68. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614609326>
100. Spence T, Allsopp PJ, Yeates AJ, Mulhern MS, Strain JJ, McSorley EM. Maternal Serum Cytokine Concentrations in Healthy Pregnancy and Preeclampsia. Zakar T, editor. *J Pregnancy* [Internet]. 2021 Feb 23;2021:1–33. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jp/2021/6649608/>
101. Chen G, Liao Q, Ai J, Yang B, Bai H, Chen J, et al. Immune Response to COVID-19 During Pregnancy. *Front Immunol* [Internet]. 2021 May 3;12.

Available from:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.675476/full>

102. Wei SQ, Bilodeau-Bertrand M, Liu S, Auger N. The impact of COVID-19 on pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Can Med Assoc J* [Internet]. 2021 Apr 19;193(16):E540–8. Available from: <http://www.cmaj.ca/lookup/doi/10.1503/cmaj.202604>
103. Kumar D, Verma S, Mysorekar IU. COVID-19 and pregnancy: clinical outcomes; mechanisms, and vaccine efficacy. *Transl Res* [Internet]. 2023 Jan;251:84–95. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931524422001803>
104. Mendoza M, Garcia-Ruiz I, Maiz N, Rodo C, Garcia-Manau P, Serrano B, et al. Pre-eclampsia-like syndrome induced by severe COVID-19: a prospective observational study. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* [Internet]. 2020 Oct 21;127(11):1374–80. Available from: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1471-0528.16339>
105. Villar J, Ariff S, Gunier RB, Thiruvengadam R, Rauch S, Kholin A, et al. Maternal and Neonatal Morbidity and Mortality Among Pregnant Women With and Without COVID-19 Infection. *JAMA Pediatr* [Internet]. 2021 Aug 1;175(8):817. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamapediatrics/fullarticle/2779182>
106. Guida JP, Cecatti JG, Souza RT, Pacagnella RC, Ribeiro-do-Valle CC, Luz AG, et al. Preeclampsia among women with COVID-19 during pregnancy and its impact on maternal and perinatal outcomes: Results from a national multicenter study on COVID in Brazil, the REBRACO initiative. *Pregnancy Hypertens* [Internet]. 2022 Jun;28:168–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2210778922000484>
107. Delahoy MJ, Whitaker M, O’Halloran A, Chai SJ, Kirley PD, Alden N, et al. Characteristics and Maternal and Birth Outcomes of Hospitalized Pregnant Women with Laboratory-Confirmed COVID-19 — COVID-NET, 13 States, March 1–August 22, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2020 Sep 25;69(38):1347–54. Available from: http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/mm6938e1.htm?s_cid=mm6938e1_w
108. Gurol-Urganci I, Jardine JE, Carroll F, Draycott T, Dunn G, Fremeaux A, et al. Maternal and perinatal outcomes of pregnant women with SARS-CoV-2 infection at the time of birth in England: national cohort study. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2021 Nov;225(5):522.e1-522.e11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937821005652>
109. Dumitriu D, Emeruwa UN, Hanft E, Liao G V., Ludwig E, Walzer L, et al. Outcomes of Neonates Born to Mothers With Severe Acute Respiratory

- Syndrome Coronavirus 2 Infection at a Large Medical Center in New York City. *JAMA Pediatr* [Internet]. 2021 Feb 1;175(2):157. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamapediatrics/fullarticle/2771636>
110. Hughes BL, Sandoval GJ, Metz TD, Clifton RG, Grobman WA, Saade GR, et al. First- or second-trimester SARS-CoV-2 infection and subsequent pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2023 Feb;228(2):226.e1-226.e9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000293782200641X>
 111. Simbar M, Nazarpour S, Sheidaei A. Evaluation of pregnancy outcomes in mothers with COVID-19 infection: a systematic review and meta-analysis. *J Obstet Gynaecol (Lahore)* [Internet]. 2023 Dec 31;43(1). Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01443615.2022.2162867>
 112. Charuta A, Smuniewska M, Woźniak Z, Paziewska A. Effect of COVID-19 on Pregnancy and Neonate's Vital Parameters: A Systematic Review. Ozgu-Erdinc AS, editor. *J Pregnancy* [Internet]. 2023 May 13;2023:1–21. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jp/2023/3015072/>
 113. Mullins E, Perry A, Banerjee J, Townson J, Grozeva D, Milton R, et al. Pregnancy and neonatal outcomes of COVID-19: The PAN-COVID study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2022 Sep;276:161–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301211522004328>
 114. Jarmund AH, Giskeødegård GF, Ryssdal M, Steinkjer B, Stokkeland LMT, Madssen TS, et al. Cytokine Patterns in Maternal Serum From First Trimester to Term and Beyond. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Oct 14;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.752660/full>
 115. Azizieh F, Dingle K, Raghupathy R, Johnson K, VanderPlas J, Ansari A. Multivariate analysis of cytokine profiles in pregnancy complications. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2018 Mar;79(3):e12818. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/aji.12818>
 116. Tartaglia E, Bordoni V, Oliva A, Vergori A, Girardi E, Antinori A, et al. T helper profile in pregnant women recovered from COVID-19. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2022 Sep;153:103661. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165037822001905>
 117. Subha M, Pal P, Pal GK, Habeebullah S, Adithan C, Sridhar MG. Decreased baroreflex sensitivity is linked to sympathovagal imbalance, low-grade inflammation, and oxidative stress in pregnancy-induced hypertension. *Clin Exp Hypertens* [Internet]. 2016 Nov 16;38(8):666–72. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10641963.2016.1200596>
 118. Blackmore ER, Moynihan JA, Rubinow DR, Pressman EK, Gilchrist M, O'Connor

- TG. Psychiatric Symptoms and Proinflammatory Cytokines in Pregnancy. *Psychosom Med* [Internet]. 2011 Oct;73(8):656–63. Available from: <https://journals.lww.com/00006842-201110000-00005>
119. Simavli S, Derbent AU, Uysal S, Turhan NÖ. Hepcidin, iron status, and inflammation variables among healthy pregnant women in the Turkish population. *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2014 Jan 14;27(1):75–9. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14767058.2013.804054>
120. Björkander S, Bremme K, Persson J-O, van Vollenhoven RF, Sverremark-Ekström E, Holmlund U. Pregnancy-associated inflammatory markers are elevated in pregnant women with systemic lupus erythematosus. *Cytokine* [Internet]. 2012 Aug;59(2):392–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466612001809>
121. Lindsay K, Buss C, Wadhwa P, Entringer S. Maternal Stress Potentiates the Effect of an Inflammatory Diet in Pregnancy on Maternal Concentrations of Tumor Necrosis Factor Alpha. *Nutrients* [Internet]. 2018 Sep 6;10(9):1252. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/10/9/1252>
122. Olimpia S-S, Magdalena P, Tomasz P, Piotr W, Elzbieta R-W. Changes in the concentration of sHLA-I and selected cytokines in pregnancy complicated by antiphospholipid syndrome. *Ginekol Pol* [Internet]. 2011 May;82(5):354–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21851034>
123. Doria A, Cutolo M, Ghirardello A, Zen M, Villalta D, Tincani A, et al. Effect of pregnancy on serum cytokines in SLE patients. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2012;14(2):R66. Available from: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar3782>
124. Iaccarino L, Ghirardello A, Zen M, Villalta D, Tincani A, Punzi L, et al. Polarization of TH2 response is decreased during pregnancy in systemic lupus erythematosus. *Reumatismo* [Internet]. 2012 Dec 12;64(5). Available from: <http://www.reumatismo.org/index.php/reuma/article/view/611>
125. Vilotić A, Nacka-Aleksić M, Pirković A, Bojić-Trbojević Ž, Dekanski D, Jovanović Krivokuća M. IL-6 and IL-8: An Overview of Their Roles in Healthy and Pathological Pregnancies. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Nov 23;23(23):14574. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/23/14574>
126. Nayak M, Eekhoff MEW, Peinhaupt M, Heinemann A, Desoye G, van Poppel MNM. Cytokines and their association with insulin resistance in obese pregnant women with different levels of physical activity. *Cytokine* [Internet]. 2016 Jan;77:72–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466615300910>

127. Stokkeland LMT, Giskeødegård GF, Stridsklev S, Ryan L, Steinkjer B, Tangerås LH, et al. Serum cytokine patterns in first half of pregnancy. *Cytokine* [Internet]. 2019 Jul;119:188–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466619300900>
128. Ross KM, Miller G, Culhane J, Grobman W, Simhan HN, Wadhwa PD, et al. Patterns of peripheral cytokine expression during pregnancy in two cohorts and associations with inflammatory markers in cord blood. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2016 Nov;76(5):406–14. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/aji.12563>
129. Simón C, Valbuena D, Krüssel J, Bernal A, Murphy CR, Shaw T, et al. Interleukin-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect on the endometrial epithelium. *Fertil Steril* [Internet]. 1998 Nov;70(5):896–906. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028298002751>
130. Steinkasserer A, Spurr NK, Cox S, Jeggo P, Sim RB. The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14–q21, in the region of the IL-1 α and IL-1 β loci. *Genomics* [Internet]. 1992 Jul;13(3):654–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/088875439290137H>
131. Kimya Y, Akdiş C, Cengiz C, Ozan H, Tatlikazan S, Uncu G, et al. Plasma interleukin-1 α , interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist levels in pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 1997 May;73(1):17–21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301211597026985>
132. Bowen JM, Chamley L, Mitchell MD, Keelan JA. Cytokines of the Placenta and Extra-placental Membranes: Biosynthesis, Secretion and Roles in Establishment of Pregnancy in Women. *Placenta* [Internet]. 2002 Apr;23(4):239–56. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400401907817>
133. Numasaki M, Lotze MT, Sasaki H. Interleukin-17 augments tumor necrosis factor- α -induced elaboration of proangiogenic factors from fibroblasts. *Immunol Lett* [Internet]. 2004 Apr;93(1):39–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016524780400015X>
134. Numasaki M, Takahashi H, Tomioka Y, Sasaki H. Regulatory roles of IL-17 and IL-17F in G-CSF production by lung microvascular endothelial cells stimulated with IL-1 β and/or TNF- α . *Immunol Lett* [Internet]. 2004 Aug;95(1):97–104. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165247804001737>
135. Numasaki M. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* [Internet]. 2003 Apr 1;101(7):2620–7. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2002-05-1461>

136. Takahashi H, Numasaki M, Lotze MT, Sasaki H. Interleukin-17 enhances bFGF-, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells. *Immunol Lett* [Internet]. 2005 May;98(2):189–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165247804003177>
137. Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, Takahashi H, Nakamura A, McAllister F, et al. IL-17 Enhances the Net Angiogenic Activity and In Vivo Growth of Human Non-Small Cell Lung Cancer in SCID Mice through Promoting CXCR-2-Dependent Angiogenesis. *J Immunol* [Internet]. 2005 Nov 1;175(9):6177–89. Available from: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/175/9/6177/73371/IL-17-Enhances-the-Net-Angiogenic-Activity-and-In>
138. Cornelius DC, Lamarca B. TH17- and IL-17- mediated autoantibodies and placental oxidative stress play a role in the pathophysiology of pre-eclampsia. *Minerva Ginecol* [Internet]. 2014 Jun;66(3):243–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24971780>
139. Liu H, Liu A, Kaminga AC, McDonald J, Wen SW, Pan X. Chemokines in Gestational Diabetes Mellitus. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Feb 8;13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.705852/full>
140. Wang H, Li N, Sun C, Guo X, Su W, Song Q, et al. The association between pregnancy and COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Am J Emerg Med* [Internet]. 2022 Jun;56:188–95. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735675722002170>
141. Liang B, Guida JP, Costa ML, Mysorekar IU. Host and viral mechanisms of congenital Zika syndrome. *Virulence* [Internet]. 2019 Jan 1;10(1):768–75. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2019.1656503>
142. Edlow AG, Li JZ, Collier AY, Atyeo C, James KE, Boatman AA, et al. Assessment of Maternal and Neonatal SARS-CoV-2 Viral Load, Transplacental Antibody Transfer, and Placental Pathology in Pregnancies During the COVID-19 Pandemic. *JAMA Netw Open* [Internet]. 2020 Dec 22;3(12):e2030455. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2774428>
143. Robaina-Castellanos, Gerardo R. ; Riesgo-Rodríguez S de la C. Congenital and Intrapartum SARS-CoV-2 Infection in Neonates: Hypotheses, Evidence and Perspectives. *MEDICC Rev* [Internet]. 2021;23(1). Available from: <https://mediccreview.org/congenital-and-intrapartum-sars-cov-2-infection-in-neonates-hypotheses-evidence-and-perspectives/>
144. Al-kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Albezrah NKA, Bahaa HA, El-Bouseary MM,

