

LIZANDRA MOURA PARAVIDINE SASAKI

**COVID-19 NA GRAVIDEZ: AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DA
INFECCÃO POR SARS-COV-2 DURANTE A GESTAÇÃO – RESULTADOS DA
COORTE PROSPECTIVA PROUDEST**

BRASÍLIA/DF
2025

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

LIZANDRA MOURA PARAVIDINE SASAKI

**COVID-19 NA GRAVIDEZ: AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DA
INFECÇÃO POR SARS-COV-2 DURANTE A GESTAÇÃO – RESULTADOS DA
COORTE PROSPECTIVA PROUDEST**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Licia Maria Henrique
da Mota Coorientador: Prof. Dr. Alberto
Moreno Zaconeta.

BRASÍLIA/DF
2025

MP224c MOURA PARAVIDINE SASAKI, LIZANDRA
COVID-19 NA GRAVIDEZ: AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DA
INFECÇÃO POR SARS-COV-2 DURANTE A GESTAÇÃO - RESULTADOS DA
COORTE PROSPECTIVA PROUDEST / LIZANDRA MOURA PARAVIDINE
SASAKI; orientador LÍCIA MARIA HENRIQUE DA MOTA;
co-orientador ALBERTO MORENO ZACONETA. Brasília, 2025.
203 p.

Tese (Doutorado em Ciências Médicas) Universidade de
Brasília, 2025.

1. COVID-19. 2. SARS-COV-2. 3. GESTAÇÃO. 4. AVALIAÇÃO
CLÍNICA. 5. IMUNOLOGIA. I. MARIA HENRIQUE DA MOTA, LÍCIA,
orient. II. MORENO ZACONETA, ALBERTO, co-orient. III.
Título.

LIZANDRA MOURA PARAVIDINE SASAKI

**COVID-19 NA GRAVIDEZ: AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DA
INFECÇÃO POR SARS-COV-2 DURANTE A GESTAÇÃO – RESULTADOS DA
COORTE PROSPECTIVA PROUDEST**

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

Profa. Dra. Licia Maria Henrique da Mota (Presidente)

Professora orientadora do programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de
Medicina da Universidade de Brasília

Profa. Dra. Maria Fátima de Sousa

Professora Associada IV do Departamento de Saúde Coletiva da Faculdade de Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília

Prof. Dr. Gabriel Costa Osanan

Professor Associado do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal
de Minas Gerais

Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Professor do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Leopoldo Luiz dos Santos Neto (Suplente)

Professor orientador do programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de
Medicina da Universidade de Brasília

Dedico este trabalho a todos os profissionais de saúde que, com coragem incansável e comprometimento genuíno, enfrentaram os desafios da pandemia de COVID-19. Estendo esta homenagem à minha família e aos meus amigos, cujo apoio incondicional, amor e incentivo tornaram possível cada passo desta trajetória.

Agradecimentos

A Deus, por sustentar minha fé e iluminar meu caminho em todas as etapas desta jornada acadêmica e pessoal.

Aos meus pais, que me deixaram como herança valores inegociáveis de respeito, honestidade, compaixão, ética e amor ao próximo — fundamentos que orientam minha vida e que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao meu esposo Thiago e aos meus filhos Heitor e Helena, por todo amor, paciência e apoio incondicional. Vocês são minha fortaleza e minha maior motivação.

À minha orientadora, Professora Dra. Lícia Maria Henrique da Mota, por todo seu conhecimento, sua orientação generosa, por sua escuta atenta e pelo acolhimento respeitoso ao longo de toda esta caminhada científica.

Ao meu coorientador, Professor Dr. Alberto Moreno Zaconeta, por toda a dedicação, disponibilidade e tempo despendido em cada etapa deste projeto. Expresso minha profunda admiração pela sua incrível capacidade de conciliar tantas responsabilidades com excelência.

À toda a equipe do Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz – Minas Gerais, por conduzirem com excelência as análises laboratoriais deste estudo, sempre com paciência, rigor técnico e apoio inestimável na interpretação dos resultados e elaboração das figuras. Ressalto aqui o querido Professor Dr. Olindo Assis Martins Filho. Sem dúvida, uma referência de dedicação e excelência científica que quero seguir por toda minha vida.

Ao Dr. Cleandro Pires de Albuquerque, pela concepção da ideia original deste projeto e pelo acompanhamento atento e comprometido em suas diversas etapas.

Agradeço aos meus amigos e parceiros nesta jornada: Dr. Ângelo Pereira da Silva, Enfermeira Yacara Ribeiro Pereira, Psicóloga Aleida Oliveira Carvalho, Dra. Maria Eduarda Canellas de Castro e Dr. Felipe Motta. Sem vocês, este caminho teria sido solitário e muito mais difícil. E de forma muito especial, destaco meu amigo-irmão da ciência Geraldo Magela Fernandes por

estar ao meu lado desde a concepção do estudo, passando pelo alinhamento, análise e escrita dos dados. Sua parceria e apoio foram indispensáveis para chegar até aqui.

Aos internos do curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, que contribuíram significativamente no atendimento às gestantes e na organização do banco de dados, meu sincero reconhecimento.

À banca examinadora, por aceitar contribuir com suas valiosas expertises na avaliação deste trabalho.

À Universidade de Brasília e ao Hospital Universitário de Brasília, instituições públicas fundamentais para a construção do conhecimento e para a realização desta pesquisa. O compromisso dessas instituições com o ensino, a assistência e a ciência foi decisivo para viabilizar este trabalho.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), ao CNPq, à FAPEMIG e à Universidade de Brasília, pelo financiamento que viabilizou as análises laboratoriais.

Ao Decanato de Pós-Graduação da UnB, pelo apoio financeiro à publicação de artigos científicos por meio do Edital DPG/UnB nº 04/2021.

Às gestantes e suas famílias, que gentilmente aceitaram participar desta pesquisa, registro minha imensa gratidão pela confiança depositada e pelo comprometimento ao longo de todo o processo. Sua colaboração foi essencial para a concretização deste trabalho.

Por fim, ressalto meu reconhecimento aos profissionais e equipes do Hospital Universitário de Brasília e do Hospital Regional da Asa Norte, que atuaram com empenho exemplar na coleta das amostras biológicas, organização dos dados e assistência às participantes. Mesmo diante dos inúmeros desafios impostos pela pandemia de COVID-19 — tempos de incerteza, exaustão e risco —, mantiveram-se firmes no propósito de cuidar e colaborar com a ciência. A cada um que contribuiu com dedicação, bravura e solidariedade, estendo meus mais sinceros e respeitosos agradecimentos.

“Não há medicina mais poderosa do que o conhecimento.”

Atribuído a Edward Jenner (1749–1823), médico
e cientista britânico responsável pela descoberta
da vacina contra a varíola.

RESUMO

Introdução: Desde o relato inicial da doença Coronavírus-2019 (COVID-19), causada pelo vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARS-CoV-2), o número de casos confirmados e relatos de mortalidade/morbidade associados à infecção aumentaram exponencialmente. À medida que a pandemia de COVID-19 progrediu, tornou-se evidente a necessidade de conhecer a evolução, gravidade e complicações da doença na gestação, assim como os efeitos infecciosos e parainfecciosos sistêmicos e em compartimentos específicos, como o sistema nervoso central. Neste intuito, iniciou-se o estudo de coorte prospectivo denominado PROUDEST - *Pregnancy Outcome and child Development – Effects of SARS-CoV-2 infection Trial*.

Objetivos

Objetivo primário:

- Avaliar os desfechos clínicos maternos e perinatais de gestantes infectadas por SARS-CoV-2 durante a gravidez, acompanhadas desde o diagnóstico até o puerpério.

Objetivos secundários:

- Investigar a presença do vírus SARS-CoV-2 no líquido cefalorraquidiano de gestantes na fase aguda de COVID-19.
- Caracterizar o perfil de mediadores imunes solúveis no soro e líquido cefalorraquidiano (LCR) de parturientes infectadas por SARS-CoV-2.
- Comparar os níveis de mediadores imunes solúveis no soro e LCR de parturientes nas fases aguda (<14 dias) e convalescente (≥14 dias) da infecção por SARS-CoV-2 e parturientes comprovadamente não infectadas pelo vírus (HC).

Métodos: Gestantes com idade ≥18 anos, infecção confirmada por SARS-CoV-2 durante qualquer trimestre de gravidez, sem nenhum outro diagnóstico de doença infecciosa no período gestacional e não vacinadas contra COVID-19 foram incluídas e acompanhadas prospectivamente de junho de 2020 a dezembro de 2021 no Hospital Universitário de Brasília e Hospital Regional da Asa Norte, em Brasília, DF, desde a infecção por SARS-CoV-2 até o puerpério. Foram realizadas coletas de amostras de sangue durante o pré-natal e parto e coleta de amostra de LCR em pacientes submetidas a parto cesárea. Os dados clínicos foram registrados durante os períodos de gravidez, parto e pós-parto. A investigação da presença do vírus SARS-CoV-2 foi realizada no LCR por meio de Reação em Cadeia de Polimerase – Transcriptase Reversa (RT-PCR). As concentrações de quimiocinas (CXCL8; CCL11; CCL3; CCL4; CCL2; CCL5; CXCL10), pró-inflamatório (IL-1β; IL-6; TNF-α; IL-12; IFN-γ; IL-15; IL-17) e citocinas reguladoras (IL-1Ra; IL-4; IL-5; IL-9; IL-10; IL-13) juntamente com fatores de crescimento (FGF-básico; PDGF; VEGF; G-CSF; GM-CSF; IL-2; IL-7) foram dosadas nas amostras séricas e líquóricas de parturientes por ensaio multiplex de microesferas de alto rendimento. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software SAS 9.4 e Prism 8.0.2.

Resultados: Entre as 260 participantes com COVID-19, 78 (30%), foram infectadas no 1º trimestre de gestação, 105 (40,4%) no 2º trimestre e 77 (29,6%) no 3º trimestre. Em relação aos desfechos clínicos e obstétricos, 224 (86%) tiveram forma não grave de COVID-19, 28 (11%) a forma grave e 8 (3%) a forma crítica, com duas puérperas (0,8%) evoluindo a óbito. 240 gestantes (92,3%) estavam na fase convalescente da COVID-19 no momento do parto e 20 (7,7%) na fase aguda da doença. Diabetes *mellitus* gestacional foi detectada em 93 de 260 gestantes estudadas. Mais participantes infectadas no 3º trimestre ($p<0,0001$) ou que estavam na fase aguda da COVID-19 durante o parto ($p<0,0001$) tiveram COVID-19 crítica e grave em comparação às acometidas no 1º e 2º trimestres de gestação. Trabalho de parto prematuro [OR=3,64; IC 95% = 1,26; IC 95% = 1,53; $p=0,0170$], escore de Apgar ≤ 7 no 1º minuto

[RP=2,56; IC 95% = 1,17; 5.56); p=0,0181] e sofrimento fetal agudo [RP=2,40; IC 95% = 1,06; 5.46); p=0,0364] foram os desfechos adversos encontrados nas gestantes acometidas por SARS-CoV-2 na fase aguda do parto ou com COVID-19 grave/crítica. A investigação por RT-PCR para SARS-CoV-2 no LCR de 14 gestantes na fase inicial da doença foi negativa em todos os casos, mesmo naquelas com sintomas neurológicos, sugerindo um mecanismo inflamatório e imunomediado para os sintomas neurológicos. Analisando o perfil imunológico das gestantes infectadas por SARS-CoV-2 no soro e no LCR, foram observados níveis aumentados de mediadores imunológicos no soro na infecção aguda, com um declínio claro durante a convalescença de COVID-19. Por outro lado, no LCR foi observado aumento progressivo de mediadores imunológicos desde a infecção aguda até a fase convalescente. O perfil geral de assinatura observado nas amostras de soro demonstrou que um amplo conjunto de mediadores imunológicos apresentou níveis aumentados na infecção aguda por SARS-CoV-2, incluindo todas as quimiocinas (CXCL8; CCL11; CCL3; CCL4; CCL2; CCL5; CXCL10) e 13 das 20 citocinas e fatores de crescimento (IL-1 β ; IL-6; TNF- α ; IFN- γ ; IL-15; IL-1Ra; IL-4; IL-5; IL-10; PDGF; VEGF; G-CSF; IL-2). Um claro declínio no conjunto de mediadores imunológicos séricos foi observado durante a COVID-19 convalescente, com uma diminuição progressiva com o intervalo de tempo entre a infecção por SARS-CoV-2 e o parto. A maioria dos mediadores imunes solúveis séricos observados no grupo de convalescentes tardios (TNF- α ; IL-17; IL-10; IL-13; GM-CSF e IL-2) foram semelhantes aos relatados para as pacientes controle (HC). Já a análise das assinaturas dos mediadores solúveis do LCR demonstrou que apenas um pequeno conjunto de mediadores imunes apresentou níveis aumentados na infecção aguda (IL-1Ra; IL-4; IL-10; G-CSF) com aumento progressivo com o intervalo de tempo entre a infecção por SARS-CoV-2 e o parto, com maior número de mediadores imunes observado no grupo convalescente tardio (CCL11; CCL5; TNF- α ; IL-17; IL-4; IL-5; IL-9; IL-10; IL-13; VEGF; G-CSF; GM-CSF; IL-7) em comparação com outros subgrupos de COVID-19. A análise de correlações identificou ainda um conjunto de moléculas associado à diafonia dicotômica entre os compartimentos sérico e líquórico, incluindo quimiocinas (CXCL8, CCL5, CXCL10) e citocinas regulatórias (IL-4 and IL-9).

Conclusão: A infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez foi associada a desfechos maternos e perinatais adversos e pode levar a alterações imunológicas no soro e no LCR, independentemente da detecção do vírus SARS-CoV-2 no LCR. Enquanto o soro apresenta perfil inflamatório intenso na fase aguda da doença COVID-19, o LCR mostra resposta imunológica crescente na convalescência, sugerindo dinâmica de diafonia entre barreiras biológicas. A aferição de concentrações de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, regulatórias e fatores de crescimento, assim como suas assinaturas e circuitos de correlação integrativa confirmaram esses achados e apoiaram a existência de microambientes dicotômicos no soro e no LCR. Juntos, esses achados enfatizam a relevância da compreensão da abordagem clínica e resposta imune da gestante acometida por COVID-19 a fim de estabelecer a abordagem mais adequada e diminuir o risco materno e neonatal nessa população. O entendimento da evolução do SARS-CoV-2 na gestação, suas implicações clínicas e a eficácia das estratégias de controle continuam sendo essenciais para a resposta diante de futuras pandemias.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; COVID-19; gravidez; líquido cefalorraquidiano, mediadores imunes, citocinas; prospectivo; coorte.

ABSTRACT

Introduction: Since the initial report of Coronavirus-2019 disease (COVID-19), caused by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) virus, the number of confirmed cases and reports of mortality/morbidity associated with infection have increased exponentially. As the COVID-19 pandemic progressed, the need to know the evolution, severity, and complications of the disease in pregnancy, as well as the systemic infectious and parainfectious effects and in specific compartments, such as the central nervous system, became evident. To this end, the prospective cohort study called PROUDEST - *Pregnancy Outcome and child Development - Effects of SARS-CoV-2 infection Trial* was initiated.

Goals

Primary objective:

- To evaluate the maternal and perinatal clinical outcomes of pregnant women infected with SARS-CoV-2 during pregnancy, followed from diagnosis to the puerperium.

Secondary objectives:

- To investigate the presence of the SARS-CoV-2 virus in the cerebrospinal fluid of pregnant women in the acute phase of COVID-19.
- To characterize the profile of soluble immune mediators in serum and cerebrospinal fluid (CSF) of parturients infected with SARS-CoV-2.
- To compare the levels of soluble immune mediators in serum and CSF of parturients in the acute (<14 days) and convalescent (≥ 14 days) phases of SARS-CoV-2 infection and parturients proven not infected by the virus (HC).

Methods: Pregnant women aged ≥ 18 years, confirmed SARS-CoV-2 infection during any trimester of pregnancy, without any other diagnosis of infectious disease in the gestational period, and not vaccinated against COVID-19 were included and prospectively followed up from June 2020 to December 2021 at the University Hospital of Brasília and the Regional Hospital of Asa Norte, in Brasília, Federal District, Brazil, from SARS-CoV-2 infection to the puerperium. Blood samples were collected during prenatal care and delivery and CSF samples were collected in patients undergoing cesarean section. Clinical data were recorded during the pregnancy, childbirth, and postpartum periods. The investigation of the presence of the SARS-CoV-2 virus was carried out in the CSF by means of Polymerase Chain Reaction – Reverse Transcriptase (RT-PCR). Concentrations of chemokines (CXCL8; CCL11; CCL3; CCL4; CCL2; CCL5; CXCL10), pro-inflammatory (IL-1 β ; IL-6; TNF- α ; IL-12; IFN- γ ; IL-15; IL-17) and regulatory cytokines (IL-1Ra; IL-4; IL-5; IL-9; IL-10; IL-13) together with growth factors (FGF-basic; PDGF; VEGF; G-CSF; GM-CSF; IL-2; IL-7) were measured in serum and cerebrospinal fluid samples of parturients by multiplex assay of high-throughput microspheres. Statistical analyses were performed using SAS 9.4 and Prism 8.0.2 software.

Results: Among the 260 participants with COVID-19, 78 (30%) were infected in the 1st trimester of pregnancy, 105 (40.4%) in the 2nd trimester, and 77 (29.6%) in the 3rd trimester. Regarding clinical and obstetric outcomes, 224 (86%) had a non-severe form of COVID-19, 28 (11%) had a severe form, and 8 (3%) had a critical form, with two postpartum women (0.8%) dying. 240 pregnant women (92.3%) were in the convalescent phase of COVID-19 at the time of delivery and 20 (7.7%) in the acute phase of the disease. Gestational diabetes *mellitus* was detected in 93 of the 260 pregnant women studied. More participants infected in the 3rd trimester ($p < 0.0001$) or who were in the acute phase of COVID-19 during delivery ($p < 0.0001$) had critical and severe COVID-19 compared to those affected in the 1st and 2nd trimesters of pregnancy. Preterm labor [OR=3.64; 95% CI = 1.26; 95% CI = 1.53; $p=0.0170$], Apgar score ≤ 7 in the 1st minute [PR=2.56; 95% CI = 1.17; 5.56; $p=0.0181$] and acute fetal distress [PR=2.40; 95% CI = 1.06; 5.46; $p=0.0364$] were the adverse outcomes found in pregnant

women affected by SARS-CoV-2 in the acute phase of labor or with severe/critical COVID-19. The RT-PCR investigation for SARS-CoV-2 in the CSF of 14 pregnant women in the initial phase of the disease was negative in all cases, even in those with neurological symptoms, suggesting an inflammatory and immune-mediated mechanism for neurological symptoms. Analyzing the immune profile of SARS-CoV-2-infected pregnant women in serum and CSF, increased levels of immune mediators in serum were observed in acute infection, with a clear decline during COVID-19 convalescence. On the other hand, in CSF, a progressive increase in immune mediators was observed from acute infection to the convalescent phase. The overall signature profile observed in the serum samples demonstrated that a broad set of immune mediators showed increased levels in acute SARS-CoV-2 infection, including all chemokines (CXCL8; CCL11; CCL3; CCL4; CCL2; CCL5; CXCL10) and 13 of the 20 cytokines and growth factors (IL-1 β ; IL-6; TNF- α ; IFN- γ ; IL-15; IL-1Ra; IL-4; IL-5; IL-10; PDGF; VEGF; G-CSF; IL-2). A clear decline in the serum immune mediators pool was observed during convalescent COVID-19, with a progressive decrease with the time interval between SARS-CoV-2 infection and delivery. Most of the serum soluble immune mediators observed in the late convalescent group (TNF- α ; IL-17; IL-10; IL-13; GM-CSF and IL-2) were similar to those reported for uninfected patients (HC). On the other hand, the analysis of the signatures of the soluble mediators of CSF showed that only a small set of immune mediators showed increased levels in acute infection (IL-1Ra; IL-4; IL-10; G-CSF) with a progressive increase with the time interval between SARS-CoV-2 infection and delivery, with a higher number of immune mediators observed in the late convalescent group (CCL11; CCL5; TNF- α ; IL-17; IL-4; IL-5; IL-9; IL-10; IL-13; VEGF; G-CSF; GM-CSF; IL-7) compared to other COVID-19 subgroups. The correlation analysis also identified a set of molecules associated with dichotomous crosstalk between the serum and cerebrospinal fluid compartments, including chemokines (CXCL8, CCL5, CXCL10) and regulatory cytokines (IL-4 and IL-9).

Conclusion: SARS-CoV-2 infection during pregnancy was associated with adverse maternal and perinatal outcomes and may lead to immunological changes in serum and CSF, regardless of detection of the SARS-CoV-2 virus in CSF. While serum has an intense inflammatory profile in the acute phase of COVID-19 disease, CSF shows an increasing immune response in convalescence, suggesting crosstalk dynamics between biological barriers. The measurement of concentrations of chemokines, pro-inflammatory cytokines, regulatory cytokines, and growth factors, as well as their signatures and integrative correlation circuits, confirmed these findings and supported the existence of dichotomous microenvironments in serum and CSF. Together, these findings emphasize the relevance of understanding the clinical approach and immune response of pregnant women affected by COVID-19 in order to establish the most appropriate approach and reduce maternal and neonatal risk in this population. Understanding the evolution of SARS-CoV-2 in pregnancy, its clinical implications, and the effectiveness of control strategies remain essential for the response to future pandemics.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; pregnancy; cerebrospinal fluid, immune mediators, cytokines; prospective; cohort.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição global de casos de COVID-19 relatados à Organização Mundial de Saúde (total cumulativo) até junho de 2025.	25
Figura 2 - Estrutura do SARS-CoV-2	26
Figura 3 - Protocolo do Estudo PROUDEST, incluindo o subgrupo PREGNANT que acompanhou clinicamente gestantes com COVID-19 e subgrupo BORN que acompanhou clinicamente recém-nascidos e crianças nascidas a partir do grupo PREGNANT.....	45
Figura 4 – Fluxograma de participantes no estudo PROUDEST, composto por mulheres grávidas acometidas por COVID-19 na gestação	58
Figura 5 – Mediadores imunes solúveis de soro de parturientes com COVID-19 aguda ou convalescente incluídas no estudo PROUDEST	75
Figura 6 – Mediadores imunes no líquido cefalorraquidiano de parturientes com COVID-19 aguda ou convalescente no estudo PROUDEST	77
Figura 7A e B – Assinaturas globais de mediadores imunes solúveis em amostras de soro de parturientes com COVID-19 aguda ou convalescente incluídas no estudo PROUDEST.....	79
Figura 8A e B – Assinaturas globais de mediadores imunológicos solúveis em amostras de líquido cefalorraquidiano de parturientes com COVID-19 aguda ou convalescente incluídas no estudo PROUDEST	80
Figura 9A e B – Circuitos de mediadores imunes solúveis em amostras de soro de parturientes com COVID-19 aguda ou convalescente incluídas no estudo PROUDEST.....	82
Figura 10A e B – Circuitos de mediadores imunes insolúveis em amostras de líquido cefalorraquidiano de parturientes com COVID-19 aguda ou convalescente incluídas no estudo PROUDEST	84
Figura 11A, B e C – Resumo das alterações nos mediadores imunológicos solúveis em amostras de soro e líquido cefalorraquidiano de parturientes com COVID-19 aguda ou convalescente incluídas no estudo PROUDEST	87
Figura 12 – Nuvens de correlação de mediadores imunes solúveis em amostras de soro e líquido cefalorraquidiano de parturientes com COVID-19 aguda ou convalescente incluídas no estudo PROUDEST	89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Distribuição dos partos realizados no HUB-UnB e HRAN das gestantes acometidas por COVID-19 incluídas no estudo PROUDEST desde o início – junho de 2020 – até o final do estudo – dezembro de 2021, de acordo com número de partos e meses do ano60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resumo de estudos publicados sobre desfechos clínicos maternos e perinatais em gestantes acometidas por COVID-19 no período gravídico-puerperal	41
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variantes de preocupação (VOC) do SARS-CoV-2, segundo dados publicados pela OMS	27
Tabela 2 – Características demográficas e laboratoriais das gestantes acometidas por COVID-19 incluídas no estudo PROUDEST	59
Tabela 3 – Características clínicas e radiológicas de mulheres infectadas por SARS-CoV-2 durante a gestação incluídas no estudo PROUDEST.....	61
Tabela 4 – Sintomas de COVID-19 de acordo com o trimestre de gravidez do diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 e gravidade do COVID-19 das gestantes incluídas no estudo PROUDEST.....	63
Tabela 5 – Características da infecção por SARS-CoV-2 por trimestre de gravidez, gravidade do COVID-19 e tempo entre a infecção por COVID-19 e o parto das gestantes incluídas no estudo PROUDEST	64
Tabela 6 – Gravidade da COVID-19 de acordo com o diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no trimestre da gravidez das gestantes incluídas no estudo PROUDEST.....	65
Tabela 7 – Gravidade da COVID-19 de acordo com a fase da COVID-19 no parto das gestantes incluídas no estudo PROUDEST.....	66
Tabela 8 – Modelagem da razão de chances da idade gestacional no momento do parto de acordo com a gravidade da COVID-19 de gestantes incluídas no estudo PROUDEST.....	67
Tabela 9 – Características clínicas de recém-nascidos de mães infectadas com SARS-CoV-2 durante a gravidez.....	67
Tabela 10 – Características clínicas dos recém-nascidos de mães com infecção por SARS-CoV-2 de acordo com o trimestre da gravidez do diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2, gravidade da COVID-19 e fase da COVID-19 no parto.....	69
Tabela 11 – Modelagem de contagem de sofrimento fetal agudo e pontuação de Apgar no 1º minuto $\leq$ 7 de acordo com a gravidade do COVID-19 e a fase da infecção.....	70
Tabela 12 – Características clínicas e resultados de análise do RNA do vírus SARS-CoV-2 por técnica RT-PCR no líquido cefalorraquidiano de gestantes com COVID-19 incluídas no estudo PROUDEST	71
Tabela 13 – Características clínicas das parturientes acometidas por COVID-19 em diferentes períodos da gestação, incluídas para avaliação do perfil imunológico no estudo PROUDEST	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2 – Enzima Conversora da Angiotensina 2

ACOG - Colégio Americano de Ginecologia e Obstetrícia

AIG - adequados para a idade gestacional

AVC - Acidente Vascular Cerebral

C - quimiocinas

° C – graus célsios

CAAE - Código de Acompanhamento de Processo de Ética

CD - Marcadores de superfície que definem subtipos de monócitos

CD4+ - Linfócitos T auxiliares

CD8+ - Citotóxicos T auxiliares

cDNA – DNA complementar

CCL - eotaxina

CGIA - *colloidal-gold based immunoassays*

CLIA – *Chemiluminescent Immunoassays*

CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico

COVID-19 – Doença do coronavírus 2019 (do inglês *Coronavirus Disease 2019*)

CoVs – Coronavírus

CXCL - Interleucina

DAMP - Padrões Moleculares de Dano

DMG - diabetes *mellitus* gestacional

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DP – desvio padrão

DPG - Decanato de Pós-Graduação

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

e - margem de erro (ou erro amostral)

EBSERH - Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares

ECDC - *European Centre for Disease Prevention and Control*

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FGF-básico - *Fibroblast Growth Factor* básico

FIA - *fluorescent immunoassays*

Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz

g – grama

GISAID - *Global Initiative on Sharing All Influenza Data*

G-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (do inglês *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*)

GH - fatores de crescimento

GIG - grandes para a idade gestacional

GM-CSF - Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Macrófagos (do inglês *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

HAS - hipertensão arterial sistêmica

HC – controles saudáveis (do inglês *healthy controls*)

hCoV-19 - Coronavírus humano de 2019 (do inglês *human Coronavirus 2019*)

HEELP - Síndrome de hemólise, elevação das enzimas hepáticas e baixa contagem de plaquetas (do inglês *Hemolysis Elevated Liver enzymes Low Platelet count*)

HIV - vírus da imunodeficiência humana

hMpxV – Vírus da varíola dos macacos (do inglês *Monkeypox virus*)