- Alexiou A, et al. Pregnancy and COVID-19: high or low risk of vertical transmission. *Clin Exp Med* [Internet]. 2022 Oct 17;23(4):957–67. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s10238-022-00907-z>
145. Alkazmi L, Al-kuraishy HM, Batiha GE-S, Mostafa-Hedeab G, De Waard M, Sabatier J-M, et al. Roxadustat for SARS-CoV-2 Infection: Old Signaling Raised New Hopes. *Drugs R D* [Internet]. 2022 Sep 25;22(3):183–6. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s40268-022-00397-0>
146. Al-kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Negm WA, Alexiou A, Batiha GE-S. Ursolic acid and SARS-CoV-2 infection: a new horizon and perspective. *Inflammopharmacology* [Internet]. 2022 Oct 3;30(5):1493–501. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s10787-022-01038-3>
147. Di Mascio D, Khalil A, Saccone G, Rizzo G, Buca D, Liberati M, et al. Outcome of coronavirus spectrum infections (SARS, MERS, COVID-19) during pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol MFM* [Internet]. 2020 May;2(2):100107. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2589933320300379>
148. Yap M, Debenham L, Kew T, Chatterjee SR, Allotey J, Stallings E, et al. Clinical manifestations, prevalence, risk factors, outcomes, transmission, diagnosis and treatment of COVID-19 in pregnancy and postpartum: a living systematic review protocol. *BMJ Open* [Internet]. 2020 Dec 2;10(12):e041868. Available from: <https://bmjopen.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjopen-2020-041868>
149. Jafari M, Pormohammad A, Sheikh Neshin SA, Ghorbani S, Bose D, Alimohammadi S, et al. Clinical characteristics and outcomes of pregnant women with COVID-19 and comparison with control patients: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol* [Internet]. 2021 Sep 2;31(5):1–16. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmv.2208>
150. Gupta P, Kumar S, Sharma SS. SARS-CoV-2 prevalence and maternal-perinatal outcomes among pregnant women admitted for delivery: Experience from COVID-19-dedicated maternity hospital in Jammu, Jammu and Kashmir (India). *J Med Virol* [Internet]. 2021 Sep 24;93(9):5505–14. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.27074>
151. Di Toro F, Gjoka M, Di Lorenzo G, De Santo D, De Seta F, Maso G, et al. Impact of COVID-19 on maternal and neonatal outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2021 Jan;27(1):36–46. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X20306182>
152. Goland R, Tropper P, Warren W, Stark R, Jozak S, Conwell I. Concentrations of corticotrophin-releasing hormone in the umbilical-cord blood of pregnancies

- complicated by pre-eclampsia. *Reprod Fertil Dev* [Internet]. 1995;7(5):1227. Available from: <http://www.publish.csiro.au/?paper=RD9951227>
153. Suhren J-T, Meinardus A, Hussein K, Schaumann N. Meta-analysis on COVID-19-pregnancy-related placental pathologies shows no specific pattern. *Placenta* [Internet]. 2022 Jan;117:72–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400421006263>
154. Ockene MW, Russo SC, Lee H, Monthé-Drèze C, Stanley TL, Ma IL, et al. Accelerated Longitudinal Weight Gain Among Infants With In Utero COVID-19 Exposure. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2023 Sep 18;108(10):2579–88. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/108/10/2579/7086190>
155. Ni Y, Beckmann J, Hurst JR, Morris JK, Marlow N. Size at birth, growth trajectory in early life, and cardiovascular and metabolic risks in early adulthood: EPICure study. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed* [Internet]. 2021 Mar;106(2):149–55. Available from: <https://fn.bmj.com/lookup/doi/10.1136/archdischild-2020-319328>

8. ANEXOS

ANEXO 1 – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos do SARS CoV-2 sobre gestação, parto, puerpério, período neonatal e desenvolvimento infantil: estudo de coortes, prospectivo multicêntrico

Pesquisador: GERALDO MAGELA FERNANDES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 32359620.0.0000.5558

Instituição Proponente: EMPRESA BRASILEIRA DE SERVICOS HOSPITALARES - EBSERH

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.055.854

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo observacional, longitudinal, prospectivo, que acompanhará mulheres com idade igual ou superior a 18 anos, de qualquer idade gestacional, no período de julho a dezembro de 2020 e os bebês nascidos dessas gestações, no período de junho de 2020 a junho de 2025, com o intuito de avaliar os efeitos da COVID-19 na gestação, puerpério, período neonatal e desenvolvimento infantil de crianças nascidas de mães sob infecção por COVID-19

Objetivo da Pesquisa:

Os autores relatam que pretendem determinar os efeitos da infecção por SARS-CoV-2 na gestação, parto e puerpério e comparar os achados clínicos, imageológicos, laboratoriais e de desenvolvimento a longo prazo entre filhos de mães expostas e não expostas à infecção pelo SARS-CoV-2 durante a gestação e ainda :

i. Avaliar o efeito da COVID-19 nos indicadores de morbidade e mortalidade materna; ii. Avaliar o efeito da COVID-19 nos indicadores de

morbidade obstétrica: aborto, malformação fetal, distúrbios do crescimento fetal, parto prematuro e patologias obstétricas, como pré-eclâmpsia.iii.

Investigar a presença do SARS-CoV-2 e/ou de anticorpos anti-SARS-CoV-2 no sangue materno, sangue do cordão umbilical e, naquelas mulheres

submetidas a raque anestesia para cesárea, no líquido. iv. Investigar a presença de marcadores

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

**UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 4.055.854

inflamatórios no sangue materno, sangue do cordão umbilical e, naquelas mulheres submetidas a raque anestesia para cesárea, no líquido. v. Investigar a presença de sinais histológicos e/ou marcadores moleculares no tecido placentário de mulheres infectadas pelo SARS-CoV-2vi. Avaliar o efeito da COVID-19 nos indicadores de morbidade e mortalidade neonatal precoce; vii. Avaliar o efeito da COVID-19 nos indicadores de avaliação de sucesso do aleitamento materno;viii. Avaliar o efeito da COVID-19 na saúde global de crianças filhas de mães infectadas em qualquer fase do período gestacional e neonatal precoce; ix. Avaliar o efeito da COVID-19 no desenvolvimento somático, metabolismo energético e neurológico de crianças filhas de mães infectadas em qualquer fase do período gestacional e neonatal precoce

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

s autores referem que trata-se de estudo considerado de risco mínimo.

Existe risco de constrangimento por ter sido portadora de COVID-19. Para minimizar esse efeito, as participantes serão atendidas em um ambulatório especificamente criado para esse fim, além de que todos os dados serão mantidos em sigilo.

A coleta de sangue será realizada em uma veia do antebraço, com agulha e seringa estéreis. Há risco de equimose ou sangramento local inerente à coleta. O procedimento será realizado por profissional treinado, para minimizar qualquer complicação. O paciente será orientado sobre como proceder no caso de complicação relacionada ao procedimento.

Benefícios:

Os autores consideram que entre os benefícios, destacam-se primeiro os de caráter coletivo, pois através dos resultados obtidos será possível um melhor entendimento dos efeitos da doença durante a gestação e das suas consequências a longo prazo nos filhos de mulheres acometidas.

Um importante benefício para as mulheres é que será oferecido um acompanhamento pré-natal integral, com consultas, exames laboratoriais e de imagem realizados no Hospital Universitário de Brasília (HUB), assim como a assistência ao parto nesse hospital.

Igualmente, aos filhos das participantes será garantido o acompanhamento do crescimento e desenvolvimento no ambulatório de pediatria.

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

**UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 4.055.854

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Por meio de um estudo observacional pretende-se avaliar se: a exposição materna à infecção pelo vírus SARS-CoV-2 durante a gestação e puerpério está associada a riscos diretos à própria gestação, à gestante e ao feto em desenvolvimento? A gestação em si poderia exercer efeito protetor sobre o binômio mãe-feto em relação a formas graves da COVID-19? A exposição intraútero à infecção pelo vírus SARS-CoV2 está associada a alteração no desenvolvimento infantil?

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto encontra-se elaborado de acordo com as normas e resoluções do sistema CEP/Conep com TCLE adequado, riscos e benefícios, critérios de inclusão e exclusão e cronograma.

Recomendações:

Recomenda-se : 1-atualizar o cronograma 2- considerando o auto custo do orçamento informar se haverá fonte de fomento 3- os exames complementares específicos para o projeto serão custeados pelo SUS ou haverá recursos financeiros para os mesmos? 4-Consta como benefícios :Um importante benefício para as mulheres é que será oferecido um acompanhamento pré-natal integral, com consultas, exames laboratoriais e de

imagem realizados no Hospital Universitário de Brasília (HUB), assim como a assistência ao parto nesse hospital. Igualmente, aos filhos das participantes será garantido o acompanhamento do crescimento e desenvolvimento no ambulatório de pediatria.5- Esse termo deverá ser retirado como benefício para os pacientes pois trata-se de procedimentos de rotina e direito dos pacientes.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O colegiado considerou que com intuito de não atrasar o desenvolvimento do projeto o mesmo ficará como aprovado. Entretanto, as recomendações deverão ser atendidas e serão verificadas por ocasião do relatório parcial.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto apreciado na Reunião Ordinária do CEP-FM-UnB- 05/2020. Após apresentação do parecer do (a) Relator (a), aberta a discussão para os membros do Colegiado. O projeto foi Aprovado com as recomendações elencadas acima.

De acordo com a Resolução 466/2012-CONEP/CNS, itens X.1. - 3.b. e XI. -2.d, este Comitê chama a atenção da obrigatoriedade de envio do relatório parcial semestral e final do projeto de pesquisa para o CEP -FM, através de Notificações submetidas pela Plataforma Brasil, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa e recomenda fortemente o atendimento das

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

**UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 4.055.854

observações elencadas.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1556469.pdf	25/05/2020 14:40:33		Aceito
Cronograma	Cronograma_Proudest.docx	25/05/2020 14:28:52	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	25/05/2020 14:26:43	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.docx	25/05/2020 14:24:27	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_pesquisadores.pdf	25/05/2020 14:20:01	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	resumo_estruturado.docx	25/05/2020 14:16:59	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	12_Termo_de_responsabilidade.docx	25/05/2020 14:15:06	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Zaconeta.pdf	25/05/2020 14:07:51	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Geraldo.pdf	25/05/2020 14:07:41	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	felipe.pdf	25/05/2020 14:07:27	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Karina.pdf	25/05/2020 14:06:58	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Cleandro.pdf	25/05/2020 14:06:45	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	larissa.pdf	25/05/2020 14:06:31	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	alexandre.pdf	25/05/2020 14:06:04	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	jose_alfredo.pdf	25/05/2020 14:05:43	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Lizandra.pdf	25/05/2020 14:05:20	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Andreza.pdf	25/05/2020 14:05:08	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	gecilmara.pdf	25/05/2020 14:04:25	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de	Licia.pdf	25/05/2020	GERALDO MAGELA	Aceito

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1918

E-mail: cepfm@unb.br

**UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 4.055.854

Pesquisadores	Licia.pdf	14:04:06	FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	rosana.pdf	25/05/2020 14:03:43	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Luiz_Claudio_Goncalves.pdf	25/05/2020 14:03:24	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Debora.pdf	25/05/2020 13:59:36	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Patricia.pdf	25/05/2020 13:59:14	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	10_TCLE_Proudest.docx	25/05/2020 13:56:17	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de concordância	Termo_de_ConcordanciaHRAN.pdf	24/05/2020 11:07:49	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoHUB.pdf	24/05/2020 11:05:19	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf	24/05/2020 09:08:15	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 28 de Maio de 2020

Assinado por:
Antônio Carlos Rodrigues da Cunha
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

ANEXO 2 - Outras publicações relacionadas ao Estudo PROUDEST (em parceria com outros autores)

- 1) **Fernandes GM**, Motta F, Sasaki LMP, Silva ÂPD, Miranda AM, Carvalho AO, Gomides APM, Soares AASM, Santos ACMD Jr, Alves CO, Gomes CM, Siracusa CC, Araújo DA Jr, Mendonça-Silva DL, Jesus JAL, Costa KN, Castro MEC, Kurizky PS, França PS, Tristão R, Pereira YR, Castro LCG, Zaconeta AM, Albuquerque CP, Mota LMHD. Pregnancy Outcomes and Child Development Effects of SARS-CoV-2 Infection (PROUDEST Trial): Protocol for a Multicenter, Prospective Cohort Study. JMIR Res Protoc. 2021 Apr 20;10(4):e26477. doi: 10.2196/26477. PMID: 33793409; PMCID: PMC8059788. Fator de impacto JCR: 1.7
- 2) Tristão RM, Lauand L, Costa KSF, Brant LA, **Fernandes GM**, Costa KN, Spilski J, Lachmann T. Olfactory sensory and perceptual evaluation in newborn infants: A systematic review. Dev Psychobiol. 2021 Nov;63(7):e22201. doi: 10.1002/dev.22201. PMID: 34674234. Fator de impacto JCR: 2.531
- 3) Alves de Araujo Junior D, Motta F, **Fernandes GM**, Castro MEC, Sasaki LMP, Luna LP, Rodrigues TS, Kurizky PS, Soares AASM, Nobrega OT, Espindola LS, Zaconeta AM, Gomes CM, Martins-Filho OA, de Albuquerque CP, da Mota LMH. Neuroimaging assessment of pediatric cerebral changes associated with SARS-CoV-2 infection during pregnancy. Front Pediatr. 2023 May 24;11:1194114. doi: 10.3389/fped.2023.1194114. PMID: 37292371; PMCID: PMC10244818 Fator de impacto JCR:3.569
- 4) Sasaki LP, **Fernandes GM**, Silva APD, Motta F, Siracusa C, Rabelo IP, Junior ADS, França PS, Kurisky P, Tristao RM, de Albuquerque C, Gomes C, Maria da Mota L, Zaconeta A. Cerebrospinal fluid analysis of pregnant women at early stages of COVID-19. Taiwan J Obstet Gynecol. 2022 Jul;61(4):672-674. doi: 10.1016/j.tjog.2022.03.043. Epub 2022 May 23. PMID: 35779919; PMCID: PMC9124920. Fator de impacto JCR:1.944

9. APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

“Efeitos do SARS CoV-2 sobre gestação, parto, puerpério, período neonatal e desenvolvimento infantil: estudo de coortes, prospectivo multicêntrico”
HUB-EBSERH