HRAN - Hospital Regional da Asa Norte

HUB-UnB - Hospital Universitário de Brasília

IADPSG - *International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group's Criteria*

IC – *intervalo de confiança*

IFN- γ - Interferon gama

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IL - Interleucina

Kb - quilo pares de bases (do inglês *kilobase pairs*)

kg/m² - quilogramas por metro quadrado

LCR - líquido cefalorraquidiano

MCP-1 - Proteína Quimioatraente de Monócitos 1 (do inglês *Monocyte Chemoattractant Protein-1*)

MERS-Cov - Síndrome Respiratória do Oriente Médio

Mg/dl - miligramas por decilitro

min - minuto

mL - mililitro

mmHg - milímetros de mercúrio

n - frequências absolutas

NF-κB - *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NLR - *Nucleotide-binding domain Leucine-rich Repeat containing proteins*

P - Citocinas pró-inflamatórias

OMS – Organização Mundial da Saúde

OR - razão de chances ou razão de probabilidades (do inglês *Odds Ratio*)

ORF - Quadro Aberto de Leitura (do inglês *Open Reading Frame*)

PANGO - *Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak*

PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (do inglês *Platelet-Derived Growth Factor*)

pg/mL - picogramas por mililitro

PIG - pequenos para a idade gestacional

PROUDEST - *Pregnancy Outcome and child Development – Effects of SARS-CoV-2 infection Trial*

R - Citocinas regulatórias

RCIU - restrição de crescimento intrauterino

RdRp - RNA-polimerase

REBRACO - Rede Brasileira de Pesquisa em Obstetrícia

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês *Ribonucleic Acid*)

RN – recém-nascido(s)

RR – risco relativo

RSV - Vírus Sincicial Respiratório

RT-PCR - Reação em Cadeia de Polimerase – Transcriptase Reversa (do inglês *Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*)

SARS-CoV-2 - Síndrome Respiratória Aguda Grave por Coronavírus 2 (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome - Coronavirus-2*)

SDRA - Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

SES-DF - Secretaria de Saúde do Distrito Federal

SNC - Sistema Nervoso Central

SRAG - Síndrome Respiratória Aguda Grave

STAT3 - *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

TC – Tomografia Computadorizada

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Th - *T helper*

TMPRSS2 - Protease Transmembranar de Serina tipo 2

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês *Tumor Necrosis Factor alpha*)

TOTG - teste oral de tolerância à glicose

UnB – Universidade de Brasília

UTI – unidade de terapia intensiva

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VOC – Variantes de Preocupação

VOI – Variantes de Interesse

WHO - World Health Organization

x g - vezes a força da gravidade

Z - valor da distribuição normal padrão (também chamado de escore-Z ou escore da curva normal)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 COVID-19	25
1.1.1 COVID -19 e variantes	27
1.1.2 Ciclo de vida do SARS-CoV-2	28
1.1.3 Replicação viral	29
1.1.4 Fisiopatologia da doença COVID-19	29
1.1.5 Métodos diagnósticos	31
1.1.5.1 Detecção de ácidos nucleicos	31
1.1.5.2 Testes para detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2	32
1.1.5.3 Achados de imagem	33
1.1.6 Quadro clínico	33
1.1.7 Fases da infecção por SARS-CoV-2 e suas manifestações clínicas	34
1.1.8 Fatores de risco para gravidade da doença COVID-19	35
1.2 A GESTAÇÃO E COVID-19	36
1.2.1 A Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) na gestação	36
1.2.2 Infecção por MERS-CoV na gestação	37
1.2.3 SARS-CoV-2 na gestação	37
1.2.3.1 SARS-CoV-2 na gestação: achados do estudo REBRACO	38
1.2.3.2 SARS-CoV-2 na gestação: achados do estudo COVI-PREG	39
1.2.3.3 SARS-CoV-2 na gestação: achados do estudo INTERCOVID	40
1.2.3.4 Evidências científicas sobre os impactos da infecção por SARS-CoV-2 na gravidez	40
1.2.4 Perfil imunológico da infecção por SARS-CoV-2 na gestação	43
1.2.5 Alterações neurológicas na gestação acometida por COVID-19	44
2 PROTOCOLO ESTUDO PROUDEST	45
3 JUSTIFICATIVA	46
4 OBJETIVOS	47
5 PACIENTES E MÉTODOS	47
5.1 Desenho do estudo	46
5.2 Cenário do estudo	47
5.3 População estudada	48
5.4 Recrutamento	48
5.5 Tamanho amostral	49
5.6 Critérios de inclusão	50
5.7 Critérios de exclusão	50
5.8 Diagnóstico de COVID-19	50

5.9 Entrevista e preenchimento de questionário.....	51
5.10 Coleta de dados clínico-obstétricos.....	51
5.11 Dados avaliados na pesquisa clínica	52
5.12 Coleta de amostras biológicas	53
5.13 Processamento das amostras biológicas para identificação do vírus SARS-COV-2	54
5.14 Quantificação de mediadores imunes solúveis.....	54
5.15 Análise estatística	54
5.16 Ética em pesquisa	56
5.17 Financiamento do estudo.....	57
5.18 Conflito de interesse	57
6 RESULTADOS.....	58
6.1 RESULTADOS DOS DESFECHOS CLÍNICOS DE GESTANTES ACOMETIDAS POR COVID-19 - ESTUDO PROUDEST.....	58
6.1.1 Descrição da população estudada para avaliação dos desfechos clínicos	58
6.1.2 Achados clínicos	60
6.1.3 Doenças encontradas em gestações prévias e na gestação avaliada	62
6.1.4 Sintomas de COVID-19 na gravidez	62
6.1.5 Desfechos maternos de acordo com o trimestre gestacional da infecção por SARS-CoV-2, gravidade da COVID-19 e fase da COVID-19 no parto	64
6.1.6 Desfechos clínicos nos recém-nascidos	67
6.2 RESULTADOS DA ANÁLISE RT-PCR PARA SARS-CoV-2 NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE GESTANTES NA FASE AGUDA DE COVID-19 - ESTUDO PROUDEST	70
6.2.1 Descrição da população estudada para investigação de SARS-CoV-2 no LCR	70
6.3 RESULTADOS DA ANÁLISE DE MEDIADORES IMUNES SOLÚVEIS AVALIADOS NO SORO E LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE PARTURIENTES ACOMETIDAS POR COVID-19 - ESTUDO PROUDEST.....	72
6.3.1 Descrição da população estudada para análise do perfil imunológico	72
6.3.2 Amostra de soro e líquido cefalorraquidiano para composição da análise do perfil imunológico do estudo PROUDEST	73
6.3.3 Mediadores imunes solúveis em amostras de soro de parturientes com fases agudas ou convalescentes de COVID-19	73
6.3.4 Mediadores imunes solúveis em amostras de LCR de parturientes com fases agudas ou convalescentes de COVID-19	76
6.3.5 Assinaturas gerais de mediadores imunológicos solúveis em amostras de soro e LCR de parturientes com fases agudas ou convalescentes de COVID-19	78
6.3.6 Circuitos de mediadores imunes solúveis em amostras de soro e LCR de parturientes com	

fases agudas ou convalescentes de COVID-19	81
6.3.7 Resumo das alterações nos mediadores imunes solúveis em amostras de soro e líquido cefalorraquidiano de parturientes com COVID-19 aguda ou fases de convalescença	85
6.3.8 Nuvens de correlação de mediadores imunes solúveis em amostras de soro e líquido cefalorraquidiano de parturientes com fases agudas ou convalescentes de COVID-19	88
7 DISCUSSÃO	90
7.1 Contexto epidemiológico das variantes do SARS-COV-2 no período do estudo	90
7.2 Sintomas associados à COVID-19	90
7.3 Taxa de cesárea	91
7.4 Resultados clínicos adversos da infecção por SARS-COV-2 nas gestantes e neonatos	91
7.5 Impacto da COVID-19 na mortalidade materna	94
7.6 Manifestações neurológicas associadas à COVID-19: investigação da presença do vírus SARS-COV-2 no líquido cefalorraquidiano	95
7.7 Análise do perfil imunológico de parturientes acometidas por SARS-COV-2 na gestação	97
8 POSSÍVEIS LIMITAÇÕES DO ESTUDO	101
9 CONCLUSÃO	103
10 PERSPECTIVAS	104
11 PRODUÇÃO CIENTÍFICA DO ESTUDO PROUDEST	105
11.1 Produções científicas relacionadas à defesa da tese	105
11.2 Produções científicas publicadas relacionadas ao estudo PROUDEST	106
11.3 Produções científicas em processo de publicação relacionadas ao estudo PROUDEST	107
12 BIBLIOGRAFIA	108
13 APÊNDICES	122
13.1 APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL Clinical Characteristic And Outcomes Of Pregnant Women With COVID-19: The Prouddest Prospective Cohort Study. Plos One	122
13.2 APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL Cerebrospinal fluid analysis of pregnant women at early stages of COVID-19. Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology	141
13.3 APÊNDICE C – ARTIGO ORIGINAL Pregnancy Outcomes And Child Development Effects of SARS-COV-2 Infection Study (PROUDEST): A Multicenter Prospective Cohort Study Protocol. JMIR Research Protocols	144
13.4 APÊNDICE D –ARTIGO ORIGINAL Panoramic Snapshot Of Serum Soluble Mediator Interplay In Pregnant Women With Convalescent Covid-19: An Exploratory Study. Frontiers in Immunology	155
13.5 APÊNDICE E – ARTIGO ORIGINAL Neuroimaging Assessment of Pediatric Cerebral Changes Associated With SARS-COV-2 Infection during pregnancy. Frontiers in pediatrics	170
14 ANEXOS	180

14.1 ANEXO A – Formas de recrutamento em mídias das gestantes infectadas por SARS-COV-2 incluídas no estudo PROUDEST	1818
14.2 ANEXO B – Ficha de coleta de dados	18379
14.3 ANEXO C - Parecer consubstanciado do CEP.....	18881
14.4 ANEXO D – Parecer consubstanciado da CONEP	186
14.5 ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	201

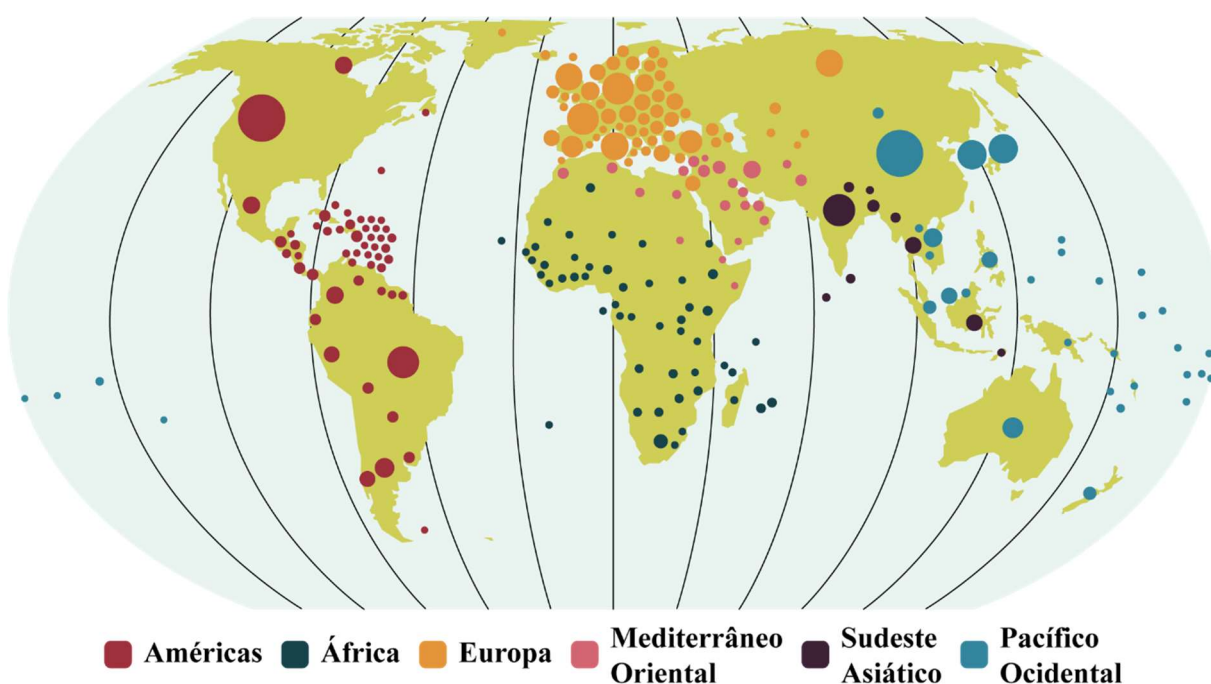
1 INTRODUÇÃO

1.1 COVID-19

A doença COVID-19, causada pelo *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* - SARS-CoV-2, um vírus de Ácido Ribonucleico - RNA de fita simples e sentido positivo, pertencente à família *Coronaviridae* e ao gênero *Betacoronavirus*, surgiu no final de 2019 na cidade de Wuhan, China, e sua rápida disseminação levou a Organização Mundial da Saúde - OMS a declarar uma pandemia global em 11 de março de 2020 (1,2).

Desde o final de 2019, o número de casos confirmados de COVID-19 e relatos de mortalidade e morbidade são presentes em todo o mundo. Globalmente, houve 778.050.175 casos confirmados de COVID-19, incluindo 7.096.935 mortes, relatados à OMS até 1º de junho de 2025 (3).

Figura 1 – Distribuição global de casos de COVID-19 relatados à Organização Mundial da Saúde (total cumulativo) até junho de 2025.