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “Efeitos do SARS CoV-2 sobre gestação, parto, puerpério, período neonatal e desenvolvimento infantil: estudo de coortes, prospectivo multicêntrico”, que significa “Estudo do impacto da infecção pelo novo coronavírus na gestação e desenvolvimento de crianças” que está sob a responsabilidade da pesquisadoras: Dra. LIZANDRA MOURA PARAVIDINE SASAKI, Hospital Universitário de Brasília, Fone (61) 98424-8707 (coordenadora da parte das gestantes e puérperas) e Dr. GERALDO MAGELA FERNANDES (coordenador da parte das crianças), Universidade de Brasília, Fone (61) 981070071. Os coordenadores podem ser encontrados na Maternidade do Hospital Universitário de Brasília de segunda a sexta-feira de 8 às 12h.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com os responsáveis por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assinie ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você tem total liberdade para decidir participar ou recusar-se. Enfatizamos que a sua recusa não lhe trará qualquer prejuízo e que caso decida participar, também terá o direito de abandonar a pesquisa a qualquer momento, sem que ocorra nenhuma penalização.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- **Descrição da pesquisa:** Você foi convidada a participar desta pesquisa para estudarmos o impacto da pandemia pelo novo corona vírus 2019 - SARS-Cov-2- durante a gestação de seu filho (a) e o como pode influenciar no crescimento e desenvolvimento da criança. O objetivo deste estudo é acompanhar a evolução de pacientes gestantes que foram infectados pelo novo corona vírus 2019 (SARS-Cov-2) e verificar se há algum impacto na saúde do feto, na saúde materna e, após nascimento, acompanhar se há algum impacto na saúde da criança até os 5 anos de idade. A infecção pelo Corona vírus 2019 ainda é muito recente e se sabe muito pouco de sua influência na saúde das gestantes e nos filhos de mães que foram contaminadas durante a gestação. Para participar será necessário, após a leitura e assinatura deste documento, que você faça o seu pré-natal no Hospital Universitário de Brasília (HUB) ou nos serviços supervisionados pela pesquisa e posteriormente leve o seu filho para o seguimento do crescimento e desenvolvimento no Ambulatório do HUB ou nos serviços supervisionados. Os procedimentos do estudo – coletas de informações relativas à sua saúde, exames laboratoriais, exames radiológicos, coleta de sangue – não são diferentes daqueles que você faria no pré-natal e na avaliação do Crescimento e Desenvolvimento do seu filho.
- **Período de participação no estudo:** após a primeira avaliação, você deverá retornar para as consultas de pré-natal conforme a rotina habitual, ou seja, mensalmente até a 34ª semana de gestação, quinzenalmente até a 36ª semana e semanalmente até o parto. As consultas do seguimento da criança ocorrerão da mesma como orienta o Ministério da Saúde: 1º, 2º, 4º, 6º, 9º e 12º mês no primeiro ano de vida e após 1 ano, de 6 em 6 meses, até completar 5 anos de idade.
- **Riscos para o voluntário da pesquisa:** algumas gestantes podem ter vergonha ou medo de preconceito por terem adquirido a COVID-19. Para evitar isso, criamos um ambulatório de pré-natal especialmente para as participantes deste estudo, além de garantirmos que todos os dados serão tratados em segredo. A coleta de sangue para exames laboratoriais será realizada em uma veia do seu braço, com agulha e seringa esterilizadas, mas pode haver o risco de equimose (mancha roxa) ou sangramento local. Para reduzir esse risco, a coleta será realizada por uma pessoa com experiência. Além do sangue, a placenta e o sangue do cordão umbilical também serão encaminhados para estudos no laboratório. Caso você ou seu bebê precisem fazer uma anestesia ou punção na coluna por outro motivo, o líquido também será estudado. No caso da criança ela será submetida a uma ressonância magnética de crânio ainda na maternidade, o exame é indolor, será realizado com a criança dormindo, não será realizado se for necessária sedação. Não serão solicitados exames de sangue da criança que forem diferentes da rotina clínica habitual, exceto para pesquisa da presença do corona vírus 19 ou anticorpos anti-corona vírus 19 no sangue. A criança também terá risco de hematoma (mancha roxa) e sangramento no local da coleta que é habitualmente no dorso da mão. Para diminuir estes eventos a coleta desta amostra de sangue será feita junto com coletas de sangue que já seriam necessárias, como o teste do pezinho. Caso você ou a criança venha a apresentar as alterações relacionadas à coleta de sangue, você deverá fazer compressas de água quente em casa e se não melhorar, deve procurar o responsável por esta pesquisa no hospital ou através do telefone listado acima (pode fazer ligações a cobrar).

Rubrica Pesquisadores _____

Rubrica Participante _____

APÊNDICE 2 – Planilha de Dados do Estudo



PROUDEST

Pregnancy Outcome and Child Development
Effects of SARS-CoV-2 Infection Trial



Planilha de Dados Neonatais							
IDENTIFICAÇÃO							
Prontuário:			Nome: RN de _____				
DN: ___/___/___			Sexo: () Feminino () Masculino () Indeterminado				
IG: ___ sem ___ dias			Antropometria: P: ___ g E: ___ cm PC: ___ cm				
SALA DE PARTO							
APGAR			Classificação:				
1º () 5º () 10º ()			() Termo () Pretermo () Pós-termo () PIG () AIG () GIG				
EXAME FÍSICO							
Fácies:			() Atípica () Típica _____				
Pele:			() Normal () Aplasia () Hemangioma () Outro _____				
ACV:			() Normal () Sopro				
AR:			BSA () 0 () 1 () 2 () 3 () 4 () 5 () 6 () 7 () 8 () 9				
ABD:			() Normal () Alterado				
Genitália:			() Típica () Atípica				
Ost.Musc.			() Ortolani + () Ortolani - () Outro				
Neuro:			() Tônus Normal () Tônus Anormal				
DESTINO:			() Alcon () UTIN				
UTI NEONATAL (se for o caso)							
SNAPPE II:			Dias de Internação: _____				
Suporte Vent. (em dias): O2 ___ dias Não Invasiva: ___ dias VM: _____							
Ecocardio: () PCA () CIV () CIA () TGA () T4F () HP () Normal							
USTF: () HIC I () HIC II () HIC III () HIC IV () Outros							
ROP: () Sim () Não ECN: () Sim () Não Hemoc. Positiva: () Sim () Não							
DBP: () Leve () Moderada () Grave							
ALOJAMENTO CONJUNTO							
Icterícia: () Sim () Não			Fototerapia: () Sim () Não				
Triagens Neonatais:							
ROV: () Normal () Alterado			Oxim: () Normal () Alterado				
EOA: () Normal () Alterado			Pezinho: () N () Alterado ___ 17OHProg _____				
Aleitamento na Alta: () SME () Misto () Fórmula							
LABORATORIAL							
Citoc.1	Citoc.2	Citoc.3	Citoc.4	Citoc.4	Citoc.5	Citoc.6	Citoc.7
Citoc.8	Citoc.8	Citoc.8	Citoc.9	IgG	IgM	Prolact.M	
EXAME DE IMAGEM							
Ecotransfontanela: () Normal () Alterado _____							
ANATOMO PATOLÓGICO DA PLACENTA							
Laudos: () Normal () Alterado _____							

APÊNDICE 4 - Artigo com dados originais dos mediadores inflamatórios em gestantes – pré requisito para a defesa do doutorado

Artigo publicado em *Frontiers Immunology* – FI (2023): 8.787 – Qualis A1



OPEN ACCESS

EDITED BY
Diana Boraschi,
Chinese Academy of Science (CAS), China

REVIEWED BY
Olukemi Amodu,
University of Ibadan, Nigeria
Marcelo Cavalcante,
University of Fortaleza, Brazil

*CORRESPONDENCE
Geraldo Magela Fernandes
✉ geraldomafer@gmail.com
Olindo Assis Martins-Filho
✉ olindo.filho@fiocruz.br

†These authors have contributed equally to this work

‡These authors share senior authorship

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Cytokines and Soluble
Mediators in Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 01 March 2023
ACCEPTED 30 March 2023
PUBLISHED 12 April 2023

CITATION
Fernandes GM, Sasaki LMP,
Jardim-Santos GP, Schulte HL,
Motta F, da Silva AP, de Carvalho AO,
Pereira YR, Alves Cdo,
de Araujo Júnior DA, Mendonça-Silva DL,
Costa KN, de Castro MEC, Lauand L,
Nery RdR, Tristão R, Kurizky PS,
Nóbrega OdT, Espindola LS, de
Castro LCG, Alpoim PN, Godoi LC,
Dusse LMSA, Coelho-dos-Reis JGA,
Amaral LRd, Gomes MdS, Bertarini PLL,
Brito-de-Sousa JP, Costa-Rocha IAd,
Campi-Azevedo AC,
Peruhype-Magalhães V,
Teixeira-Carvalho A, Zaconeta AM,
Soares AAdSM, Valim V, Gomes CM,
de Albuquerque CP, Martins-Filho OA and
da Mota LMH (2023) Panoramic snapshot
of serum soluble mediator interplay in
pregnant women with convalescent
COVID-19: an exploratory study.
Front. Immunol. 14:1176898.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1176898

Panoramic snapshot of serum soluble mediator interplay in pregnant women with convalescent COVID-19: an exploratory study

Geraldo Magela Fernandes^{1,2†},
Lizandra Moura Paravidine Sasaki^{1,2†},
Gabriela Proffrio Jardim-Santos¹, Heidi Luise Schulte¹,
Felipe Motta¹, Ângelo Pereira da Silva²,
Aleida Oliveira de Carvalho², Yacara Ribeiro Pereira²,
Caroline de Oliveira Alves³, David Alves de Araújo Júnior²,
Dayde Lane Mendonça-Silva², Karina Nascimento Costa³,
Maria Eduarda Canellas de Castro^{1,2}, Lucas Lauand³,
Rodrigo de Resende Nery³, Rosana Tristão³,
Patricia Shu Kurizky^{1,2}, Otávio de Toledo Nóbrega¹,
Laila Salmen Espindola¹, Luiz Cláudio Gonçalves de Castro^{1,3},
Patrícia Nessler Alpoim⁴, Lara Carvalho Godoi⁴,
Luci Maria Sant Ana Dusse⁴,
Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis⁵,
Laurence Rodrigues do Amaral⁶, Matheus de Souza Gomes⁶,
Pedro Luiz Lima Bertarini⁶, Joaquim Pedro Brito-de-Sousa⁷,
Ismael Artur da Costa-Rocha⁷, Ana Carolina Campi-Azevedo⁷,
Vanessa Peruhype-Magalhães⁷, Andrea Teixeira-Carvalho⁷,
Alberto Moreno Zaconeta^{3†},
Alexandre Anderson de Sousa Munhoz Soares^{1,3},
Valéria Valim^{8,9}, Ciro Martins Gomes^{1,3,10},
Cleandro Pires de Albuquerque^{1,2}, Olindo Assis Martins-Filho^{7,†}
and Licia Maria Henrique da Mota^{1,2,10†}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Brazil,

²Hospital Universitário de Brasília, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Brazil, ³Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Brazil, ⁴Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁵Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁶Laboratório de Bioinformática e Análises Moleculares, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, Brazil,

⁷Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Minas), Belo Horizonte, Brazil, ⁸Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes, Universidade Federal do Espírito Santo (HUCAM-UFES), Vitória, Brazil, ⁹Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva (PPGSC), Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil, ¹⁰Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Brazil

Introduction: SARS-CoV-2 infection during pregnancy can induce changes in the maternal immune response, with effects on pregnancy outcome and offspring. This is a cross-sectional observational study designed to characterize the immunological status of pregnant women with convalescent COVID-19 at distinct pregnancy trimesters. The study focused on providing a clear snapshot of the interplay among serum soluble mediators.

Methods: A sample of 141 pregnant women from all prenatal periods (1st, 2nd and 3rd trimesters) comprised patients with convalescent SARS-CoV-2 infection at 3–20 weeks after symptoms onset (COVID, n=89) and a control group of pre-pandemic non-infected pregnant women (HC, n=52). Chemokine, pro-inflammatory/regulatory cytokine and growth factor levels were quantified by a high-throughput microbeads array.

Results: In the HC group, most serum soluble mediators progressively decreased towards the 2nd and 3rd trimesters of pregnancy, while higher chemokine, cytokine and growth factor levels were observed in the COVID patient group. Serum soluble mediator signatures and heatmap analysis pointed out that the major increase observed in the COVID group related to pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ and IL-17). A larger set of biomarkers displayed an increased COVID/HC ratio towards the 2nd (3x increase) and the 3rd (3x to 15x increase) trimesters. Integrative network analysis demonstrated that HC pregnancy evolves with decreasing connectivity between pairs of serum soluble mediators towards the 3rd trimester. Although the COVID group exhibited a similar profile, the number of connections was remarkably lower throughout the pregnancy. Meanwhile, IL-1Ra, IL-10 and GM-CSF presented a preserved number of correlations (≥ 5 strong correlations in HC and COVID), IL-17, FGF-basic and VEGF lost connectivity throughout the pregnancy. IL-6 and CXCL8 were included in a set of acquired attributes, named COVID-selective (≥ 5 strong correlations in COVID and < 5 in HC) observed at the 3rd pregnancy trimester.

Discussion and conclusion: From an overall perspective, a pronounced increase in serum levels of soluble mediators with decreased network interplay between them demonstrated an imbalanced immune response in convalescent COVID-19 infection during pregnancy that may contribute to the management of, or indeed recovery from, late complications in the post-symptomatic phase of the SARS-CoV-2 infection in pregnant women.

KEYWORDS

chemokines, cytokines, growth factors, COVID-19, pregnancy

1 Introduction

In March 2020, the World Health Organization (WHO) characterized the outbreak of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) disease (COVID-19) as a pandemic, having since confirmed more than 655 million COVID-19 cases, 6.6 million of which resulted in death (1). SARS-CoV-2 is transmitted through airborne droplets, respiratory secretions, and direct contact. The clinical symptoms relating to the COVID-19 disease were primarily respiratory, and later reported as multisystemic effects. COVID-19 illness symptoms can be

asymptomatic, mild, moderate, severe, or critical (2–4). Fever, cough, dyspnea, and myalgia were the most common mild symptoms. The pathogenesis of COVID-19 has been strongly associated with an unbalanced immune response; however, the pathophysiology of the disease remains under investigation (5–7).

Multiple studies concluded that pregnant women are a high-risk population for the COVID-19 disease. Infectious diseases in pregnancy are regularly considered a critical condition. Physiological changes during pregnancy have significant effects on the immune system, cardiopulmonary system and coagulation, and these changes may result in an altered response to COVID-19

infection (3, 8–11). Cytokine levels during pregnancy could be responsible for metabolic imprinting as cytokines are transferable from maternal to fetal circulation and are capable of modulating placental nutrient transfer. Maternal inflammation may induce metabolic reprogramming at several levels, from the periconceptual period onwards. Such processes and their consequences on the maternal and perinatal periods have not been extensively studied to date. Moreover, the maternal immune activation triggered by COVID-19 can have impacts for the mother, pregnancy outcome and offspring (12, 13). The understanding such phenomena should contribute to the proper management of children born to SARS-CoV-2-infected mothers (14).

The aim of the present study was to conduct a prospective observational study designed to characterize the immunological status of pregnant women with convalescent COVID-19, focusing on an overall snapshot of the interplay between serum soluble mediators.

2 Materials and methods

2.1 Study population

This cross-sectional observational study was conducted between July 2020 and December 2021 during the COVID-19 pandemic in the Federal District of Brazil during circulation of the SARS-CoV-2 B.1.1.28 and B.1.1.33 strains. A total of 141 participants were enrolled as non-probability convenience sampling, including pregnant women with convalescent SARS-CoV-2 infection (COVID, n=89) at 3–20 weeks after symptoms onset during the prenatal period (1st, 2nd and 3rd trimesters), together with a healthy control group composed of age-matched pre-pandemic non-infected pregnant women (HC, n=52).

The COVID-19 pregnant women were recruited at two public hospitals - the University Hospital of Brasília and the Asa Norte

Regional Hospital, both public reference centers for COVID-19 in the Federal District of Brazil and participants of a large research project named PROUDEST (15). The COVID group comprised pregnant women aged 18–44 years, with a median age of 31 years. This group was further categorized into subgroups according to the pregnancy trimester, referred to as: 1st (n=7), 2nd (n=34) and 3rd (n=48). COVID-19 diagnosis was confirmed by a documented positive RT-PCR test using a nasopharyngeal swab or rapid test (Biomanguinhos, FIOCRUZ, Brazil) for IgM or IgG, during pregnancy. Most of the COVID-19 group (97%, 86 out of 89) presented the non-severe form of the disease. The most common symptoms were: Anosmia (68%), runny nose and/or nasal congestion (68%), headache (67%), ageusia (63%), myalgia (57%), cough (43%), fever (43%), dyspnea (31%), sore throat (31%), asthenia (22%), diarrhea (17%), nausea and vomiting (11%), joint pain (5%), dizziness (4%) and skin diseases (2%). SARS-CoV-2 infection during pregnancy was associated with important adverse maternal and neonatal outcomes, including gestational diabetes mellitus (37%), Apgar score at first minute ≤ 7 (22%), systemic arterial hypertension (18%), fetal restriction growth (11%), preterm labor (11%), acute fetal distress (8%), Apgar score at fifth minute ≤ 7 (5%) and preeclampsia (3%).

The HC group comprised a selected non-probability convenience sampling from a biorepository maintained at Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Minas), Belo Horizonte, Brazil. The HC group comprised pregnant women, aged 18–42 years, with a median age of 28 years. The healthy control group was composed by primiparous with no previous history or current status of obesity, systemic arterial hypertension, diabetes mellitus and without records of pre-eclampsia. The HC group was further categorized into subgroups according to pregnancy trimester, referred to as: 1st (n=21), 2nd (n=10) and 3rd (n=21).

The Table 1 summarize the major demographic and clinical features of the study population.

TABLE 1 Demographic and clinical features of the study population.

Characteristics	GROUPS	
	Healthy Controls – HC (n=52)	COVID-19 – COVID (n=89)
Age, median (min-max)	28 (18-42)	31 (18-44)
Obstetric History		
Previous Pregnancies, median (min-max)	0% (0)	2 (0-6)
Abortions, median (min-max)	0% (0)	0 (0-2)
Complications* % (n)	0% (0)	24% (21)
Current Study		
Obesity % (n)	0% (0)	11% (10)
SAH % (n)	0% (0)	18% (16)
Diabetes % (n)	0% (0)	37% (33)
Pre-eclampsia % (n)	0% (0)	3% (3)

SAH, systemic arterial hypertension. *Obesity, SAH, diabetes, pre-eclampsia.

All study participants provided written informed consent prior to inclusion in accordance with the Helsinki Declaration and Resolution 466/2012 from the Brazilian National Health Council for research involving human subjects. This study was recorded on the Brazilian Registry of Clinical Trials Platform (ReBEC, RBR-65qxs2) and approved by the National Commission for Ethics in Research in Brazil (CONEP, CAAE 32359620.0.0000.5558). The anonymization strategy to protect the identity of participants was achieved by replacing the direct identifiers by standardized alphanumeric codes (*PRAxxxPNy* and *PRBxxxPNy*), where "PR" refer to the PROUDEST project name (15), "A" and "B" refers to the hospital unit, the "xxx" represent the sequential number of patient inclusion, "PN" refer to prenatal period and "y" the trimester of sample collection.

2.2 Biological samples

Whole blood sample (10 mL) were collected from each participant in vacuum tubes without anticoagulant by venipuncture at the first prenatal appointment or upon enrolment in the study. Serum samples were obtained by centrifugation (1400 x g, 10 min, 4°C) of original samples within 6 h after blood collection. The serum specimens were aliquoted and stored at -80°C until quantification of serum soluble mediators.

2.3 Quantification of serum soluble mediators

Serum soluble mediators were quantified by a high-throughput Luminex microbead multiplex assay (Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The manufacturer's instructions were followed to determine the concentrations of chemokines (CXCL8; CCL11; CCL3; CCL4; CCL2; CCL5; CXCL10), pro-inflammatory cytokines (IL-1β; IL-6; TNF-α; IL-12; IFN-γ; IL-15; IL-17), regulatory cytokines (IL-1Ra; IL-4; IL-5; IL-9; IL-10; IL-13) and growth factors (FGF-basic; VEGF; PDGF; G-CSF; GM-CSF; IL-2; IL-7). The assays were conducted in parallel batches by a trained technician at the flow cytometry facility at FIOCRUZ-Minas. The concentrations of serum soluble mediators (pg/mL) were obtained according to a 5-parameter logistic curve fit regression of standard curves.

2.4 Statistical analysis

Descriptive statistics were carried out using the Prism 8.0.2 software (GraphPad Software, San Diego, USA). Data normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. Considering the nonparametric distribution of all data sets, multiple comparisons

amongst HC and COVID subgroups were carried out using the Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-test. Additionally, comparative analysis between HC and COVID at matching trimesters was performed using the Mann-Whitney test. In all cases, statistical significance was considered at $p < 0.05$.

The serum soluble mediator signatures were calculated as the proportion (%) of pregnant women with serum levels above the reference values (cut-off) defined as the median Z-score of each soluble mediator detected for all HC along the 1st, 2nd and 3rd trimesters (CXCL8=-0.3; CCL11=-0.3; CCL3=-0.3; CCL4=-0.3; CCL2=-0.4; CCL5=-0.2; CXCL10=-0.2; IL-1β=-0.3; IL-6=-0.3; TNF-α=-0.3; IL-12=-0.3; IFN-γ=-0.4; IL-15=-0.5; IL-17=-0.4; IL-1Ra=-0.4; IL-4=-0.3; IL-5=-0.2; IL-9=-0.2; IL-10=-0.2; IL-13=-0.4; FGF-basic=-0.5; PDGF=-0.4; VEGF=-0.4; G-CSF=-0.2; GM-CSF=-0.4; IL-2=-0.4; IL-7=-0.3). Additionally, trimester-matching signatures were assembled, considering the reference values (cut-off) defined as the median Z-score of each soluble mediator detected for HC trimester subgroups at 1st (CXCL8 = 0.2; CCL11 = 0.1; CCL3 = 0; CCL4=-0.6; CCL2 = 0.4; CCL5=-0.2; CXCL10=-0.7; IL-1β=-0.2; IL-6 = 1.6; TNF-α=-0.1; IL-12=-0.2; IFN-γ=0.1; IL-15=-0.5; IL-17 = 0.1; IL-1Ra=0.1; IL-4=-0.5; IL-5=-0.1; IL-9 = 0.5; IL-10=-0.2; IL-13 = 0.2; FGF-basic=0.3; PDGF=0.2; VEGF=0.1; G-CSF=-0.2; GM-CSF=0.1; IL-2=-0.4; IL-7=-0.2), 2nd (CXCL8=-0.3; CCL11=0.2; CCL3=-0.3; CCL4=-0.2; CCL2=-0.5; CCL5=-0.1; CXCL10=-0.6; IL-1β=-0.3; IL-6=-0.4; TNF-α=-0.3; IL-12=-0.3; IFN-γ=-0.4; IL-15 = 0.2; IL-17=-0.2; IL-1Ra=-0.5; IL-4 = 0.2; IL-5=-0.2; IL-9=-0.6; IL-10=-0.2; IL-13=0.4; FGF-basic=-0.6; PDGF=0.6; VEGF=-0.2; G-CSF=-0.1; GM-CSF=-0.6; IL-2=-0.1; IL-7=-0.2) and 3rd trimesters (CXCL8=-0.4; CCL11=-0.4; CCL3=-0.3; CCL4 = 0.3; CCL2=-0.5; CCL5 = 0.1; CXCL10 = 0.6; IL-1β=-0.4; IL-6=-0.3; TNF-α=-0.3; IL-12=-0.3; IFN-γ=-0.4; IL-15=-0.5; IL-17=-0.4; IL-1Ra=-0.6; IL-4=-0.3; IL-5=-0.2; IL-9=-0.8; IL-10=-0.3; IL-13=-0.4; FGF-basic=-0.6; PDGF=-0.7; VEGF=-0.4; G-CSF=-0.2; GM-CSF=-0.7; IL-2=-0.5; IL-7=-0.3). The serum soluble mediators displaying a proportion above 50% in pregnant women were included in the set of biomarkers with increased levels.

Heatmap constructs were assembled using conditional formatting in Microsoft Excel to illustrate the overall profile of serum soluble mediator signatures of the COVID and HC subgroups along the pregnancy trimesters. The ratio between the proportion of pregnant women with serum levels above the reference values in the COVID group in relation to HC (% COVID/%HC) was also assessed by comparative analysis.

Serum-soluble mediator networks were built based on correlation analysis (Pearson and Spearman rank tests) between pairs of serum-soluble mediators. Only significant strong correlations ($p < 0.05$ and "r" scores $\geq |0.67|$) were employed to construct the comprehensive networks. The open-source Cytoscape software (available at <https://cytoscape.org>) was used to create cluster network layouts comprising the 4 categories of serum soluble mediators - chemokines, pro-inflammatory cytokines, regulatory cytokines, and growth factors. Descriptive analysis of

serum soluble mediator networks was performed by considering the ascendant number of strong correlations to identify the set of biomarkers with five or more strong correlations (≥ 5). Venn Diagram analysis (available at (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)) was performed to assess the preserved (common), lost or acquired (selective) serum soluble mediators with ≥ 5 strong correlations in COVID subgroups compared to trimester-matching HC.

The MATLAB software was employed for Principal Component Analysis (PCA). The PCA data was assembled to verify the ability of serum soluble mediators to cluster convalescent COVID-19 pregnant women from HC, as well as subgroups of COVID-19 as compared to trimester-matching HC. The PCA analysis enabled data dimensionality reduction.

3 Results

3.1 Levels of serum soluble mediators in convalescent COVID-19 at distinct pregnancy trimesters

The levels of chemokines, pro-inflammatory cytokines, regulatory cytokines and growth factors were measured in serum samples from pregnant women with convalescent COVID-19 at 3–20 weeks after symptoms onset (COVID) and compared with those detected in trimester-matching pre-pandemic non-infected pregnant women as a healthy control (HC). The results are presented in Figures 1 and 2.

In general, healthy pregnant women presented a progressive decrease in most serum soluble mediators towards the 2nd and 3rd pregnancy trimester, including: chemokines (CXCL8, CCL11, CCL3 and CCL2); pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ and IL-17); regulatory cytokines (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 and IL-13), and growth factors (FGF-basic, VEGF, PDGF, GM-CSF and IL-7). Conversely, progressive increases in CCL4, CCL5, CXCL10 and G-CSF were observed in the HC group. No difference was observed in the HC group for IL-15 and IL-2 (Figures 1, 2).

Overall, higher levels of the most soluble mediators were observed in convalescent COVID-19 pregnant women compared to the healthy controls, especially at the 2nd and 3rd trimesters, including higher levels of CXCL8; CCL11; CCL2; CCL3; IL-1 β ; IL-6; TNF- α ; IL-12; IFN- γ ; IL-17; IL-1Ra; IL-5; IL-9; IL-10; IL-13; FGF-basic; VEGF; and GM-CSF. Conversely, lower levels of CCL4, CCL5, CXCL10, G-CSF and IL-7 were observed towards the 2nd and 3rd trimesters in the COVID group compared to the HC group (Figures 1, 2).

Additional analysis amongst the COVID subgroups along the pregnancy trimesters demonstrated an inverted profile of CCL3, IL-1Ra and FGF-basic towards higher levels in the 3rd trimester (Figures 1, 2).

Supplementary Figure 1 summarizes the major changes observed in serum soluble mediators along the trimesters of healthy and convalescent COVID-19 pregnancy.

3.2 Serum soluble mediator signatures in convalescent COVID-19 at distinct pregnancy trimesters

Serum soluble mediator signatures were assembled as the percentage of pregnant women with serum levels above the reference values defined as the median Z-score of each soluble mediator detected in all healthy controls along the pregnancy. The results are presented in Figure 3.