Fonte autoral: Adaptada de WHO (4)

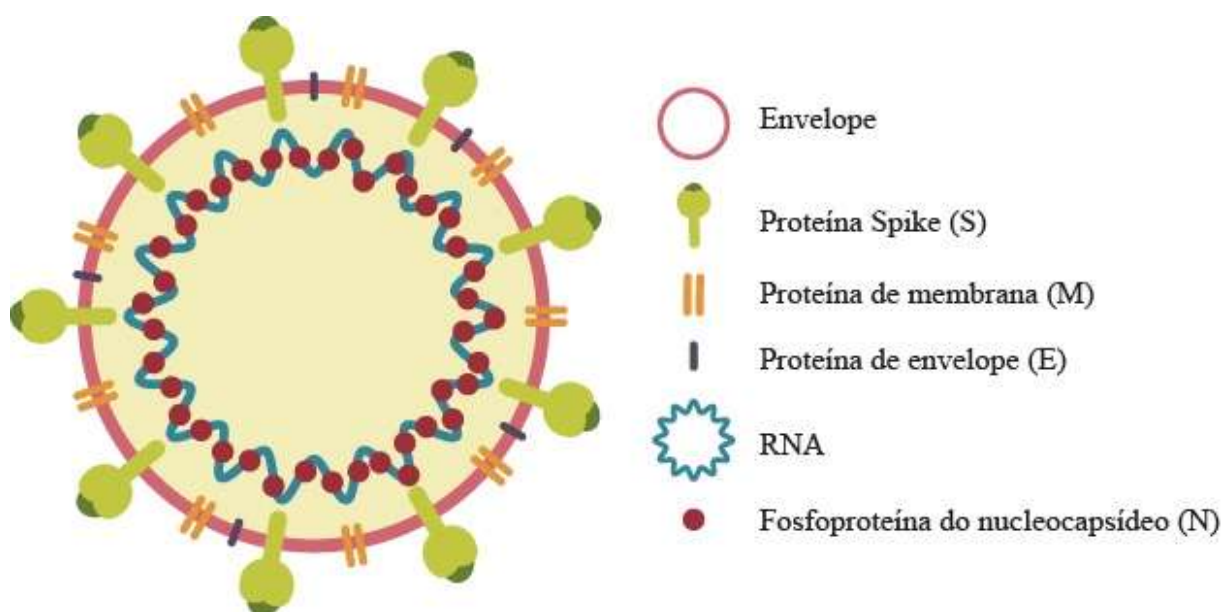
Os coronavírus - CoVs são vírus de RNA de fita simples, de sentido positivo, pertencentes à família *Coronaviridae*, amplamente distribuídos entre diversas espécies animais

e humanos. Esses vírus se organizam em quatro gêneros principais - α , β , γ e δ -, sendo os gêneros α e β os mais associados a infecções em mamíferos. O SARS-CoV-2, por sua vez, pertence ao gênero *Betacoronavirus*, subgênero *Sarbecovirus*, e está filogeneticamente relacionado a coronavírus de morcegos (5).

A estrutura viral dos CoVs é composta por quatro proteínas principais: proteína do nucleocapsídeo (N), proteína de membrana (M), proteína do envelope (E) e a glicoproteína *spike* (S). A proteína S, fundamental para a entrada viral, é dividida em duas subunidades: S1, responsável pela ligação ao receptor da célula hospedeira - ACE2 -, e S2, que promove a fusão da membrana viral à membrana celular. A clivagem entre essas subunidades por proteases do hospedeiro é essencial para a infectividade do vírus. A proteína M, a mais abundante na estrutura viral, define a forma do envelope, enquanto a proteína E atua na montagem e liberação de novos vírions. Já a proteína N interage com o RNA genômico, estabilizando o nucleocapsídeo e desempenhando um papel na montagem do vírus e na modulação da resposta imune do hospedeiro (6,7).

O genoma do SARS-CoV-2 é um dos maiores entre os vírus de RNA - cerca de 30 kb, contendo seis Quadros Abertos de Leitura - ORF. As ORFs 1a/1b, localizadas na extremidade 5', codificam proteínas não estruturais, incluindo a RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp), essencial para a replicação viral. As proteínas estruturais são codificadas nas ORF da extremidade 3'. Além disso, o vírus apresenta proteínas acessórias, como ORF3a, ORF6, ORF7a/b, ORF8 e outras, cuja função parece estar relacionadas à evasão da resposta imune (8).

Figura 2 - Estrutura do SARS-CoV-2



Fonte autoral. Adaptado de Bakhshandeh *et al.* (9).

1.1.1 COVID-19 e variantes

A *GISAID Data Science Initiative* - Iniciativa Global para o Compartilhamento de Todos os Dados sobre Influenza -, inicialmente lançada em maio de 2008 para o compartilhamento rápido de dados sobre o vírus influenza, expandiu sua pesquisa para dados de outros patógenos prioritários, incluindo o Vírus Sincicial Respiratório - RSV, o vírus da varíola dos macacos - hMpxV e o **Coronavírus humano de 2019** - hCoV-19, bem como o arbovírus, incluindo chikungunya, dengue e zika. Isso inclui sequência genética e dados clínicos e epidemiológicos relacionados associados a vírus humanos, e dados geográficos e específicos de espécies associados a vírus aviários e outros animais, para ajudar os pesquisadores a entender como os vírus evoluem e se espalham durante epidemias e pandemias (10).

Dada a evolução contínua do vírus SARS-CoV-2 e os constantes desenvolvimentos em nossa compreensão dos impactos das variantes, as definições das variantes virais são ajustadas periodicamente e publicadas em plataformas como *European Centre For Disease Prevention and Control* - ECDC, *GISAID Data Science Initiative* e OMS (10–12).

Abaixo estão as Variantes de Preocupação - VOC do SARS-CoV-2, segundo dados publicados pela OMS até março de 2023. VOC: uma variante do SARS-CoV-2 que atende à definição de Variantes de Interesse - VOI e, por meio de uma avaliação comparativa, demonstrou estar associada a uma ou mais das seguintes mudanças em um grau de importância para a saúde pública global: aumento da transmissibilidade ou mudança prejudicial na epidemiologia do COVID-19; ou aumento da virulência ou alteração na apresentação clínica da doença; ou diminuição da eficácia das medidas sociais e de saúde pública ou diagnósticos, vacinas e terapêuticas disponíveis (12).

Tabela 1 - Variantes de preocupação (VOC) do SARS-CoV-2, segundo dados publicados pela OMS.

Classificação OMS	Linhagem PANGO	Descrição GISAID	Próximo conjunto de cepas	Primeiras amostras documentadas	Data de designação
Alfa	B.1.1.7	GRY	20I V1	Reino Unido, Set-2020	VOC: 18-Dez-2020
Beta	B.1.351	GH / 501Y. V2	20H V2	África do Sul, maio-2020	VOC: 18-Dez-2020
Gama	P. 1	GR / 501Y. V3	20J V3	Brasil, Nov-2020	VOC: 11 de janeiro de 2021
Delta	B.1.617.2	G / 478K. V1	21A, 21I, 21J	Índia, outubro de 2020	VOI: 4 de abril de 2021 VOC: 11 de maio de 2021

Omicron	B.1.1.529	GR/484A	21K	Vários países, nov-2021	VOC: 26-Nov-2021
---------	-----------	---------	-----	----------------------------	------------------

Fonte: Adaptado de *World Health Organization* (WHO)(12).

OMS = Organização Mundial de Saúde; Linhagem PANGO = Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak inclui todas as linhagens descendentes; GISAID = *Global Initiative on Sharing All Influenza Data* (10).; VOC = Variantes de Preocupação; VOI = Variantes de Interesse

1.1.2 Ciclo de vida do SARS-CoV-2

O ciclo de vida viral inclui a ligação do SARS-CoV-2 ao receptor da Enzima Conversora de Angiotensina 2 - ACE2, a fusão com a membrana celular, liberação do RNA genômico no citoplasma, a tradução das proteínas virais, a replicação do RNA e a montagem dos novos vírions no retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Os vírions são então transportados em vesículas até a membrana plasmática e liberados por exocitose (13).

Após a exocitose, podem ser desencadeadas vias intracelulares que culminam em diferentes formas de morte celular, como a apoptose ou a piroptose — esta última caracterizada por intensa resposta inflamatória. A proteína E viral contribui para o desequilíbrio dos íons celulares ao induzir a liberação de cálcio do complexo de Golgi para o citoplasma e a saída de potássio da célula para o meio extracelular. Esse desbalanço iônico ativa os inflamassomas, em especial os da família de genes NLR (*Nucleotide-binding domain Leucine-rich Repeat containing proteins*), relacionados ao domínio de pirina. A ativação dos inflamassomas leva à clivagem da gasdermina-D, à formação de poros na membrana celular, à liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18, e, por fim, ao edema e à lise celular (14).

A enzima conversora de angiotensina 2, principal receptor para entrada do SARS-CoV-2, está expressa em diversos tecidos humanos, o que justifica a ampla gama de manifestações clínicas da COVID-19. Entre os principais locais de expressão estão o trato respiratório superior e inferior (especialmente nas células epiteliais nasais, traqueais e alveolares), epitélio intestinal, rins (nos túbulos proximais), coração (nos cardiomiócitos e endotélio vascular), fígado (nos colangiócitos), sistema nervoso central, conjuntiva ocular, endotélio vascular entre outros.

Essas características estruturais e funcionais, somadas à alta afinidade da proteína *spike* pelo receptor ACE2 humano, contribuem para a rápida disseminação e tropismo multissistêmico do vírus (7,15,16).

1.1.3 Replicação viral

O período de incubação da COVID-19 pode se estender por até 14 dias, sendo que a maioria dos casos manifesta sintomas entre o terceiro e o sétimo dia, com média estimada de 5,2 dias. No entanto, já entre o segundo e o quarto dia após a exposição, é possível detectar RNA viral em amostras do trato respiratório superior, mesmo em indivíduos assintomáticos ou na fase pré-sintomática. A infectividade é mais elevada até aproximadamente o oitavo dia de infecção, com declínio progressivo da carga viral a partir desse ponto em pessoas imunocompetentes. Em contrapartida, em pacientes com quadros graves ou imunossuprimidos, a replicação viral pode se estender por mais de duas semanas. Esse padrão virológico, caracterizado por alta carga viral nos estágios iniciais e capacidade de transmissão antes do surgimento dos sintomas, representa um dos principais desafios para o controle da disseminação comunitária do SARS-CoV-2 (17,18).

1.1.4 Fisiopatologia da doença COVID-19

Após a entrada do SARS-CoV-2 no organismo, geralmente por meio de gotículas respiratórias, o vírus inicialmente se replica nas células epiteliais do trato respiratório superior, particularmente na cavidade nasal e orofaringe, onde os receptores ACE2 são abundantemente expressos. Esse processo ocorre nos primeiros dias após a exposição, podendo evoluir com a disseminação viral para os pulmões, epitélio gastrointestinal e outros órgãos. Nos casos mais graves, a infecção pode desencadear uma resposta inflamatória desregulada conhecida como tempestade de citocinas — termo originalmente utilizado em 1993 para descrever a resposta exacerbada em reações de enxerto contra hospedeiro, e que passou a caracterizar a produção excessiva de citocinas com potencial de causar dano tecidual severo (19,20).

Na COVID-19, esse quadro está associado à elevação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β , TNF- α , MCP-1, IL-8 e interferon- γ . A resposta tem início com a ligação da proteína *spike* ao receptor ACE2 nas células epiteliais respiratórias, seguida pela ativação da protease TMPRSS2. A infecção promove uma resposta imune inata ineficiente em interferons, mas com ativação exacerbada de linfócitos Th1 patogênicos e monócitos CD14⁺CD16⁺, que liberam grandes quantidades de mediadores inflamatórios. A infiltração de macrófagos e neutrófilos no tecido pulmonar intensifica ainda mais o processo inflamatório, levando à lesão tecidual. Simultaneamente, vias intracelulares como NF- κ B e STAT3 são ativadas, ampliando a produção de citocinas via complexo IL-6/IL-6R. O desbalanço do sistema renina-angiotensina, resultante

da ocupação do ACE2 pelo vírus, favorece o acúmulo de angiotensina II, que atua como amplificador da inflamação. Essa cascata de eventos cria um ambiente pró-inflamatório persistente, contribuindo para trombose, lesão endotelial, Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo - SDRA e falência de múltiplos órgãos — sendo este um dos principais determinantes da gravidade e da mortalidade na COVID-19 (14,21–23).

Nos pulmões acometidos, observa-se intenso infiltrado inflamatório intersticial composto majoritariamente por linfócitos, que se distribuem ao redor de vasos de pequeno calibre, frequentemente ocupados por agregados de plaquetas e presença de trombos. Os alvéolos mostram-se preenchidos por membranas hialinas, células epiteliais alveolares tipo 2 descamadas e grande acúmulo de muco. Além disso, edema do endotélio vascular e trombos constituídos por fibrina são encontrados de forma difusa nas regiões afetadas, correspondendo às áreas de opacidades em vidro fosco evidenciadas nos exames de imagem (14,18).

Em análises histopatológicas realizadas por meio de biópsias e autópsias, tanto em pacientes com COVID-19 em estágios iniciais quanto em fases mais avançadas da doença, foram identificadas lesões pulmonares compatíveis com dano alveolar difuso. Entre as alterações encontradas estavam a presença de membranas hialinas, infiltração de macrófagos e células mononucleares nos espaços alveolares, além do espessamento generalizado das paredes dos alvéolos. Por meio de microscopia eletrônica, partículas virais foram visualizadas nas células epiteliais brônquicas e também nas células alveolares tipo 2 (20).

A infecção pelo SARS-CoV-2, embora afete primariamente os pulmões, tem repercussões significativas sobre o sistema cardiovascular. Entre os efeitos diretos, destacam-se a lesão miocárdica aguda, miocardite, arritmias, pericardite e disfunções valvares, podendo ocorrer também disautonomia no contexto da COVID longa. Esses eventos são potencializados pela inflamação sistêmica intensa, disfunção endotelial, estado pró-trombótico e aumento da demanda metabólica em situações de hipoxemia e sepse viral (23).

A elevada expressão de ACE2 nos enterócitos do intestino delgado também torna o trato gastrointestinal um local permissivo à entrada e replicação do SARS-CoV-2. A infecção direta dessas células compromete a função reguladora do sistema renina-angiotensina no ambiente intestinal, favorecendo o acúmulo de angiotensina II. Esse desbalanço contribui para a ruptura da barreira epitelial intestinal, facilitando a translocação de bactérias, endotoxinas e metabólitos para a circulação sistêmica. Como consequência, observam-se disfunção da barreira mucosa, perda de integridade da parede intestinal e disbiose, condições que podem amplificar a resposta inflamatória sistêmica e contribuir para o agravamento do quadro clínico. Clinicamente, o acometimento intestinal manifesta-se por sintomas como diarreia, dor abdominal, náuseas e

vômitos, frequentemente associados à detecção de RNA viral nas fezes (24).

O comprometimento renal na COVID-19 pode ocorrer em diferentes momentos da evolução clínica da doença. Diversos mecanismos estão envolvidos nessa lesão, incluindo trombose de vasos intrarrenais, dano direto aos túbulos renais causado pela infecção viral e processos glomerulares inflamatórios. Além das causas intrínsecas ao rim, fatores sistêmicos como a redução do volume circulante efetivo, a rabdomiólise e a disfunção orgânica múltipla também contribuem para a injúria renal observada em pacientes com COVID-19 (25,26).

Estudos histopatológicos demonstraram que o SARS-CoV-2 é capaz de infectar diretamente células renais humanas, especialmente os túbulos proximais, por meio da expressão do receptor ACE2. A presença do vírus no tecido renal foi confirmada por técnicas de hibridização *in situ* e imunohistoquímica, evidenciando replicação viral ativa nos rins. A infecção promove resposta inflamatória local, disfunção tubular e ativação de vias pró-fibróticas, contribuindo para lesão aguda e desenvolvimento de fibrose renal. Além disso, a ativação de células imunes, como macrófagos e células T, intensifica a lesão, sugerindo que tanto o efeito citopático direto quanto mecanismos imunomediados participam da fisiopatologia da injúria renal induzida pelo vírus (25,26).

No sistema nervoso central, o SARS-CoV-2 pode atuar tanto de forma direta quanto indireta, sendo esta última mediada por uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada. O receptor ACE2 — principal porta de entrada do vírus — está presente em células endoteliais cerebrais e em áreas do tronco encefálico, o que torna o Sistema Nervoso Central - SNC um possível alvo da infecção. Acredita-se que a invasão viral possa ocorrer por diferentes vias: hematogênica, através da barreira hematoencefálica comprometida pela inflamação sistêmica; ou via nervo olfatório, com transporte retrógrado até o cérebro. Os danos neurológicos podem incluir encefalopatia, Acidente Vascular Cerebral - AVC isquêmico ou hemorrágico, convulsões, anosmia, agitação, alterações cognitivas e sintomas psiquiátricos (27,28).

1.1.5 Métodos diagnósticos

A detecção da infecção viral pode ser realizada especificamente por métodos que verifiquem a existência de material genético circulante ou que avaliem a resposta imunológica do hospedeiro após a infecção.

1.1.5.1 Detecção de ácidos nucleicos

A técnica de RT-PCR - transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

- é atualmente considerada o padrão-ouro para a detecção do SARS-CoV-2 em uma amostra biológica por sua capacidade de identificar diretamente fragmentos do RNA genômico viral, ao contrário de métodos que detectam marcadores secundários como antígenos ou anticorpos (29,30).

Essa técnica envolve duas etapas principais: a conversão do RNA viral em DNA complementar - cDNA por meio da enzima transcriptase reversa, seguida da amplificação do cDNA utilizando *primers* específicos e sondas fluorescentes.

Os kits de RT-PCR podem ser aplicados em amostras de diversas regiões do corpo, incluindo *swabs* nasofaríngeos, orofaríngeos e nasais, aspirados das vias respiratórias superiores e inferiores, lavado broncoalveolar e escarro, fezes, líquido e sangue dentre outros.

Apesar de ser um método altamente sensível e específico, sua eficiência depende da carga viral presente na amostra, o que pode limitar sua sensibilidade nos estágios muito iniciais da infecção ou em pacientes já recuperados. Além disso, a capacidade limitada e custo de testagem diária representa um obstáculo para o monitoramento populacional em larga escala (30).

1.1.5.2 Testes para detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2

Diversos testes comercialmente disponíveis foram desenvolvidos para detectar anticorpos contra o SARS-CoV-2, com o objetivo de identificar exposição prévia ao vírus e auxiliar na vigilância epidemiológica. Entre os métodos laboratoriais tradicionais, destacam-se as **sorologias** que utilizam os ensaios imunoenzimáticos ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assays* – e os imunoenaios quimioluminescentes CLIA – *chemiluminescent immunoassays*, que permitem a detecção quantitativa e qualitativa de anticorpos IgM, IgG e, em alguns casos, IgA. Além desses, **testes rápidos** em formato de fluxo lateral, aplicáveis em pontos de atendimento (*point-of-care*) como os imunoenaios baseados em ouro coloidal - CGIA (*colloidal-gold based immunoassays*) e os imunoenaios fluorescentes - FIA (*fluorescent immunoassays*), têm sido amplamente utilizados pela sua praticidade, embora apresentem maior variabilidade de desempenho entre fabricantes.

A acurácia dos testes sorológicos varia significativamente conforme o tempo decorrido desde o início dos sintomas. Estudos demonstram que, quando realizados na primeira semana após o aparecimento dos sintomas, os testes de anticorpos detectaram apenas 27% a 41% das infecções. Esse percentual aumentou para 64% a 79% na segunda semana e para 78% a 88% na terceira semana. Testes direcionados especificamente à detecção de anticorpos IgG ou IgM

mostraram-se os mais precisos, alcançando 93% de sensibilidade a partir do 21º dia após o início dos sintomas. Em relação à especificidade, a taxa de falsos positivos foi de aproximadamente 1% entre indivíduos não infectados. Esses dados reforçam a importância da escolha adequada do tempo para a realização do teste e da interpretação dos resultados dentro do contexto clínico e epidemiológico (31–36).

Além de métodos específicos, outras metodologias inespecíficas auxiliam o médico na confirmação diagnóstica. São métodos mais acessíveis, mas que não têm achados patognomônicos, sendo, portanto, necessária suspeição clínica associada ao seu uso.

1.1.5.3 Achados de imagem

A tomografia computadorizada - TC de tórax tem sido amplamente empregada na avaliação de pacientes com suspeita de COVID-19, dadas as imagens sugestivas que incluem opacidades em vidro fosco. As opacidades em vidro fosco apresentam margens mal definidas, são geralmente bilaterais, multilobares, com distribuição periférica e broncogramas aéreos; apresentam espessamento interlobular ou septal liso ou irregular, e espessamento da pleura adjacente frequentemente associadas a consolidações. Esses achados são especialmente úteis na triagem de casos com quadro clínico sugestivo, mesmo diante de testes moleculares negativos ou inconclusivos (37). Estudos indicam que a TC de tórax pode atingir taxas de detecção superiores a 90% nos estágios iniciais da doença, superando, em alguns contextos, a sensibilidade do RT-PCR na fase precoce da infecção. Entretanto, as alterações são inespecíficas e podem ser devidas a outras infecções pulmonares (38).

1.1.6 Quadro clínico

A COVID-19 apresenta um espectro clínico bastante variável, desde formas assintomáticas ou leves até quadros graves com risco de morte. Os sintomas mais frequentes incluem febre, tosse, fadiga, dispneia, mialgia. Alterações no paladar e no olfato também foram relatadas precocemente como sinais característicos da infecção. Em alguns casos, há manifestações gastrointestinais, como diarreia, náuseas e dor abdominal. Manifestações neurológicas (cefaleia, confusão mental, acidente vascular cerebral), cutâneas (*rash*, urticária), hepáticas, renais e cardiovasculares também foram observadas, refletindo o potencial multissistêmico da infecção pelo SARS-CoV-2 (13,39).

Em uma parcela dos pacientes, a COVID-19 pode evoluir para formas graves, caracterizadas por insuficiência respiratória aguda, choque séptico, lesões miocárdicas e renais agudas, morte súbita ou choque hemorrágico (40,41).

1.1.7 Fases da infecção por SARS-CoV-2 e suas manifestações clínicas

A COVID-19 apresenta um curso clínico em fases distintas, refletindo a progressão da infecção e a resposta do hospedeiro.

Na **fase inicial**, o vírus infecta preferencialmente células epiteliais do trato respiratório superior, como as localizadas na cavidade nasal e na faringe. Nesse estágio precoce, inicia-se a replicação viral, acompanhada da ativação da resposta imune inata, mediada por citocinas e *interferons* antivirais. Esses mediadores são fundamentais para o desencadeamento da resposta imune adaptativa. Clinicamente, os pacientes podem apresentar sintomas como febre, mal-estar, tosse e produção de escarro, sendo também capazes de transmitir o vírus a outras pessoas, inclusive antes do aparecimento dos sintomas. Quando o sistema imune do hospedeiro consegue montar uma resposta eficiente, especialmente mediada por *interferons* tipo I, a replicação viral tende a ser controlada ainda nesta fase, o que pode limitar a gravidade do quadro clínico (13,28).

Entretanto, se essa resposta inicial for tardia ou insuficiente, a infecção pode progredir para uma fase tardia, marcada por uma resposta inflamatória desregulada. Nesse estágio, predomina a ativação de vias inflamatórias associadas a Padrões Moleculares de Dano - DAMP, oriundos de células infectadas e disfuncionais. Linfócitos T auxiliares (CD4+) e citotóxicos (CD8+) são recrutados e sequestrados no tecido pulmonar, onde ocorre morte celular por apoptose, necrose ou piroptose, agravando o dano tecidual. O ambiente inflamatório favorece a ativação de fatores teciduais pró-coagulantes em células endoteliais, macrófagos e neutrófilos, levando à formação de microtrombos nos capilares pulmonares, à SDRA e ao aumento do risco de óbito (13,28,39).

Essa sequência de eventos, da fase tardia do COVID-19, divide-se em três estágios clínicos:

1. Fase aguda ou pulmonar – caracterizada pela lesão pulmonar primária e sintomas respiratórios, associados a achados de opacidades em vidro fosco ou consolidação pulmonar na imagem.
2. Fase de viremia sistêmica – em que o vírus atinge a circulação e desencadeia inflamação multissistêmica. Essa fase está associada à inflamação generalizada e à elevação de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , entre outras), configurando-se como a tempestade

de citocinas, um dos principais mecanismos responsáveis pela disfunção endotelial, lesão tecidual difusa e risco de falência de múltiplos órgãos.

3. Fase letal ou de recuperação – quando a resposta inflamatória sistêmica persiste e pode culminar em falência de múltiplos órgãos ou, nos casos favoráveis, na resolução da doença.

1.1.8 Fatores de risco para gravidade da doença COVID-19

Diversas condições individuais e clínicas foram associadas ao risco aumentado de desenvolver formas graves da COVID-19. A idade avançada é um dos fatores mais consistentes, especialmente em indivíduos com mais de 60 anos, que apresentam maior propensão à hospitalização, necessidade de ventilação mecânica e mortalidade. Doenças crônicas preexistentes, como hipertensão arterial, diabetes *mellitus*, doença cardiovascular, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica - DPOC, insuficiência renal crônica e obesidade, também estão fortemente associadas à evolução desfavorável da doença (40).

Além disso, o sexo masculino tem sido relacionado a maior gravidade e mortalidade, possivelmente devido a diferenças imunológicas, hormonais e comportamentais. Baixo nível socioeconômico, acesso limitado à saúde e etnia, que, em determinados contextos, refletem desigualdades estruturais na exposição ao vírus e no tratamento recebido também são importantes fatores de risco. Condições imunossupressoras, como o câncer em tratamento ativo, uso de imunossupressores e transplantes, também conferem maior vulnerabilidade. Assim como o período gestacional e puerperal (17).

Em gestantes, modificações nos sistemas cardiovascular e respiratório, incluindo aumento da frequência cardíaca, do volume sistólico, do consumo de oxigênio e redução da capacidade pulmonar, associam-se ao risco elevado de evolução para quadros respiratórios graves. Além disso, adaptações imunológicas necessárias para tolerância materno-fetal, como a diminuição da resposta imune celular e alterações na expressão de receptores epiteliais, também contribuem para uma maior vulnerabilidade das gestantes frente a infecções virais (42).

1.2 A GESTAÇÃO E COVID-19

No início da pandemia, os impactos reais do COVID-19 na gravidez, saúde materna e fetal e puerpério, bem como o impacto no desenvolvimento a longo prazo de crianças nascidas de mulheres infectadas durante a gravidez, eram completamente desconhecidos (43).

À medida em que a pandemia de COVID-19 progredia, as mulheres grávidas foram sendo consideradas de alto risco para complicações e doenças graves, semelhantes a outros surtos de coronavírus, como os surtos de SARS e Síndrome Respiratória do Oriente Médio - MERS (44,45).

1.2.1 A Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) na gestação

A Síndrome Respiratória Aguda Grave - SARS, causada pelo coronavírus SARS-CoV-1, surgiu na China em 2002 e rapidamente se espalhou para 33 países, com mais de 8.400 casos confirmados e 813 mortes, resultando em uma taxa de letalidade de aproximadamente 9,6% (46). O surto foi atribuído à transmissão zoonótica a partir da civeta-de-palma-mascarada em mercados de animais, seguida de transmissão interpessoal, principalmente por gotículas respiratórias (47). Gestantes infectadas durante esse surto apresentaram risco aumentado de desfechos maternos e perinatais adversos. Em uma das maiores séries disponíveis, envolvendo 12 gestantes com SARS-CoV-1, a taxa de mortalidade materna chegou a 25%, com maior necessidade de ventilação mecânica em comparação à população não gestante (48). Além disso, foram relatadas taxas elevadas de aborto espontâneo no primeiro trimestre, parto prematuro e restrição de crescimento intrauterino - RCIU nos demais trimestres (49).

A apresentação clínica em gestantes não diferiu significativamente da população geral, predominando sintomas como febre, tosse seca, mialgia e mal-estar, evoluindo em alguns casos para insuficiência respiratória grave. Não houve evidência de transmissão vertical do vírus para os fetos, mesmo nos casos com evolução clínica mais grave (49).

Embora o SARS-CoV-1 tenha sido contido até 2004, os dados coletados durante esse período forneceram informações valiosas sobre os riscos que infecções por coronavírus podem representar durante a gravidez. Os impactos observados contribuíram para o reconhecimento da vulnerabilidade imunológica e fisiológica da gestante frente a infecções virais emergentes, estabelecendo um importante precedente para a vigilância obstétrica durante epidemias futuras.