Data analysis demonstrated that the proportion of healthy pregnant women with high levels of serum soluble mediators progressively decreased towards the 2nd and 3rd pregnancy trimesters. These data further corroborated that a healthy pregnancy course has a progressive decrease in most serum soluble mediators towards the 2nd and 3rd trimesters, except for CCL4, CCL5 and CXCL10 (Figure 3A).

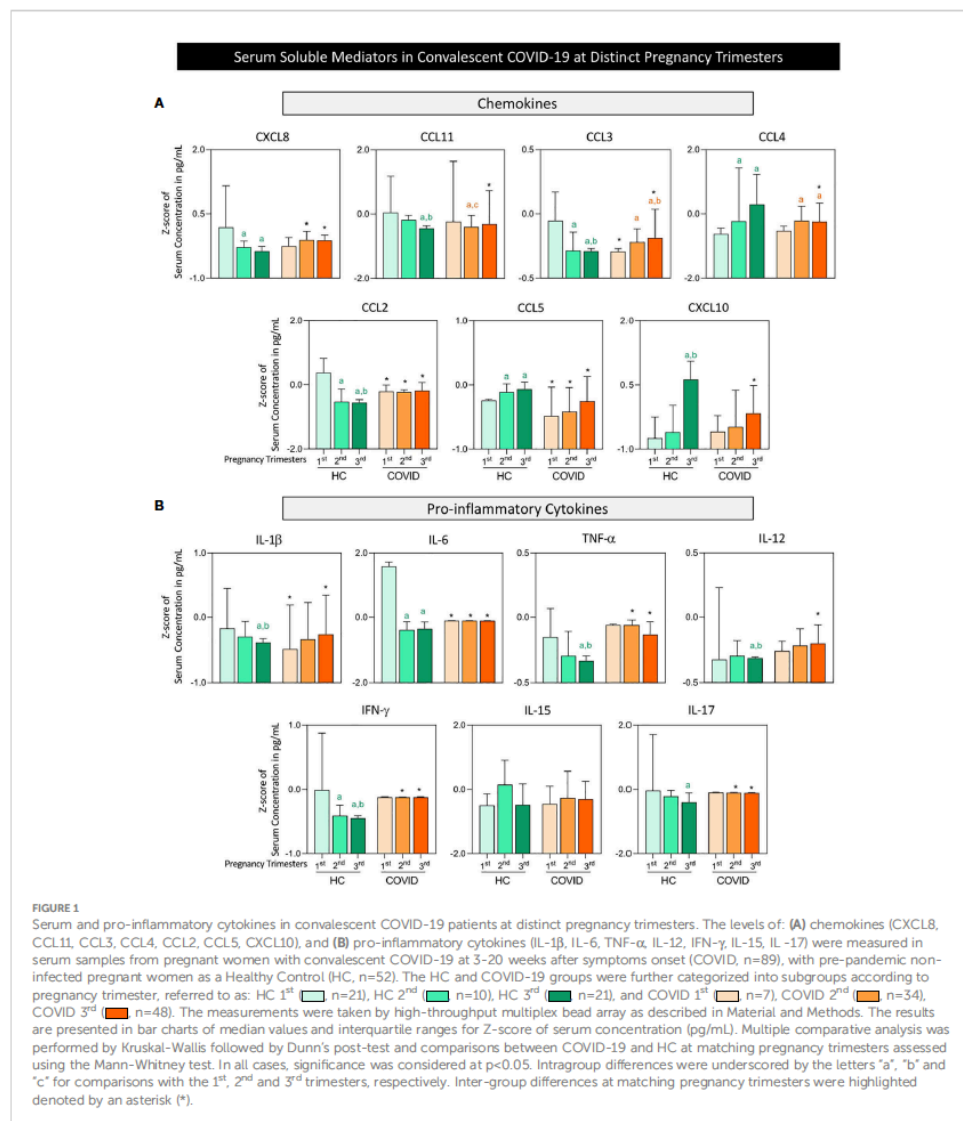
On the other hand, the proportion of pregnant women with convalescent COVID-19 presenting high serum soluble mediator levels progressively increased from the 1st to the 3rd pregnancy trimester (Figure 3A). Heatmap constructs further illustrated that the major increase in serum soluble mediators observed in pregnant women with convalescent COVID-19 occurred in pro-inflammatory cytokines, namely IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ and IL-17 (Figure 3B).

The profile of serum soluble mediators was further characterized as the ratio (%COVID/%HC), assessed by dividing the percentage of pregnant women with soluble mediator levels above the reference values observed in the COVID group by the percentage of trimester-matching HC patients. Using this strategy, the results confirmed that a larger set of biomarkers presented a high ratio (%COVID/%HC) towards the 2nd and 3rd trimester. In the 2nd pregnancy trimester, increased ratios were observed for IL-6, IFN- γ , IL-5 and GM-CSF (3x increase) in the COVID-19 group. A larger set of serum soluble mediators with increased ratios was identified for COVID-19 groups at the 3rd pregnancy trimester, including CXCL8, CCL11, IL-5 and PDGF (3x increase), CCL3, IL-1 β , IFN- γ , IL-17 and IL-13 (4x increase), CCL2, TNF- α (7x) along with IL-1Ra, IL-9, GM-CSF and FGF-basic (5x, 9x, 9x, and 15x increase, respectively) (Figure 3C).

The signatures of serum soluble mediators were also assessed considering the reference values of trimester-matching healthy controls. The results are presented in the Supplementary Figure 2. Data reinforce that larger sets of serum soluble mediators with increased ratios were identified for the 2nd and 3rd pregnancy trimesters as compared with trimester-matching controls (Supplementary Figure 2).

3.3 Serum soluble mediator networks in convalescent COVID-19 at distinct pregnancy trimesters

Aimed at assessing a panoramic snapshot of serum soluble mediator interplay in pregnant women with convalescent COVID-19 and healthy controls, integrative networks were constructed

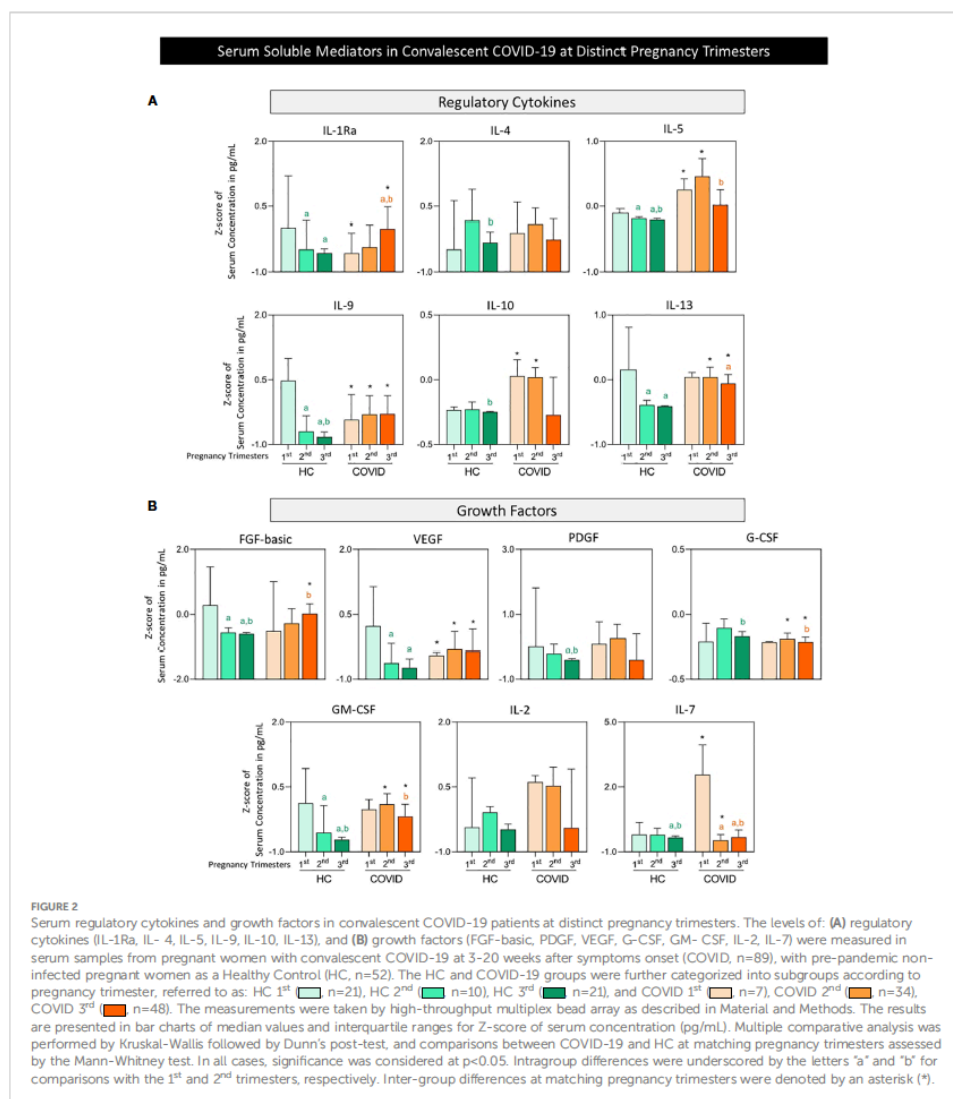


based on the overall correlation between pairs of molecules. The results are presented in **Figure 4**.

Data analysis demonstrated that healthy pregnancy evolves towards the 3rd trimester with an overall decrease in network connectivity (1st = 336; 2nd = 300 and 3rd = 112 strong correlations). Although pregnant women with convalescent COVID-19 exhibited a similar continuous decrease in network

connectivity towards the 3rd trimester (1st = 146; 2nd = 78 and 3rd = 70 strong correlations), the number of connections was remarkably lower in the COVID group compared to HC group (**Figure 4**).

Overall, the analysis of cluster connectivity during healthy pregnancy showed that pro-inflammatory cytokines presented more connections at the 1st and 2nd trimesters (96 and 92 strong



correlations, respectively), with growth factor predominance at the 3rd trimester (42 strong correlations). Conversely, the COVID group displayed a predominance of regulatory cytokines in the 1st trimester (47 strong correlations) with growth factor predominance in the 2nd and 3rd trimesters (24 and 21, respectively) (Figure 4).

In general, convalescent COVID-19 infection during pregnancy leads to a loss of network connectivity, with fewer strong correlations and changes in the predominance of connectivity amongst the categories of serum soluble mediators (Figure 4).

3.4 Descriptive analysis of serum soluble mediator networks in convalescent COVID-19 patients at distinct pregnancy trimesters

In order to provide a more comprehensive overview of the network connectivity between serum soluble mediators in pregnant women with convalescent COVID-19 and healthy controls along the pregnancy trimesters, a descriptive Venn diagram analysis was

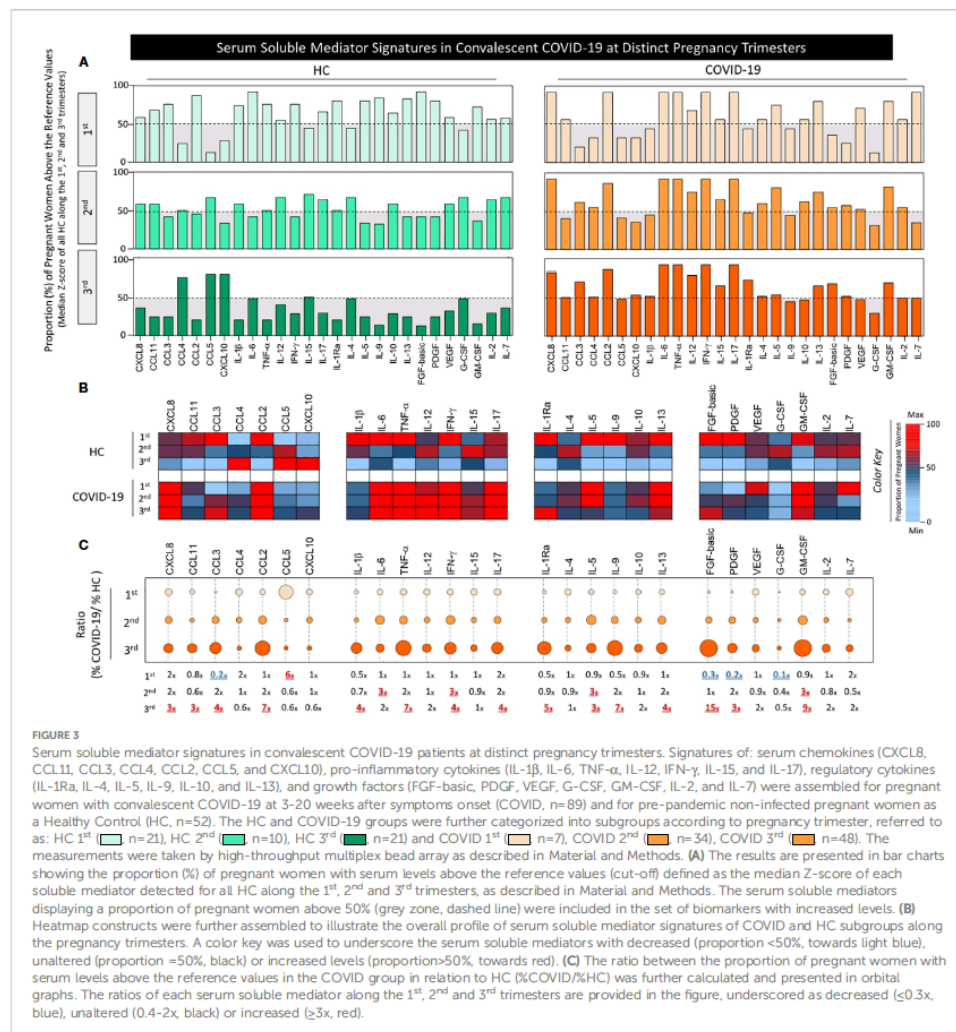


FIGURE 3

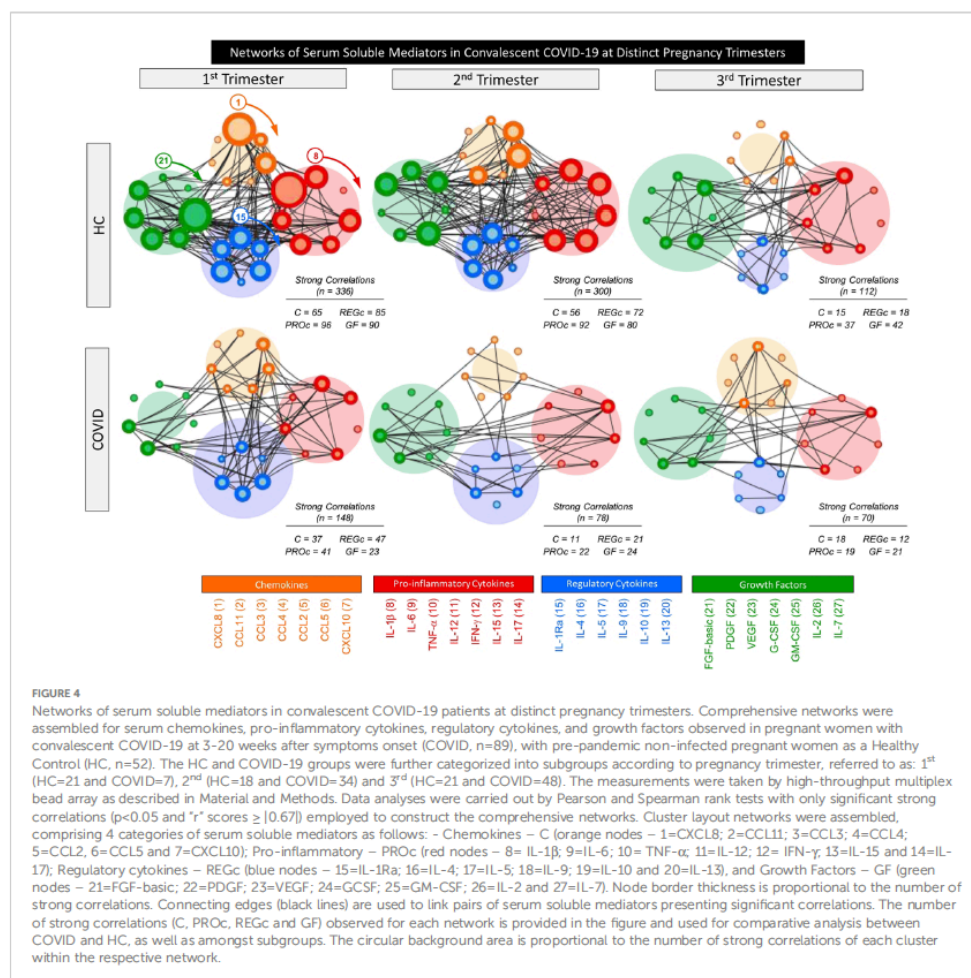
Serum soluble mediator signatures in convalescent COVID-19 patients at distinct pregnancy trimesters. Signatures of: serum chemokines (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, and CXCL10), pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-15, and IL-17), regulatory cytokines (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, and IL-13), and growth factors (FGF-basic, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2, and IL-7) were assayed for pregnant women with convalescent COVID-19 at 3–20 weeks after symptoms onset (COVID, n=89) and for pre-pandemic non-infected pregnant women as a Healthy Control (HC, n=52). The HC and COVID-19 groups were further categorized into subgroups according to pregnancy trimester, referred to as: HC 1st (n=21), HC 2nd (n=10), HC 3rd (n=21) and COVID 1st (n=7), COVID 2nd (n=34), COVID 3rd (n=48). The measurements were taken by high-throughput multiplex bead array as described in Material and Methods. (A) The results are presented in bar charts showing the proportion (%) of pregnant women with serum levels above the reference values (cut-off) defined as the median Z-score of each soluble mediator detected for all HC along the 1st, 2nd and 3rd trimesters, as described in Material and Methods. The serum soluble mediators displaying a proportion of pregnant women above 50% (grey zone, dashed line) were included in the set of biomarkers with increased levels. (B) Heatmap constructs were further assembled to illustrate the overall profile of serum soluble mediator signatures of COVID and HC subgroups along the pregnancy trimesters. A color key was used to underscore the serum soluble mediators with decreased (proportion <50%, towards light blue), unaltered (proportion =50%, black) or increased levels (proportion >50%, towards red). (C) The ratio between the proportion of pregnant women with serum levels above the reference values in the COVID group in relation to HC (%COVID-19/%HC) was further calculated and presented in orbital graphs. The ratios of each serum soluble mediator along the 1st, 2nd and 3rd trimesters are provided in the figure, underscored as decreased ($\leq 0.3x$, blue), unaltered (0.4–2x, black) or increased ($\geq 3x$, red).

performed to identify the set of biomarkers with preserved (common), lost or acquired (selective) attributes with five or more (≥ 5) strong correlations in COVID subgroups as compared to the trimester-matching HC group. The results are presented in the Figure 5.

Heatmap constructs were assembled to organize the serum soluble mediators with an ascending order of strong correlations and identify the set of biomarkers with five or more (≥ 5) strong correlations at each pregnancy trimester in the COVID and HC groups (Figure 5A).

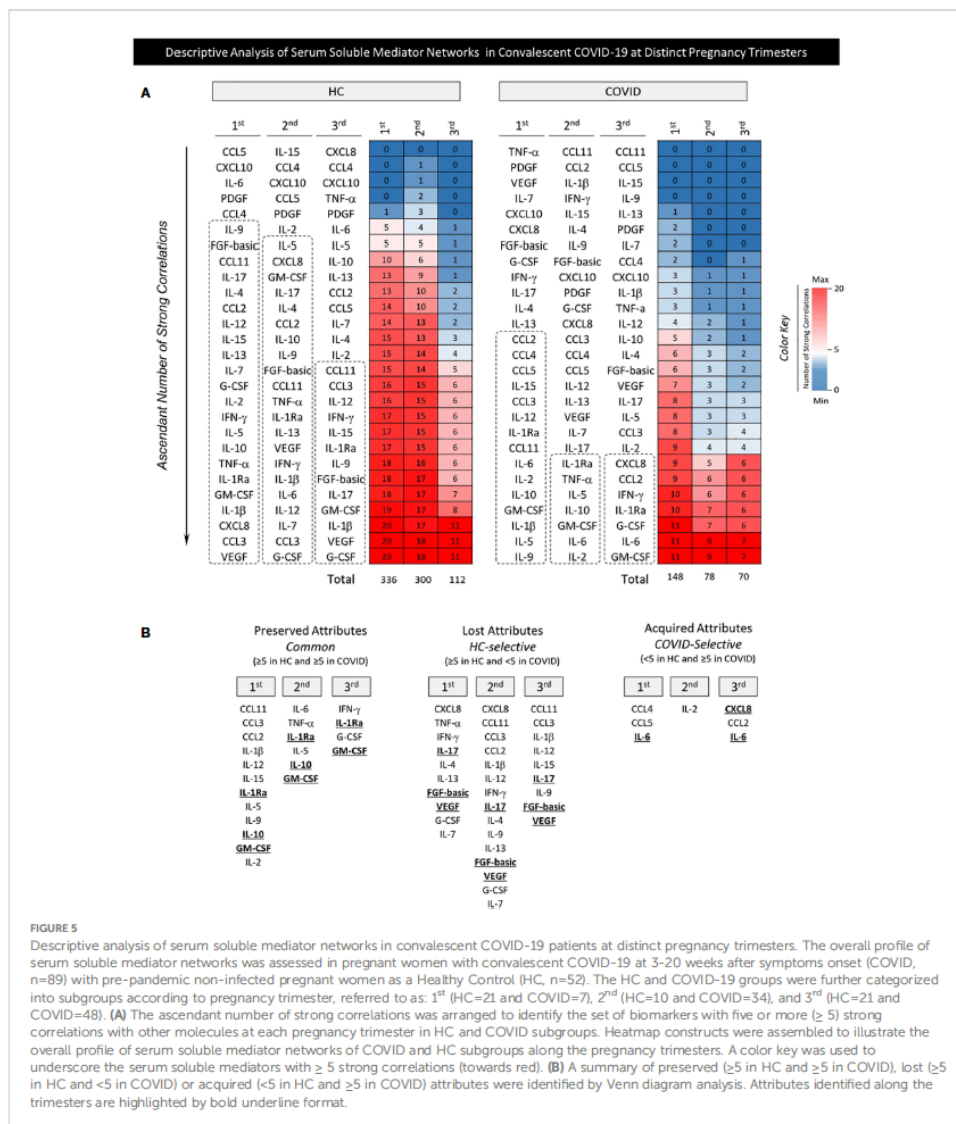
Data analysis demonstrated that the number of preserved attributes referred to as common in HC and COVID (≥ 5 strong correlations in HC and COVID) with five or more correlations progressively decreased from the 1st (n=12) to the 2nd (n=6) and 3rd trimesters (n=4). In detail: 1st: CCL11, CCL3, CCL2, IL-1 β , IL-12, IL-15, IL-1Ra, IL-5, IL-9, GM-CSF, and IL-2; 2nd: IL-6, TNF- α , IL-1Ra, IL-5, IL-10, GM-CSF and 3rd: IFN- γ , IL-1Ra, G-CSF, and GM-CSF.

The number of lost attributes referred to as HC-selective (≥ 5 strong correlations in HC and <5 strong correlations in COVID)



was higher in the 2nd trimester (n=15) compared to 1st (n=10) and 3rd (n=9). In detail: 1st: CXCL8, TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-13, FGF-basic, VEGF, G-CSF, and IL-7; 2nd: CXCL8, CCL11, CCL3, CCL2, IL-1 β , IL-12, IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-9, IL-13, FGF-basic, VEGF, G-CSF, and IL-7; 3rd: CCL11, CCL3, IL-1 β , IL-12, IL-15, IL-17, IL-9, FGF-basic, and VEGF. A set of acquired attributes, named COVID-selective (<5 strong correlations in HC and ≥ 5 strong correlations in COVID) were identified in each trimester: 1st (n=3): CCL4, CCL5, and IL-6, 2nd: (n=1) IL-2, and 3rd (n=3) CXCL8, CCL2 and IL-6 (Figure 5B).

From an overall perspective, a pronounced decrease in network connectivity between serum soluble mediators was observed in convalescent COVID-19 infection during pregnancy as demonstrated by the fewer number of molecules establishing strong correlations driven by an imbalance between preserved, lost and acquired attributes in the COVID group. While IL-1Ra, IL-10 and GM-CSF presented a preserved number of correlations (≥ 5 strong correlations in HC and COVID), IL-17, FGF-basic and VEGF lost connectivity throughout pregnancy. IL-6 (at 1st and 3rd trimesters) and CXCL8 (at 3rd trimester) were included in a set of acquired

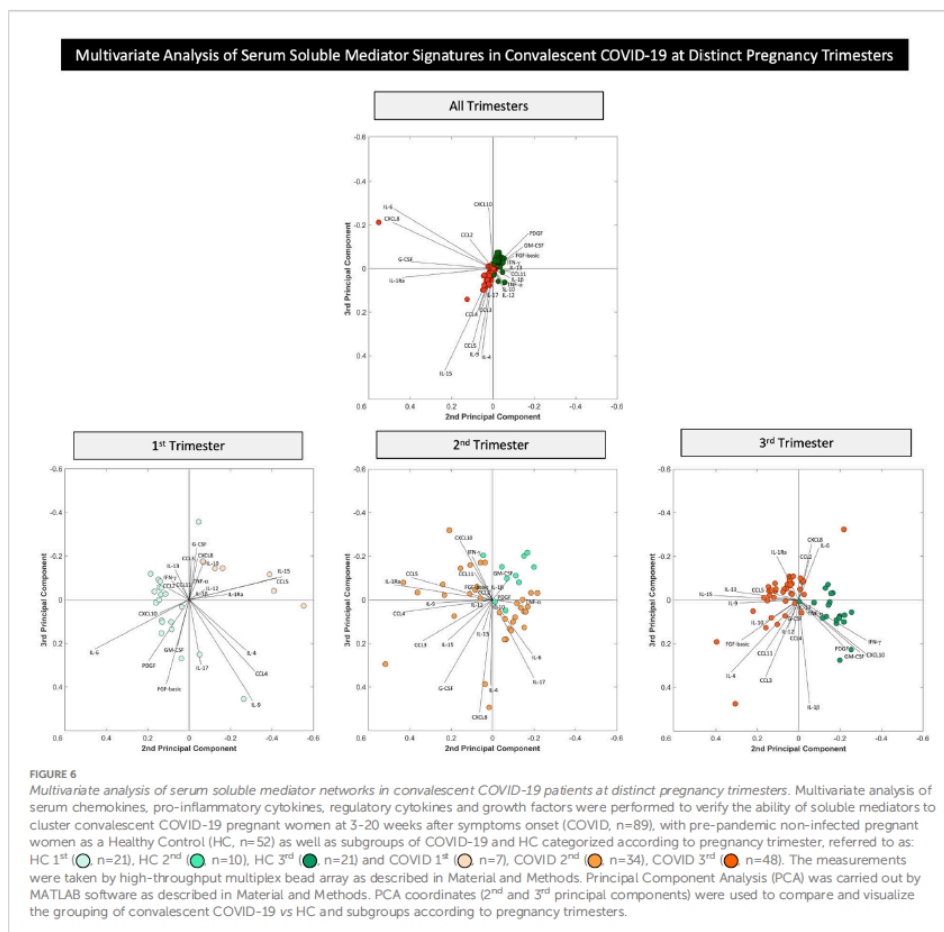


attributes, named COVID-selective (≥5 strong correlations in COVID and <5 in HC) (Figure 5B, bold underline attributes).