1.2.2 Infecção por MERS-CoV na gestação

A infecção pelo coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio - MERS-CoV, identificada pela primeira vez na Arábia Saudita em 2012, representa uma zoonose causada por um betacoronavírus, com potencial de transmissão zoonótica, especialmente por camelos dromedários, e interpessoal, frequentemente associada a surtos nosocomiais em ambientes com falhas nas medidas de controle de infecção (49). Até janeiro de 2020, mais de 2500 casos haviam sido notificados à OMS, com taxa de letalidade global estimada em 34,3% (49).

Embora a ocorrência de MERS-CoV durante a gestação tenha sido pouco documentada, os estudos disponíveis indicam associação com importantes desfechos obstétricos adversos. Uma revisão sistemática com metanálise mostrou que a infecção esteve associada a uma proporção agrupada de parto prematuro de – 32,1% IC95%: 10,0–59,8 –, todos ocorrendo antes de 34 semanas de gestação. A taxa de cesariana foi de 61,8% – IC95%: 32,7–86,9) – e a de óbito perinatal foi de 33,2% – IC95%: 11,2–59,9 –, incluindo dois natimortos e um óbito neonatal precoce de recém-nascido extremamente prematuro (44,50). Não foram relatados casos de ruptura prematura das membranas, restrição de crescimento fetal, sofrimento fetal, Apgar ≤ 7 no quinto minuto ou asfixia neonatal. Ademais, não houve registros confirmados de transmissão vertical do MERS-CoV para os recém-nascidos, mesmo na presença de doença materna grave (50).

Esses achados foram corroborados por uma revisão narrativa publicada em 2021, que descreveu uma série de 11 gestantes com MERS-CoV, das quais 64% desenvolveram formas graves da doença que exigiram internação em unidade de terapia intensiva, e 27% evoluíram a óbito. Além disso, 45% das pacientes apresentaram parto prematuro e 27% sofreram perda fetal, com óbitos ocorrendo em 20, 24 e 34 semanas de gestação. A maioria dos casos foi diagnosticada no segundo ou terceiro trimestre. A apresentação clínica em gestantes foi semelhante à da população geral, com febre, tosse, dispneia, mialgia e sintomas gastrointestinais (50).

1.2.3 SARS-CoV-2 na gestação

De acordo com o Observatório Obstétrico Brasileiro, que utilizou dados do SIVEP-Gripe atualizados em 24 de maio de 2025, houve 2.247.660 casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave - SRAG por COVID-19 no Brasil, dos quais 25.332 casos foram diagnosticados em gestantes e puérperas - 1% (51).

Estudos multicêntricos que avaliam os resultados maternos e perinatais após a infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez e o período pós-parto incluem o Grupo de Estudo da Rede Brasileira de Pesquisa em Obstetrícia e COVID-19 - REBRACO (52), Coorte COVI-PREG (53), Estudo de Coorte Multinacional INTERCOVID (54) e outros.

1.2.3.1 SARS-CoV-2 na gestação: achados do estudo REBRACO

O estudo REBRACO - Rede Brasileira de Pesquisa em Obstetrícia e COVID-19 foi uma coorte prospectiva multicêntrica desenvolvida com o objetivo de investigar os impactos da infecção por SARS-CoV-2 em gestantes e puérperas brasileiras. Conduzido entre fevereiro de 2020 e fevereiro de 2021, o estudo incluiu 729 mulheres sintomáticas com síndrome gripal, atendidas em 15 maternidades de referência distribuídas por quatro regiões do Brasil. Todas as participantes apresentavam sintomas compatíveis com infecção por COVID-19 no momento da inclusão. Dentre elas, 674 (89,7%) estavam gestantes e 55 (10,3%) eram puérperas. Apesar da sintomatologia sugestiva, apenas 563 (77,2%) foram testadas para COVID-19 por meio de RT-PCR, testes rápidos ou sorologia. Isso significa que 166 mulheres (22,8%) não foram submetidas a testagem durante o episódio clínico, evidenciando as limitações logísticas e operacionais enfrentadas no país, especialmente nas fases iniciais da pandemia.

Entre as mulheres testadas, 289 (51,3%) tiveram diagnóstico confirmado de COVID-19, seja por método laboratorial ou por achados radiológicos compatíveis (como opacidades em vidro fosco na tomografia de tórax), enquanto 270 (48%) apresentaram resultados negativos. Para a análise de desfechos gestacionais, foram consideradas apenas as mulheres com status diagnóstico confirmado e com seguimento completo até o parto. Nesse recorte, 481 participantes (80,7%) tiveram desfechos obstétricos documentados, sendo que 374 apresentavam informações completas sobre o status de infecção por SARS-CoV-2.

Os resultados do estudo demonstraram que 16,3% das mulheres com COVID-19 confirmada evoluíram com Síndrome Respiratória Aguda Grave - SRAG, 16,7% necessitaram de internação em unidade de terapia intensiva - UTI, e 4,7% evoluíram para óbito materno. Além disso, 21,5% apresentaram desfechos maternos graves, incluindo SRAG, internação em UTI ou morte.

Fatores de risco associados à evolução para formas graves da doença incluíram: etnia não branca (RR 1,78), baixa escolaridade (RR 2,16), sobrepeso (RR 4,34) ou obesidade (RR 6,55), assistência pré-natal exclusiva no sistema público de saúde (RR 2,16), hipertensão

crônica (RR 2,15), diabetes pré-existente (RR 3,20), asma (RR 2,22), anemia (RR 3,15) e infecção adquirida no puerpério (RR 6,00)

Do ponto de vista neonatal, os recém-nascidos de mães com COVID-19 confirmada apresentaram maior risco de ventilação mecânica (RR 1,78), morbidade neonatal (RR 1,43), anomalias congênitas (RR 1,36) e óbito neonatal (RR 1,68), em comparação com filhos de mães sintomáticas com testes negativos (52).

1.2.3.2 SARS-CoV-2 na gestação: achados do estudo COVI-PREG

O estudo prospectivo multicêntrico COVI-PREG, conduzido em 12 hospitais da França e Suíça, entre março de 2020 e setembro de 2022, avaliou 2.055 gestantes não vacinadas com infecção confirmada por SARS-CoV-2, classificando-as conforme a predominância temporal das variantes: pré-Delta (n = 1402), Delta (n = 262) e Omicron (n = 391).

A principal variável avaliada foi o desfecho materno adverso grave, definido como admissão em UTI, SDRA, necessidade de oxigenoterapia avançada ou óbito materno. A análise mostrou que a variante Delta esteve associada a maior risco de gravidade materna, com 6,5% dos casos apresentando desfechos graves, comparados a 3,4% no período pré-Delta (RR ajustado = 1,8; IC95%: 1,1–3,2). Já no período de predominância da variante Omicron, a proporção caiu para 1,0%, com risco significativamente menor de complicações graves em relação ao pré-Delta (RR ajustado = 0,3; IC95%: 0,1–0,8).

Apesar de o risco de internação hospitalar ter se mantido elevado durante a onda Omicron (12,5%), nenhuma paciente necessitou de ventilação mecânica ou oxigênio em alto fluxo, e nenhuma foi admitida em UTI por mais de 7 dias. Isso sugere que, embora menos grave, a infecção por Omicron não deve ser trivializada na gestação.

A taxa de parto prematuro (< 37 semanas) foi de 9,3% no período pré-Delta, 13,7% no Delta e 11,0% no Omicron. Partos prematuros extremos (< 28 semanas) ocorreram em 0,6% das gestantes no pré-Delta, 0,0% no Delta e 0,8% no Omicron. O parto prematuro iatrogênico relacionado diretamente à COVID-19 foi mais comum durante a fase Delta.

Entre os desfechos perinatais, observou-se aumento na proporção de natimortos no período Delta (2,8%) em comparação ao pré-Delta (0,5%) e Omicron (0,9%). A maioria dos nascimentos ocorreu por parto vaginal (68,9% pré-Delta, 71,6% Delta e 75,2% Omicron), com redução progressiva da taxa de cesariana no período mais recente. As taxas de internação em unidade neonatal também diminuíram ao longo do tempo: 12,5% no pré-Delta, 9,9% no Delta e 9,7% no Omicron (53).

1.2.3.3 SARS-CoV-2 na gestação: achados do estudo INTERCOVID

O estudo *INTERCOVID - Multinational Cohort Study* foi um estudo prospectivo internacional multicêntrico, coordenado pela Universidade de *Oxford*, que avaliou os impactos da infecção por SARS-CoV-2 durante a gestação em comparação com gestantes não infectadas. A análise incluiu 2.130 gestantes com diagnóstico confirmado de COVID-19 e 4.437 controles sem infecção, acompanhadas em 43 instituições de 18 países, incluindo o Brasil.

Os resultados demonstraram que a infecção por SARS-CoV-2 durante a gestação está significativamente associada a maior risco de morbidade materna grave, parto prematuro e complicações neonatais. As gestantes com COVID-19 apresentaram 50% mais chances de desenvolver pré-eclâmpsia/eclâmpsia/HELLP, três vezes mais risco de infecção grave, e necessidade de admissão em unidade de terapia intensiva com frequência significativamente maior que as não infectadas (OR ajustada para UTI = 5,2; IC95%: 3,3–8,3). Também foi observado risco aumentado de parto cesáreo (OR ajustada = 1,4; IC95%: 1,2–1,6), com uma parcela considerável dessas indicações sendo diretamente atribuídas à infecção viral.

No que diz respeito aos desfechos fetais e neonatais, os recém-nascidos de mães com COVID-19 apresentaram taxa de prematuridade significativamente maior (OR ajustada = 1,6; IC95%: 1,4–1,9), especialmente quando a infecção ocorreu no terceiro trimestre. Além disso, houve aumento na ocorrência de baixa pontuação de Apgar no 5º minuto, internações em UTI neonatal e complicações respiratórias neonatais, com tendência a maior risco de mortalidade perinatal, embora sem significância estatística após ajuste multivariado (54).

1.2.3.4 Evidências científicas sobre os impactos da infecção por SARS-CoV-2 na gravidez

Outros estudos também avaliaram os resultados maternos e perinatais após a infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez e o período pós-parto como descrito no Quadro 1, a seguir.

Quadro 1. Resumo de estudos publicados sobre desfechos clínicos maternos e perinatais em gestantes acometidas por COVID-19 no período gravídico-puerperal

Estudo	Países envolvidos	Tipo de estudo	Período do estudo	Número de gestantes incluídas	Desfecho principal	Principais achados
REBRACO (Sci Rep. 2022)	Brasil	Coorte prospectiva multicêntrica	Fev 2020 – Fev 2021	729 gestantes sintomáticas com suspeita de COVID-19.	Morbidade materna grave, SRAG, óbito e desfechos neonatais	Etnia não branca (RR 1,78 [1,04–3,04]), escolaridade primária ou menos (RR 2,16 [1,21–3,87]), sobrepeso (RR 4,34 [1,04–19,01]) ou obesidade (RR 6,55 [1,57–27,37]), realização de pré-natal público (RR 2,16 [1,01–4,68]), gestação planejada (RR 2,09 [1,15–3,78]), início da infecção no pós-parto (RR 6,00 [1,37–26,26]), hipertensão crônica (RR 2,15 [1,37–4,10]), diabetes pré-existente (RR 3,20 [1,37–7,46]), asma (RR 2,22 [1,14–4,34]) e anemia (RR 3,15 [1,14–8,71]) foram associados a maior risco de SRAG. Maior risco de óbito materno (4,7%), SRAG, internação em UTI e maior morbidade neonatal em infectadas por SARS-CoV-2
COVI-PREG (Lancet Reg Health Eur. 2023)	França e Suíça	Coorte prospectiva multicêntrica	Mar 2020 – Set 2022	2055 com COVID-19 confirmada	Gravidade materna e neonatal segundo variantes (pré-Delta, Delta, Omicron)	Cepa Delta do SARS-CoV-2 com maior gravidade (aRR=1,8), Omicron com menor risco (aRR=0,3), hospitalização alta em todos os períodos
INTERCOVID (JAMA Pediatr. 2021)	43 centros em 18 países	Coorte multinacional prospectiva	Mar 2020 – Out 2020	2130 com COVID-19 + 4437 controles	Comparação entre gestantes com e sem COVID-19 morbidade, prematuridade e neonatal	COVID-19 associada a maior risco de pré-eclâmpsia, parto prematuro, cesárea, UTI materna e neonatal
Allotey <i>et al.</i> (BMJ 2020)	Vários (global)	Revisão sistemática + metanálise de coortes	Dez 2019 – Out 2020	192 estudos (~67.000 gestantes)	Desfechos maternos e perinatais (COVID-	Gestantes com COVID-19 apresentaram maior risco de admissão em

			(dados iniciais)		19 na gravidez)	UTI (OR ~2,1) e ventilação invasiva comparado a mulheres não grávidas. A infecção na gravidez associou-se a ~3 vezes mais chance de morte materna, ~1,5 vez mais chance de parto prematuro e ~5 vezes mais chance de admissão neonatal em UTI, em comparação a gestantes sem COVID-19. Sintomas como febre foram menos frequentes em gestantes do que em não gestantes infectadas).
Chmielewska <i>et al.</i> (Lancet GH 2021)	17 países (global)	Revisão sistemática + metanálise (antes vs durante pandemia)	Jan 2020 – Jan 2021	40 estudos (>6 milhões de gestações)	Desfechos maternos e perinatais (período pandêmico vs pré-pandemia)	Durante a pandemia observou-se aumento significativo na taxa de natimorto (OR 1,28) e na mortalidade materna (OR 1,37) em comparação ao período pré-pandêmico. Não houve mudança significativa na prematuridade globalmente (queda observada em países de alta renda). Houve piora na saúde materna mental (maiores escores de depressão) e aumento de gestações ectópicas rompidas. Não se detectou alteração significativa em hipertensão gestacional, diabetes gestacional, mortalidade neonatal ou admissões em UTI neonatal.
Marchand <i>et al.</i> (AJOG Glob Rep 2022)	Vários (global)	Revisão sistemática + metanálise	Até 3 de jun. 2021	111 estudos (42.754 gestantes com COVID-19)	Desfechos maternos e neonatais em gestantes infectadas	Entre gestantes com COVID-19, a taxa de cesárea foi ~53%, parto prematuro ~17% e natimorto ~1,9%. A infecção materna elevou as chances de parto prematuro (OR ~1,5), pré-eclâmpsia (OR

						~1,6), natimortalidade (OR ~2,4), óbito neonatal (OR ~3,3) e óbito materno (OR ~3,1) em comparação a gestações sem COVID-19. Apesar do aumento relativo, a mortalidade materna absoluta entre gestantes infectadas permaneceu baixa (~0,01%).
Smith <i>et al.</i> (BMJ Global Health, 2023)	12 países (incluindo Brasil, México, Índia, Itália, Nigéria e EUA)	Metanálise com dados individuais de coortes	Mar 2020 - Out 2021	13.136 gestantes (1.942 com COVID-19 confirmada)	Desfechos maternos e neonatais adversos associados à infecção por SARS-CoV-2	A infecção por SARS-CoV-2 durante a gestação foi associada a maior risco de pré-eclâmpsia, parto prematuro, internação em UTI materna, recém-nascidos PIG e óbito neonatal.
Gurol-Urganci <i>et al.</i> (American Journal of Obstetrics & Gynecology, 2021)	Inglaterra	Coorte retrospectiva baseada em população nacional (HES database)	29 de maio de 2020 - 31 de janeiro de 2021	342.080 gestantes com partos únicos registrados, das quais 3.527 com infecção confirmada por SARS-CoV-2 no momento do parto	Desfechos maternos e neonatais adversos associados à infecção por SARS-CoV-2 no momento do parto	Maior risco de natimorto (OR 2,21), parto prematuro (OR 2,17), pré-eclâmpsia (OR 1,55) e cesariana de emergência (OR 1,63) nas mulheres com COVID-19. Também foi observada maior necessidade de cuidados neonatais especializados (OR 1,24), e maior tempo de internação neonatal (OR 1,61). Não houve aumento de desfechos neonatais adversos em nascidos a termo.