3.5 Multivariate analysis of serum soluble mediators in convalescent COVID-19 patients at distinct pregnancy trimesters

Multivariate analysis of chemokines, pro-inflammatory cytokines, regulatory cytokines and growth factors was performed

using PCA to verify the ability of serum mediators to cluster convalescent COVID-19 pregnant women apart from trimester-matching pre-pandemic non-infected pregnant women as a healthy control (HC). The results are presented in Figure 6. The PCA coordinates (2nd and 3rd principal components) demonstrated that although convalescent COVID pregnant women could be clustered apart from the HC when considering all trimesters together, the segregation profile was more evident when the COVID and HC



subgroups were compared at matching gestational trimesters (Figure 6). Vector analysis conducted in the 1st trimester indicated that CXCL8, CCL3, CCL5, IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-15, IL-1Ra, IL-10, and G-CSF were associated with convalescent COVID-19 in pregnant women. Data from the 2nd trimester showed that most soluble mediators were vectors associated with differential distribution of convalescent COVID-19 in pregnant women, except for GM-CSF. Additionally, the PCA coordinates obtained from the 3rd trimester demonstrated that several soluble mediators were vectors related to convalescent COVID-19 in pregnant women, except for CXCL10, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , PDGF and GM-CSF (Figure 6).

4 Discussion

Pregnancy triggers a unique immunological status, aiming to protect the fetus from maternal rejection and guarantee fetal development until birth. Several studies have reported that the immune system plays a balancing role during pregnancy with constant changes according to maternal and fetal demands (16, 17). Physiological changes in immune status during pregnancy are often characterized by alterations in cell-mediated immunity and humoral responses, from the 1st to 3rd pregnancy trimesters. Previous studies have demonstrated that successful implantation is associated with a transient increase in systemic proinflammatory

profile followed by a switch toward an anti-inflammatory profile after blastocyst transfer when pregnancy is confirmed (18). Pregnant women are particularly susceptible to COVID-19 due to physiological changes in the immune system, which may result in an altered response to SARS-CoV-2 infection in pregnancy. Furthermore, SARS-CoV-2 infection during pregnancy can disrupt the immune response homeostasis, impacting the maternal immune activation, with effects on pregnancy outcome and offspring (12, 13, 19, 20). It has already been reported that the adverse impacts of the COVID-19 pandemic on maternal health are not limited to morbidity and mortality caused by the disease itself, but are also associated with adverse pregnancy outcomes, including preeclampsia, preterm birth and stillbirth (19).

Most of the information on the impact of SARS-CoV-2 infection in pregnancy has been derived from reports concerning acute symptomatic infection (21). However, little data is available regarding the long-term impact of SARS-CoV-2 infection on pregnancy during the convalescent phase of the disease. In view of this, we designed this study as a pioneer exploratory investigation to perform descriptive and panoramic analysis of serum soluble mediator interplay in pregnant women during the convalescent phase of SARS-CoV-2 infection throughout prenatal care. This study comprises an innovative investigation of the long-lasting impact of SARS-CoV-2 infection during pregnancy focusing on the analysis of the immune response during the convalescent phase comprising 3–20 weeks after symptoms onset.

Our results demonstrate that, in general, serum soluble mediators have different trajectories during healthy pregnancy and are disturbed in pregnant women with convalescent SARS-CoV-2 infection. Herein, healthy pregnant women presented a progressive decrease in most serum soluble mediators towards the 2nd and 3rd pregnancy trimester, including chemokines, pro-inflammatory and regulatory cytokines, in addition to growth factors. Previous studies corroborate our findings in healthy pregnancies. The levels of chemokines and pro-inflammatory cytokines usually peak in the first trimester of pregnancy and decline in the 2nd and 3rd trimesters, while regulatory cytokines and growth factors have diverse trajectories (22, 23). Our findings highlighted that higher levels of most soluble mediators were observed in the COVID group compared to HC control group. The major increase occurred in pro-inflammatory cytokines, including IL-6, TNF- α and IFN- γ , a larger set of biomarkers with elevated COVID/HC ratios observed towards the 2nd (3x increase) and 3rd (3–15x increase) pregnancy trimesters. Studies of immune mediators in SARS-CoV-2 infection during pregnancy remain scarce. It has been proposed that the immunomodulation observed during pregnancy may protect pregnant COVID-19 patients from suffering from a cytokine storm (15, 24). However, no studies focusing on comparative analysis of immunological profiles of COVID-19 and healthy pregnant women at matching pregnancy trimesters have been reported. It is noteworthy that due to physiological changes in the immune response during pregnancy, the inclusion of trimester-matching healthy controls is essential to enable conclusive analysis. Therefore, our study is pioneering in terms of providing a detailed profile of long-lasting changes during convalescent

COVID-19 infection in pregnancy as it made direct comparison to trimester-matching healthy controls. Our findings did not support that an immunomodulatory profile is triggered by SARS-CoV-2 infection during pregnancy. In fact, the lower levels of soluble mediators previously reported in convalescent COVID-19 pregnant women were compared with those observed in non-pregnant women and did not consider the physiological changes triggered by pregnancy or alterations in soluble mediators inherent in trimesters (24). Moreover, other studies proposing the immunomodulatory state for acute COVID-19 infection during pregnancy in comparison to healthy pregnant women did not consider stratification by gestational trimesters (15). According to our findings, higher levels of serum soluble mediators were observed for convalescent COVID-19 infection during pregnancy, especially IL-6, TNF- α and IFN- γ in comparison to healthy pregnant women at matching pregnancy trimesters.

Successful pregnancy requires finely coordinated communication between the maternal and fetal microenvironments. Cytokine signaling pathways participate as mediators of these communications to guarantee healthy pregnancy. From the existing data available, there is no consensus trend for the changes observed for IL-6, TNF- α and IFN- γ during pregnancy (16). Several studies have demonstrated that IL-6, TNF- α and IFN- γ concentrations significantly increased between the 1st, 2nd and 3rd trimesters of healthy pregnancy (25–30). However, corroborating our findings, other authors detected significant reductions in IL-6, TNF- α and IFN- γ in maternal serum concentrations between the 1st and 3rd trimesters (31–33).

Infections or inflammatory conditions, such as COVID-19 during pregnancy, can have a detrimental impact on fetal development and also contribute to pregnancy-associated pathological conditions (34). Despite the conflicting data regarding the overall profile of IL-6, TNF- α and IFN- γ during healthy pregnancy, there is a consensus that the establishment of a pro-inflammatory microenvironment is associated with the risk of developing pregnancy-associated pathological conditions, including pregnancy loss, preeclampsia, and gestational diabetes mellitus (35). In this sense, the upregulation of pro-inflammatory cytokines in pregnant women with convalescent COVID-19 may suggest that these patients are more vulnerable to developing adverse pregnancy outcomes.

Integrative network analysis demonstrated that both HC and convalescent COVID-19 pregnancies evolve with decreasing connectivity between serum soluble mediators towards the 3rd trimester. However, the COVID group exhibited a remarkably lower number of connections. Overall, IL-1Ra, IL-10 and GM-CSF presented a preserved number of correlations throughout the pregnancy.

Further research is warranted to determine the precise IL-10 profile during healthy pregnancy (14). A few studies have reported that IL-10 significantly increases from the 1st to the 2nd and 3rd trimesters in healthy pregnancy (30, 36). However, corroborating our findings, other studies have detected that IL-10 decreases between the 1st and 3rd trimesters (31, 37). Considering the critical role of IL-10 as a chief anti-inflammatory cytokine, the preserved IL-10 connectivity axis observed during the 1st and 2nd trimesters may represent a mechanism to protect the fetus from

maternal pro-inflammatory rejection and guarantee fetal development until birth.

Our data demonstrated that IL-1Ra decreased in convalescent COVID-19 pregnant women in the 1st trimester but increased in the 3rd trimester. Previous studies reported that IL-1Ra levels increased during the inflammatory response to control acute inflammation and prevent immunopathological events (38). The IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an anti-inflammatory cytokine that blocks IL-1 α and IL-1 β functions and modulates their biological effects (39). It has been previously demonstrated in experimental models that high IL-1Ra levels at the beginning of pregnancy may lead to miscarriage due to impaired embryonic adhesion (40), and data from human studies showed that higher levels of circulating IL-1Ra have been reported in adverse pregnancy outcomes, including preeclampsia (41). Regarding the changes in IL-1Ra levels observed in convalescent COVID-19 along the pregnancy trimesters, our findings of preserved correlation profile between IL-1Ra and other soluble mediators throughout the pregnancy may suggest that an intricate microenvironment of soluble mediators is relevant to guarantee fetal development until birth.

Our data also demonstrated that GM-CSF presented preserved correlation with other soluble mediators throughout pregnancy. It was previously reported that after embryo implantation, GM-CSF participates in a network of cytokines and growth factors that regulate morphological and functional development of the placenta (42).

Conversely, despite increases in IL-17, FGF-basic and VEGF, loss of connectivity was observed throughout pregnancy. IL-17 up-regulates the expression of a variety of biological molecules with angiogenic properties including VEGF (43–47). VEGF plays a central role in vasculogenesis and angiogenesis, which augments vascular endothelial cell proliferation, migration, and survival. Moreover, data from previous studies have shown that IL-17 can induce placental oxidative stress and vascular dysfunction, resulting in hypertension and increased risk of preeclampsia (48). The loss of network connection of IL-17 and VEGF with other soluble mediators throughout the pregnancy may lead to intrinsic vascular dysfunction that results in impaired neonatal development. Post-natal follow-up studies may contribute to identifying impaired new-born growth and development related to altered angiogenesis.

Our data also demonstrated that IL-6 and CXCL8 were included in the set of attributes acquiring strong correlation in the 3rd pregnancy trimester, named COVID-selective correlations. Implications of IL-6 and CXCL8 in pregnancy-associated pathological conditions, such as pregnancy loss, preeclampsia, gestational diabetes mellitus, and infection/inflammation have been reported (35). These two soluble mediators are abundantly produced at the feto-maternal interface throughout pregnancy and have been shown to participate in several pregnancy-related events. Unbalanced expression/secretion of IL-6 and CXCL8 at the feto-maternal interface has been indicated in unexplained pregnancy loss (35). A study of the dynamic connections of the soluble mediator network in pre-eclampsia identified positive correlation between IL-

6 and CXCL8, suggesting that these molecules are implicated in the pathophysiology of this pregnancy-associated disease (35, 49). Moreover, a meta-analysis and systematic review suggested a role of CXCL8 in shaping the immune microenvironment in gestational diabetes mellitus (50).

The present study has some limitations. The low number of pregnant women enrolled in each pregnancy trimester re-enforce the need to further validate our findings. This work was performed during circulation of the B.1.1.28 and B.1.1.33 SARS-CoV-2 strains and therefore, the impact of other variants on the immunological profiles remains to be addressed. Despite the pioneering approach of this exploratory investigation, the observational design with multiple comparisons without corrections for co-morbidities or other confounding variables also constitutes a study limitation that may interfere in the levels of systemic soluble mediators. Moreover, regardless the relevance of nutritional aspects and the dietary inflammatory indices interfering in the immune response during pregnancy (51), we did not have the opportunity to address this issue in the present investigation.

In conclusion, the main finding of this study, a pronounced increase in serum levels of soluble mediators with decreased network interplay between them, portrayed an imbalanced immune response in convalescent COVID-19 infection during pregnancy that may contribute to the prevention or management of clinical course pregnancy complications.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by National Commission for Ethics in Research in Brazil (CONEP, CAAE 32359620.0.0000.5558). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

Study design: GF, LS, FM, CA, KC, MC, RT, ON, AS, CPA, AZ and LM. Advisory committee: CG, DM-S, PK, ON, LC, COA, and AZ. Funding acquisition: LE, OM-F and LM. Sample collection, experimental procedures, and data acquisition: ÂS, AC, YP, DA, LL, RN, PA, LG, LD, and JcDR. Data analysis: GF, LS, GJ-S, HS, LA, MG, PB, JBdS, IC-R, AC-A, VP-M, AC, and OM-F. Writing and reviewing the manuscript: GF, LS, GJ-S, HS, OM-F and LM. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and the University of Brasília (Grant # 7155, “Fundo COVID-19 UnB em Ação: Ações emergenciais para combate à COVID-19 e mitigação das consequências da pandemia”, “Eficácia de um protocolo de testagem RT-PCR para SARS-CoV-2 sobre a preservação da força de trabalho em saúde durante a pandemia COVID-19 no Brasil: ensaio clínico randomizado” and Grant # 7110, “Amamentar em tempos de pandemia de COVID-19: um protocolo para avaliação do impacto do SARS-COV-2 no sucesso do aleitamento materno”).

Acknowledgments

This study was performed by students and professors enrolled in Postgraduate Programs: Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília (UnB), supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-RPT-FIOCRUZ for use of the flow cytometry facilities. The authors also express their gratitude to Dayane Andriotti Otta for technical support. ON, MG, JCDR, LA, AC and OM-F received PQ fellowships from CNPq. AC and OM-F

are research fellows from FAPEAM (PVN-II, PRÓ-ESTADO Program #005/2019).