Fonte: Souza *et al* (52), Favre *et al* (53), Villar *et al* (54) Allotey *et al.* (55) Chmielewska *et al.* (56) Marchand *et al.* (57) Smith *et al.* (58) Gurol-Urganci *et al.* (59)

SARS-CoV-2 - Síndrome Respiratória Aguda Grave por Coronavírus 2; COVID-19 - Doença do coronavírus 2019; SRAG - Síndrome Respiratória Aguda Grave; RR - Risco relativo; UTI - Unidade de Terapia Intensiva; Fev - Fevereiro; Mar - Março; Set - Setembro; Dez - Dezembro; aRR = Risco relativo ajustado; Out - Outubro; OR - Odds Ratio; EUA - Estados Unidos da América; HES - Hospital Episode Statistics;

1.2.4 Perfil imunológico da infecção por SARS-CoV-2 na gestação

Entre a população com alto risco de desenvolver doença grave, as mulheres grávidas têm sido, portanto, consideradas como um grupo com preocupações adicionais. Dentre possíveis causas associadas à maior gravidade da COVID-19 na gestação está o estado imunológico único observado durante a gravidez (60).

A modulação do sistema imunológico durante a gestação pode levar a respostas divergentes dependendo não só dos agentes infecciosos, mas também das fases da gestação, como resultado da combinação de sinais e respostas originadas do sistema imune materno e da interface feto-placentária (60–62).

Vários mediadores imunológicos foram identificados como desempenhando um papel central na indução de uma forte resposta pró-inflamatória, bem como participando da modulação das respostas imunes durante a infecção por SARS-CoV-2 (63,64). Foi demonstrado que a infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez leva a uma resposta imune desequilibrada, dependendo do trimestre da infecção da gravidez e que essas alterações podem contribuir para complicações tardias na fase pós-sintomática da doença (65).

1.2.5 Alterações neurológicas na gestação acometida por COVID-19

Estudos anteriores forneceram evidências de que o COVID-19 está associado a disfunção neurológica aguda e de longo prazo (66). No entanto, os mecanismos fisiopatológicos que resultam no envolvimento do sistema nervoso central não são totalmente compreendidos.

Vários sinais e sintomas neurológicos foram descritos em pacientes com COVID-19, mas não se sabe se são devidos à invasão direta do sistema nervoso pelo SARS-CoV-2 ou são secundários a processos inflamatórios e imunológicos (67).

Uma avaliação detalhada do líquido cefalorraquidiano pode auxiliar na abordagem dessas questões, permitindo identificar se há ação viral direta ou a presença de biomarcadores como alvos potencialmente acionáveis a fim de prevenir ou intervir com as consequências neurológicas do SARS-CoV-2 (68).

Entretanto, poucos são os estudos que investiguem a resposta imune mediada por vírus durante a gravidez a fim de fornecer subsídios para explorar potenciais mecanismos de proteção em gestantes.

2 PROTOCOLO ESTUDO PROUDEST

Com a caracterização da pandemia COVID-19, iniciou-se um amplo estudo colaborativo multi-institucional (HUB-UnB - Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares – EBSEH; Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ-Minas e Secretaria de Saúde do Distrito Federal - SES-DF), nominado **PROUDEST**, *PRegnancy OUtcome and child Development – Effects of SARS-CoV-2 infection Trial*.

O estudo foi desenhado de forma a ter dois braços paralelos: o PREGNANT e o BORN, sendo o PREGNANT responsável pelo acompanhamento das grávidas acometidas por COVID-19 na gestação e o BORN pelo acompanhamento dos(as) filhos(as) das gestantes incluídas no PREGNANT, conforme publicado em protocolo (69).

Para a execução da subdivisão PREGNANT, coordenada pela autora desta tese, contou-se com equipe multiprofissional composta por médicos residentes e especialistas em ginecologia e obstetrícia, alunos do curso de Medicina, psicóloga e enfermeira (equipe assistencial) e biólogos e farmacêuticos bioquímicos (análise de amostras biológicas).

A subdivisão BORN, coordenada por médico pediatra, contou com equipe multiprofissional (médicos pediatras, alunos do curso de Medicina, enfermeiras, terapeuta ocupacional, psicóloga) para atendimento dos recém-nascidos (RN) e das crianças filhos das gestantes atendidas pela equipe PREGNANT por um período de cinco anos, e ao presente momento já tem parte de seus resultados publicados. (Apêndices)

Figura 3 - Protocolo do Estudo PROUDEST, incluindo o subgrupo PREGNANT que acompanhou clinicamente gestantes com COVID-19 e subgrupo PROUDEST que acompanhou clinicamente recém-nascidos e crianças nascidas a partir do grupo PREGNANT



Fonte autoral. Adaptado de Fernandes *et al.* (69).

O estudo foi registrado na Plataforma Brasileira de Ensaios Clínicos - REBEC; <https://ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-65qxs2> (70), em setembro de 2020. Todos os dados relevantes estão disponíveis no repositório Harvard Dataverse 2024, "Repli": <https://doi.org/10.7910/DVN/GOHQY> (71)

3 JUSTIFICATIVA

A pandemia da COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, resultou em profundas implicações para a saúde pública global. Embora inicialmente considerada uma infecção predominantemente respiratória, rapidamente se reconheceu seu impacto multissistêmico, incluindo efeitos imunológicos, cardiovasculares, neurológicos e obstétricos.

A rápida produção e disseminação de informações sobre a COVID-19 e seus efeitos na gestação foram essenciais para orientar o manejo obstétrico durante a pandemia. No entanto, uma vez que a maioria das publicações iniciais consistia em relatos e séries de casos, os resultados mereciam ser interpretados com cautela, considerando as limitações metodológicas e o risco de vieses desses tipos de estudo.

Ang *et al.* analisaram criticamente as dificuldades enfrentadas nas revisões sistemáticas publicadas precocemente sobre COVID-19 e gravidez, identificando fatores que comprometem a acurácia das conclusões, tais como: viés intrínseco ao desenho dos estudos, relatos duplicados, critérios de inclusão inconsistentes, pequeno tamanho amostral, curto período de seguimento e exclusão de estudos não publicados em inglês. Adicionalmente, a maioria dos estudos focou em gestantes no terceiro trimestre, o que poderia superestimar riscos como o parto prematuro e subnotificar desfechos de longo prazo (72).

Nesse contexto, destacava-se a importância da realização de estudos de coorte prospectivos, que acompanhassem gestantes e seus conceitos desde o início da infecção por SARS-CoV-2 até o pós-parto, permitindo uma avaliação mais robusta dos desfechos maternos e neonatais e superando as limitações observadas nas publicações iniciais (72).

Diversos estudos ao redor do mundo propuseram-se a avaliar os desfechos clínicos da infecção por SARS-CoV-2 em gestantes, como citado na introdução deste documento, com achados majoritariamente convergentes, entretanto poucos exploraram a análise microbiológica e imunológica materna de forma detalhada, especialmente em compartimentos distintos como o soro e o líquido cefalorraquidiano (LCR).

Diante desse cenário, realizamos o estudo de coorte prospectivo PROUDEST incluindo gestantes infectadas por SARS-CoV-2 durante qualquer trimestre de gravidez que envolveu

coleta efetiva de dados clínicos, epidemiológicos e amostras biológicas (sangue e líquido cefalorraquidiano), desde o início da pandemia COVID-19 – junho de 2020 a dezembro de 2021 a fim de realizar uma abordagem integrada entre dados clínicos e biomarcadores imunológicos e melhor compreender os impactos da COVID-19 na gestação.

4 OBJETIVOS

Objetivo primário:

- Avaliar os desfechos clínicos maternos e perinatais de gestantes infectadas por SARS-CoV-2 durante a gravidez, acompanhadas desde o diagnóstico até o puerpério imediato.

Objetivos secundários:

- Investigar a presença do vírus SARS-CoV-2 no líquido cefalorraquidiano de gestantes na fase aguda de COVID-19.
- Caracterizar o perfil de mediadores imunes solúveis em soro e líquido cefalorraquidiano (LCR) de parturientes infectadas por SARS-CoV-2.
- Comparar os níveis de mediadores imunes solúveis no soro e LCR de parturientes em fases aguda (<14 dias) e convalescente (≥14 dias) da infecção por SARS-CoV-2 e de parturientes comprovadamente não infectadas pelo vírus (HC).

5 PACIENTES E MÉTODOS

5.1 Desenho do estudo

Estudo de coorte prospectivo conduzido entre junho de 2020 e dezembro de 2021 em gestantes acometidas por SARS-CoV-2.

5.2 Cenário do estudo

O estudo foi realizado em dois hospitais públicos– o Hospital Universitário de Brasília (HUB-UnB) e o Hospital Regional da Asa Norte (HRAN), ambos considerados centros públicos de referência para COVID-19 no Distrito Federal, Brasil. As amostras biológicas

coletadas foram analisadas no Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Minas), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil e no Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN) ligado à Secretaria de Saúde do Distrito Federal, Brasil (SES-DF).

5.3 População estudada

Foram incluídas gestantes diagnosticadas com COVID-19 em qualquer trimestre gestacional. No HUB-UnB, foram realizados os atendimentos ambulatoriais das gestantes e recém-nascidos, assim como os partos das gestantes que se encontravam com mais de 14 dias desde o diagnóstico da doença COVID-19. Já as gestantes com menos de 14 dias do diagnóstico tiveram seus partos realizados no HRAN, hospital definido como referência para o manejo de casos agudos de COVID-19, conforme fluxos assistenciais estabelecidos pela SES-DF.

Especificadamente para a análise comparativa do perfil imunológico no soro e LCR, parturientes que não apresentaram sintomas ou sinais de COVID-19 durante a gestação e que apresentassem sorologia negativa IgG-IgM para COVID-19 em consulta realizada de 15 a 30 dias pós-parto, foram alocadas como controles.

5.4 Recrutamento

No cenário de confinamento (*lockdown*), decretado em Brasília, Distrito Federal, Brasil no dia 20/03/2020, o recrutamento se deu por amostragem não probabilística, por conveniência, abrangendo o período de maio de 2020 a maio de 2021.

As estratégias de recrutamento incluíram:

- Publicações amplamente divulgadas na imprensa e em outras formas de mídia digital, incluindo sites institucionais, redes sociais e redes profissionais, período de maio de 2020 a maio de 2021. (Anexo A).
- Divulgação institucional: o convite para participação no estudo foi publicado em sites oficiais e boletins internos de instituições acadêmicas e de saúde participantes, localizadas em Brasília.
- Redes sociais: utilizamos plataformas como Instagram e Facebook para divulgar o convite ao estudo, com postagens contendo uma breve descrição dos objetivos da pesquisa, critérios de elegibilidade e um número de telefone para agendamento da primeira visita clínica.

- Grupos profissionais e acadêmicos: o convite também foi compartilhado em grupos fechados de mensagens e comunidades virtuais (grupos de WhatsApp), compostos por estudantes, médicos residentes e demais profissionais da saúde, especialmente aqueles vinculados a hospitais universitários e serviços públicos de saúde.
- Técnica de amostragem em cadeia (*snowball*): incentivamos ainda que participantes e contatos compartilhassem o convite com seus pares, para ampliar o alcance da amostra.

5.5 Tamanho amostral

Ao se iniciar esse estudo, dois meses após o decreto da pandemia de COVID-19, não havia descrição publicada do desfecho clínico de gestantes com a doença.

Por ser uma infecção por vírus completamente desconhecida no cenário mundial, não se conheciam os efeitos da COVID-19 entre as gestantes no início da nossa pesquisa e, portanto, não havia estudos suficientes sobre a prevalência da infecção por SARS-CoV-2 na gestação, a variabilidade dos desfechos ou as estimativas de efeito, tornando inviável calcular o tamanho ideal da amostra. A amostra foi, portanto, inicialmente formada por conveniência, partindo da capacidade máxima de atendimento no ambulatório de pré-natal destinado a este fim e na realização do parto no Hospital Universitário de Brasília.