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1176898/full#supplementary-material>

References

- World Health Organization. *WHO coronavirus (COVID-19) dashboard data* (2022). Available at: <https://covid19.who.int/> (Accessed January 25, 2022).
- Brandt JS, Hill J, Reddy A, Schuster M, Patrick HS, Rosen T, et al. Epidemiology of coronavirus disease 2019 in pregnancy: risk factors and associations with adverse maternal and neonatal outcomes. *Am J Obstet Gynecol* (2021) 224(4):e1–9. doi: 10.1016/j.ajog.2020.09.043
- Khoury R, Bernstein PS, Debolt C, Stone J, Sutton DM, Simpson LL, et al. Characteristics and outcomes of 241 births to women with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection at five New York city medical centers. *Obstetrics Gynecol* (2020) 136(2):273–82. doi: 10.1097/AOG.0000000000004025
- Metz TD, Clifton RG, Hughes BL, Sandoval G, Saade GR, Grobman WA, et al. Disease severity and perinatal outcomes of pregnant patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Obstetrics Gynecol* (2021) 137(4):571–80. doi: 10.1097/AOG.0000000000004339
- Darif D, Hammi I, Kihel A, Idrissi Saik I, Guessous F, Akarid K. The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: What goes wrong? *Microb Pathog* (2021) 153:104799. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104799
- Asakura H, Ogawa H. COVID-19-associated coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *Int J Hematol* (2021) 113(1):45–57. doi: 10.1007/s12185-020-03029-y
- Chen R, Lan Z, Ye J, Pang L, Liu Y, Wu W, et al. Cytokine storm: The primary determinant for the pathophysiological evolution of COVID-19 deterioration. *Front Immunol* (2021) 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.589095
- Allotey J, Fernandez S, Bonet M, Stallings E, Yap M, Kew T, et al. Clinical manifestations, risk factors, and maternal and perinatal outcomes of coronavirus disease 2019 in pregnancy: living systematic review and meta-analysis. *BMJ* (2020), 370:m3320. doi: 10.1136/bmj.m3320
- Villar J, Arif S, Gunier RB, Thiruvengadam R, Rauch S, Kholin A, et al. Maternal and neonatal morbidity and mortality among pregnant women with and without COVID-19 infection. *JAMA Pediatr* (2021) 175(8):817. doi: 10.1001/jamapediatrics.2021.1050
- Huntley BJ, Huntley ES, di Mascio D, Chen T, Berghella V, Chauhan SP. Rates of maternal and perinatal mortality and vertical transmission in pregnancies complicated by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection. *Obstetrics Gynecol* (2020) 136(2):303–12. doi: 10.1097/AOG.0000000000004010
- Savasi VM, Parisi F, Patané L, Ferrazzi E, Frigerio L, Pellegrino A, et al. Clinical findings and disease severity in hospitalized pregnant women with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Obstetrics Gynecol* (2020) 136(2):252–8. doi: 10.1097/AOG.0000000000003979
- Cavalcante MB, Cavalcante CTMB, Sarno M, Barini R, Kwak-Kim J. Maternal immune responses and obstetrical outcomes of pregnant women with COVID-19 and possible health risks of offspring. *J Reprod Immunol* (2021) 143:103250. doi: 10.1016/j.jri.2020.103250
- Cavalcante MB, de Melo Bezerra Cavalcante CT, Cavalcante ANM, Sarno M, Barini R, Kwak-Kim J. COVID-19 and miscarriage: From immunopathological mechanisms to actual clinical evidence. *J Reprod Immunol* (2021) 148:103382. doi: 10.1016/j.jri.2021.103382
- Parisi F, Milazzo R, Savasi VM, Cetin I. Maternal low-grade chronic inflammation and intrauterine programming of health and disease. *Int J Mol Sci* (2021) 22(4):1732. doi: 10.3390/ijms22041732
- Fernandes GM, Motta F, Sasaki LMP, da Silva AP, Miranda AM, de Carvalho AO, et al. Pregnancy outcomes and child development effects of SARS-CoV-2 infection (PROUDEST trial): Protocol for a multicenter, prospective cohort study. *JMIR Res Protoc* (2021) 10(4):e26477. doi: 10.2196/26477
- Spence T, Allsopp PJ, Yeates AJ, Mulhern MS, Strain JJ, McSorley EM. Maternal serum cytokine concentrations in healthy pregnancy and preeclampsia. *J Pregnancy* (2021) 2021:1–33. doi: 10.1155/2021/6649608
- Chen G, Liao Q, Ai J, Yang B, Bai H, Chen J, et al. Immune response to COVID-19 during pregnancy. *Front Immunol* (2021) 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.675476
- Zhao Y, Zhang T, Guo X, Wong CK, Chen X, Chan YL, et al. Successful implantation is associated with a transient increase in serum pro-inflammatory cytokine profile followed by a switch to anti-inflammatory cytokine profile prior to confirmation of pregnancy. *Fertile Sterile* (2021) 115(4):1044–53. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.10.031
- Wei SQ, Bilodeau-Bertrand M, Liu S, Auger N. The impact of COVID-19 on pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Can Med Assoc J* (2021) 193(16):E540–8. doi: 10.1503/cmaj.202604

20. Chen G, Zhang Y, Zhang Y, Ai J, Yang B, Cui M, et al. Differential immune responses in pregnant patients recovered from COVID-19. *Signal Transduct Target Ther* (2021) 6(1):289. doi: 10.1038/s41392-021-00703-3
21. Mullins E, Perry A, Banerjee J, Townson J, Grozeva D, Milton R, et al. Pregnancy and neonatal outcomes of COVID-19: The PAN-COVID study. *Eur J Obstetrics Gynecol Reprod Biol* (2022) 276:161–7. doi: 10.1016/j.ejogrb.2022.07.010
22. Jarmund AH, Giskeødegård GF, Ryssdal M, Steinkjer B, Stokkeland LMT, Madssen TS, et al. Cytokine patterns in maternal serum from first trimester to term and beyond. *Front Immunol* (2021) 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.752660
23. Azizieh F, Dingle K, Raghupathy R, Johnson K, VanderPlas J, Ansari A. Multivariate analysis of cytokine profiles in pregnancy complications. *Am J Reprod Immunol* (2018) 79(3):e12818. doi: 10.1111/aji.12818
24. Tartaglia E, Bordonì V, Oliva A, Vergori A, Girardi E, Antinori A, et al. T Helper profile in pregnant women recovered from COVID-19. *J Reprod Immunol* (2022) 153:103661. doi: 10.1016/j.jri.2022.103661
25. Subha M, Pal P, Pal GK, Habeebullah S, Adithan C, Sridhar MG. Decreased baroreflex sensitivity is linked to sympathovagal imbalance, low-grade inflammation, and oxidative stress in pregnancy-induced hypertension. *Clin Exp Hypertens* (2016) 38(8):666–72. doi: 10.1080/10641963.2016.1200596
26. Blackmore ER, Moynihan JA, Rubinow DR, Pressman EK, Gilchrist M, O'Connor TG. Psychiatric symptoms and proinflammatory cytokines in pregnancy. *Psychosom Med* (2011) 73(8):656–63. doi: 10.1097/PSY.0b013e318226c277
27. Simavli S, Derbent AU, Uysal S, Turhan NO. Hepcidin, iron status, and inflammation variables among healthy pregnant women in the Turkish population. *J Maternal-Fetal Neonatal Med* (2014) 27(1):75–9. doi: 10.3109/14767058.2013.804054
28. Björkander S, Bremme K, Persson JO, van Vollenhoven RF, Sverremark-Ekström E, Holmlund U. Pregnancy-associated inflammatory markers are elevated in pregnant women with systemic lupus erythematosus. *Cytokine* (2012) 59(2):392–9. doi: 10.1016/j.cyt.2012.04.046
29. Lindsay K, Buss C, Wadhwa P, Entringer S. Maternal stress potentiates the effect of an inflammatory diet in pregnancy on maternal concentrations of tumor necrosis factor alpha. *Nutrients* (2018) 10(9):1252. doi: 10.3390/nu10091252
30. Olimpia SS, Magdalena P, Tomasz P, Piotr W, Elzbieta RW. Changes in the concentration of sHLA-I and selected cytokines in pregnancy complicated by antiphospholipid syndrome. *Ginekol Pol* (2011) 82(5):354–8. doi: 10.3390/nu10091252
31. Stokkeland LMT, Giskeødegård GF, Stridslev S, Ryan L, Steinkjer B, Tangerås LH, et al. Serum cytokine patterns in first half of pregnancy. *Cytokine* (2019) 119:188–96. doi: 10.1016/j.cyt.2019.03.013
32. Doria A, Cutolo M, Ghirardello A, Zen M, Villalta D, Tincani A, et al. Effect of pregnancy on serum cytokines in SLE patients. *Arthritis Res Ther* (2012) 14(2):R66. doi: 10.1186/ar3782
33. Iaccarino L, Ghirardello A, Zen M, Villalta D, Tincani A, Punzi L, et al. Polarization of TH2 response is decreased during pregnancy in systemic lupus erythematosus. *Reumatismo* (2012) 64(5):314–20. doi: 10.4081/reumatismo.2012.314
34. Yockey LJ, Iwasaki A. Interferons and proinflammatory cytokines in pregnancy and fetal development. *Immunity* (2018) 49(3):397–412. doi: 10.1016/j.immuni.2018.07.017
35. Vilotić A, Nacka-Aleksić M, Pirković A, Bojić-Trbojević Ž, Dekanski D, Jovanović Krivokuća M. IL-6 and IL-8: An overview of their roles in healthy and pathological pregnancies. *Int J Mol Sci* (2022) 23(23):14574. doi: 10.3390/ijms232314574
36. Nayak M, Peinhaupt M, Heinemann A, Eckhoff MEW, van Mechelen W, Desoye G, et al. Sedentary behavior in obese pregnant women is associated with inflammatory markers and lipid profile but not with glucose metabolism. *Cytokine* (2016) 88:91–8. doi: 10.1016/j.cyt.2016.08.031
37. Ross KM, Miller G, Calhane J, Grobman W, Simhan HN, Wadwa PD, et al. Patterns of peripheral cytokine expression during pregnancy in two cohorts and associations with inflammatory markers in cord blood. *Am J Reprod Immunol* (2016) 76(5):406–14. doi: 10.1111/aji.12563
38. Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin Infect Diseases* (2002) 34(2):204–9. doi: 10.1086/338261
39. Steinkasserer A, Spurr NK, Cox S, Jeggo P, Sim RB. The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 alpha and IL-1 beta loci. *Genomics* (1992) 13(3):654–7. doi: 10.1016/0888-7543(92)90137-H
40. Simón C, Valbuena D, Krüssel J, Bernal A, Murphy CR, Shaw T, et al. Interleukin-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect on the endometrial epithelium. *Fertil Steril* (1998) 70(5):896–906. doi: 10.1016/S0015-0282(98)00275-1
41. Kimya Y, Akdiş C, Cengiz C, Ozan H, Tatlikazan S, Uncu G, et al. Plasma interleukin-1alpha, interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist levels in pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (1997) 73(1):17–21. doi: 10.1016/S0301-2115(97)02698-5
42. Bowen JM, Chamley L, Mitchell MD, Keelan JA. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women. *Placenta* (2002) 23(4):239–56. doi: 10.1053/plac.2001.0781
43. Numasaki M, Lotze MT, Sasaki H. Interleukin-17 augments tumor necrosis factor-alpha-induced elaboration of proangiogenic factors from fibroblasts. *Immunol Lett* (2004) 93(1):39–43. doi: 10.1016/j.imlet.2004.01.014
44. Numasaki M, Takahashi H, Tomioka Y, Sasaki H. Regulatory roles of IL-17 and IL-17F in G-CSF production by lung microvascular endothelial cells stimulated with IL-1beta and/or TNF-alpha. *Immunol Lett* (2004) 95(1):97–104. doi: 10.1016/j.imlet.2004.06.010
45. Numasaki M. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* (2003) 101(7):2620–7. doi: 10.1182/blood-2002-05-1461
46. Takahashi H, Numasaki M, Lotze MT, Sasaki H. Interleukin-17 enhances bFGF-, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells. *Immunol Lett* (2005) 98(2):189–93. doi: 10.1016/j.imlet.2004.11.012
47. Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, Takahashi H, Nakamura A, McAllister F, et al. IL-17 enhances the net angiogenic activity and *In vivo* growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-Dependent angiogenesis. *J Immunol* (2005) 175(9):6177–89. doi: 10.4049/jimmunol.175.9.6177
48. Cornelius DC, Lamarca B. TH17- and IL-17- mediated autoantibodies and placental oxidative stress play a role in the pathophysiology of pre-eclampsia. *Minerva Ginecol* (2014) 66(3):243–9. doi: 10.4049/jimmunol.175.9.6177
49. Pinheiro MB, Martins-Filho OA, Mota AP, Alpoim PN, Godoi LC, Silveira ACO, et al. Severe preeclampsia goes along with a cytokine network disturbance towards a systemic inflammatory state. *Cytokine* (2013) 62(1):165–73. doi: 10.1016/j.cyt.2013.02.027
50. Liu H, Liu A, Kaminga AC, McDonald J, Wen SW, Pan X. Chemokines in gestational diabetes mellitus. *Front Immunol* (2022) 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.705852
51. de Freitas NPA, Carvalho TR, Gonçalves CCRA, da Silva PHA, de Melo Romão LG, Kwak-Kim J, et al. The dietary inflammatory index as a predictor of pregnancy outcomes: Systematic review and meta-analysis. *J Reprod Immunol* (2022) 152:103651. doi: 10.1016/j.jri.2022.103651

COPYRIGHT

© 2023 Fernandes, Sasaki, Jardim-Santos, Schulte, Motta, da Silva, de Carvalho, Pereira, Alves, de Araújo Júnior, Mendonça-Silva, Costa, de Castro, Lauand, Nery, Tristão, Kurizky, Nóbrega, Espindola, de Castro, Alpoim, Godoi, Dusse, Coelho-dos-Reis, Amaral, Gomes, Bertarini, Brito-de-Sousa, Costa-Rocha, Campi-Azevedo, Peruhype-Magalhães, Teixeira-Carvalho, Zaconeta, Soares, Valim, Gomes, de Albuquerque, Martins-Filho and da Mota. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.