Após a publicação de um estudo indicando uma prevalência de 15,4% de parturientes expostas à infecção por SARS-CoV-2 no momento da admissão hospitalar em Nova York (73), e considerando o número médio anual de nascidos vivos no Distrito Federal — 44.195, segundo dados oficiais do Ministério da Saúde do Brasil (74), foi realizado um cálculo de tamanho amostral *a posteriori*, com base nos dados observados após a conclusão do estudo, com o intuito de avaliar o poder estatístico da amostra utilizada. Para estimar o tamanho amostral necessário neste estudo de coorte prospectivo, adotou-se um nível de confiança de 95% ($Z = 1,96$) e uma margem de erro de 5% ($e = 0,05$), sendo aplicado o seguinte cálculo:

Cálculo para uma população infinita:

$$n = (Z^2 * p * (1 - p)) / e^2$$

$$n = (1,96^2 * 0,154 * (1 - 0,154)) / (0,05^2) \approx (3,8416 * 0,154 * 0,846) / 0,0025 \approx 200$$

Aplicando a correção para população finita:

$$n_{\text{ajustado}} = n / (1 + (n - 1) / N) = 200 / (1 + 199 / 44.195) \approx 199$$

Considerando a possibilidade de perdas durante o seguimento, estimadas em até 20%, o tamanho amostral final foi ajustado:

$$n_{\text{final}} = 199 / 0,80 \approx 249$$

Assim, definiu-se que seriam necessárias aproximadamente 250 gestantes para compor a amostra do estudo, garantindo-se o poder estatístico adequado mesmo diante de perdas amostrais.

5.6 Critérios de inclusão

- Idade acima de 18 anos;
- Capacidade de compreensão e preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE); e
- Confirmação diagnóstica de COVID-19 durante a gestação.

5.7 Critérios de exclusão

- Vacinação contra COVID-19 antes ou durante a gestação;
- Confirmação de outra infecção congênita durante a gestação estudada, como toxoplasmose, sífilis, rubéola, herpes, Chagas, citomegalovírus, vírus Zika ou vírus da imunodeficiência humana - HIV;
- Tabagismo e/ou com uso de álcool/drogas ilícitas durante a gestação e
- Não comparecimento às consultas de pré-natal agendadas antes do parto (perda de seguimento).

5.8 Diagnóstico de COVID-19

O diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 seguiu os critérios recomendados pelo Ministério da Saúde do Brasil no início da pandemia de COVID-19 (75), que incluíam:

História de sintomas sugestivos de COVID-19 durante a gravidez, associados a:

- 1) Resultado positivo de reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) para amostras de swab nasofaríngeo ou
- 2) Reatividade sérica positiva de IgM e/ou IgG para SARS-CoV-2 (teste sorológico ou rápido, Biomanguinhos, Fiocruz, Brasil) ou
- 3) Tomografia computadorizada (TC) de tórax indicando envolvimento pulmonar sugestivo de COVID-19.

5.9 Entrevista e preenchimento de questionário

Informações maternas foram obtidas no primeiro encontro por meio de entrevista e preenchimento de questionário específico (Ficha de Coleta de Dados, Anexo B), incluindo:

- Dados epidemiológicos,
- Sintomas de COVID-19,
- Gravidade da COVID-19,
- Uso de álcool, drogas ilícitas ou cigarro,
- Histórico de doenças nas gestações anteriores,
- Doenças presentes na gravidez atual, e
- Infecções como toxoplasmose, sífilis, rubéola, herpes, Chagas, citomegalovírus, vírus Zika ou vírus da imunodeficiência humana – HIV.

Uma vez inserida no estudo, realizava-se, ainda neste primeiro encontro, o encaminhamento da gestante para atendimento imediato em ambulatório de pré-natal de alto risco no Hospital Universitário de Brasília, destinado exclusivamente a este público.

5.10 Coleta de dados clínico-obstétricos

Os dados clínico-obstétricos foram registrados durante o acompanhamento pré-natal, que ocorreu mensalmente até 33 semanas de gestação, quinzenalmente, entre 34 e 36 semanas de gestação, e semanalmente, entre 37 semanas de gestação e o parto. Os dados referentes ao parto foram adquiridos durante a internação e coletados dos prontuários hospitalares. Os dados referentes ao atendimento pós-parto foram coletados em consulta médica ambulatorial realizada entre 10 e 28 dias após o parto.

Para preservar o anonimato das participantes, os identificadores nominais foram substituídos por identificadores diretos por meio de códigos alfanuméricos padronizados que representam o número sequencial de pacientes incluídas. Os autores tiveram acesso a todas as informações durante ou após a coleta de dados por meio de tabelas no *Google Drive*.

Como em qualquer estudo de coorte, as perdas de seguimento eram esperadas, mas para minimizar esse viés, as participantes receberam ligações telefônicas ou mensagens via WhatsApp regulares a fim de incentivar a participação contínua no estudo, oferecendo todos os cuidados necessários para o acompanhamento pré-parto, parto e pós-parto, bem como o acompanhamento de seus recém-nascidos e crianças (na subdivisão BORN do estudo).

5.11 Dados avaliados na pesquisa clínica

A avaliação fetal foi realizada pelo menos três vezes durante a gestação estudada por meio de ultrassonografias seriadas: ≤ 14 semanas de gravidez, entre 20 e 24 semanas de gravidez e entre 34 e 40 semanas de gravidez.

A etnia, classificada como parda, branca, preta e outras, foi autorreferida.

O trimestre gestacional foi classificado em: 1º = primeiro trimestre, compreendendo 4 a 13 semanas e 6 dias de gestação; 2º = segundo trimestre, compreendendo 14 semanas a 27 semanas e 6 dias de gestação; e 3º = terceiro trimestre, compreendendo 28 a 41 semanas e 6 dias de gestação.

A fase aguda da COVID-19 foi definida como os primeiros 14 dias de sintomas da infecção por SARS-CoV-2, e a fase convalescente foi definida como o período após os 14 dias iniciais dos sintomas.

A gravidade da COVID-19 foi classificada como não grave, grave ou crítica, conforme proposto pela OMS (76)

A COVID-19 crítica foi definida como Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo - SDRA, sepse, choque séptico ou outras condições que normalmente requerem o fornecimento de terapias de suporte à vida, como ventilação mecânica (invasiva ou não invasiva) ou terapia vasopressora. COVID-19 grave foi definida como uma saturação de oxigênio no ar ambiente $< 90\%$, uma frequência respiratória > 30 respirações/min ou sinais de dificuldade respiratória grave (uso de músculos acessórios, incapacidade de completar frases completas) que não eram fatais. A COVID-19 não grave consistiu na ausência dos critérios acima mencionados para COVID-19 grave ou crítica (76).

O envolvimento pulmonar na TC pulmonar foi definido como leve ($< 25\%$ de envolvimento pulmonar), moderado ($25\text{--}50\%$ de envolvimento pulmonar) ou grave ($> 50\%$ de envolvimento pulmonar).

O diabetes *mellitus* gestacional - DMG foi definido como intolerância à glicose, identificada pela primeira vez durante a gravidez, com glicemia de jejum ≥ 92 mg/dl em qualquer trimestre da gestação, ou glicemia ≥ 180 mg/dl ou ≥ 153 mg/dl 1 e 2 horas, respectivamente, após o teste oral de tolerância à glicose - TOTG de 75g, entre a 24ª e a 28ª semana de gestação, conforme proposto pelo Painel de Consenso da Associação Internacional de Grupos de Estudo de Diabetes e Gravidez - IADPSG (77).

A hipertensão arterial sistêmica - HAS foi definida como uma pressão arterial maior que 140×90 mmHg durante a gravidez, medida em duas ocasiões distintas. A obesidade foi

definida como índice de massa corporal ≥ 30 kg/m², e a restrição de crescimento fetal intrauterino foi definida como peso fetal estimado ou circunferência abdominal na ultrassonografia abaixo do percentil 10 para a idade gestacional, de acordo com o Colégio Americano de Ginecologia e Obstetrícia - ACOG (78).

O parto prematuro foi definido como parto realizado em gravidez com < 37 semanas de idade gestacional, o parto a termo foi definido como ocorrido entre 37 e 40 semanas e 6 dias de idade gestacional e o parto pós-termo foi definido como ocorrido com ≥ 41 semanas de idade gestacional.

Os RN foram classificados como adequados para a idade gestacional - AIG, pequenos para a idade gestacional - PIG ou grandes para a idade gestacional - GIG, de acordo com a classificação proposta pelo *International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century* ou *INTERGROWTH-21st* (79).

5.12 Coleta de amostras biológicas

Amostras de sangue da gestante foram coletadas na primeira consulta ambulatorial de pré-natal e durante o parto por punção venosa.

As amostras de sangue coletadas ambulatoriamente, utilizando-se tubos a vácuo sem anticoagulante (tampa verde), foram submetidas, em um período de até 6 horas, à centrifugação a 1.400 x g, 10 min, no Laboratório de Análises Clínicas do HUB-UnB, e aliquotadas, sendo o soro armazenado a - 80° C em freezer localizado no Laboratório de Pesquisa Clínica do HUB-UnB até o processamento da amostra.

As amostras de sangue coletadas nos partos realizados no HUB-UnB e HRAN foram armazenadas em geladeira a temperatura de 3° C a 5° C e submetidas, dentro de 24 horas, à centrifugação a 1.400 x g, 10 min, no Laboratório de Análises Clínicas do HUB-UnB, e aliquotadas, sendo o soro armazenado a - 80° C em freezer localizado no Laboratório de Pesquisa Clínica do HUB-UnB até o processamento da amostra.

Amostras de líquido cefalorraquidiano (cerca de 0,5 mL cada) foram coletadas por punção lombar durante a raquianestesia para parto cesariana diretamente em frasco estéril, armazenadas em geladeira a temperatura de 3° C a 5° C, e, dentro de 24 horas, armazenadas a -80° C em freezer localizado no Laboratório de Pesquisa Clínica do HUB-UnB até o processamento da amostra.

5.13 Processamento das amostras biológicas para identificação do vírus SARS-COV-2

Parte das amostras de líquido cefalorraquidiano coletadas por punção lombar durante a raquianestesia para parto cesariana foram encaminhadas para realização de análise de RT-PCR para SARS-CoV-2 no Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN) ligado à Secretaria de Saúde do Distrito Federal, Brasil (SES-DF) utilizando-se os kits do Instituto de Pesquisa Molecular do Paraná (Paraná, Brasil) ou VIASURE SARS-CoV-2 (Cer Test Biotech, Zaragoza, Espanha), cujo limite de detecção é de 4 cópias virais por reação.

5.14 Quantificação de mediadores imunes solúveis

Os níveis de mediadores imunes solúveis foram quantificados em amostras de soro e LCR por ensaio multiplex de microesferas de alto rendimento (Bio-Plex Pro™ *Human Cytokine 27-plex Assay*, Bio-Rad *Laboratories*, Hercules, Califórnia - EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de quimiocinas (CXCL8; CCL11; CCL3; CCL4; CCL2; CCL5; CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β ; IL-6; TNF- α ; IL-12; IFN- γ ; IL-15; IL-17) e citocinas reguladoras (IL-1Ra; IL-4; IL-5; IL-9; IL-10; IL-13) juntamente com fatores de crescimento (FGF-básico; PDGF; VEGF; G-CSF; GM-CSF; IL-2; IL-7) foram dosados em lotes paralelos realizados por um técnico treinado no serviço de citometria de fluxo da Fiocruz-Minas. As concentrações finais de mediadores imunes solúveis no soro e no LCR foram expressas em pg/mL, de acordo com uma regressão de ajuste de curva logística de 5 parâmetros de curvas padrão.

5.15 Análise estatística

Para a **análise dos desfechos clínicos do estudo PROUDEST**, as variáveis qualitativas são apresentadas como frequências absolutas (n) e relativas (%), e as variáveis quantitativas são apresentadas como médias descritivas e desvios-padrão.

As análises foram realizadas em duas etapas: inicialmente, foram realizadas análises bivariadas para verificar o efeito isolado de cada preditor sobre os desfechos e, posteriormente, análises multivariadas ajustadas pelas variáveis de controle pré-gestacional para verificar o efeito de cada preditor sobre os desfechos. $P < 0,05$ foi considerado significativo. As análises foram realizadas por meio do software SAS 9.4.

As associações entre as variáveis qualitativas foram verificadas por meio do teste qui-

quadrado de Pearson, do teste de tendência Cochran-Armitage ou do teste exato de Fisher. Nos casos em que as associações foram significativas, uma análise de resíduos padronizada foi usada para determinar o significado das associações entre as variáveis, e os resultados foram expressos nas tabelas como [resíduos padronizados] Resíduos padronizados maiores que 1,96, em módulo, indicam significância estatística (80). O teste t de Student ou ANOVA foi usado para comparar os valores médios de idade.

Modelos de regressão de Poisson multivariados com variância robusta foram empregados para determinar se a gravidade da COVID-19 é um preditor significativo para a ocorrência de sofrimento fetal e se o trabalho de parto agudo devido à COVID-19 é um preditor significativo para escores de Apgar de primeiro minuto ≤ 7 . Em ambas as análises, os efeitos das variáveis pré-gestacionais (DMG, hipertensão, pré-eclâmpsia, asma, obesidade, escolaridade e idade materna) foram tratados como variáveis de controle.

Um modelo de regressão generalizada foi utilizado para determinar se a gravidade da COVID-19 é um preditor significativo da ocorrência de parto prematuro ou pós-termo em relação à ocorrência de parto a termo, ajustando para os efeitos das variáveis de controle pré-gestacional (DMG, hipertensão, pré-eclâmpsia, asma, obesidade, escolaridade e idade materna).

Para a **análise estatística do perfil imunológico das gestantes acometidas por COVID-19 do estudo PROUDEST**, a estatística descritiva foi realizada por meio do software *Prism 8.0.2* (GraphPad Software, San Diego, EUA). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Considerando a distribuição não paramétrica de todos os conjuntos de dados, a análise comparativa entre os subgrupos HC e COVID-19 (Aguda, Precoce, Intermediária e Tardia) seguida de comparações múltiplas foi realizada por Kruskal-Wallis seguida do pós-teste de Dunn. Em todos os casos, a significância estatística foi considerada em $p < 0,05$.

A análise adicional dos mediadores imunes solúveis séricos e do LCR, denominados assinaturas, foi realizada após a conversão dos valores contínuos obtidos em pg/mL em dados categóricos expressos como proporção (%) de parturientes com níveis de mediadores imunes solúveis acima dos valores de corte definidos como a concentração mediana global de cada mediador solúvel detectado no soro (CXCL8 = 2,7; CCL11 = 4,7; CCL3 = 0,5; CCL4 = 3,4; CCL2 = 7,2; CCL5 = 205,1; CXCL10 = 45,5; IL-1 β = 0,2; IL-6 = 0,6; TNF- α = 3,8; IL-12 = 0,3; IFN- γ = 0,8; IL-15 = 28,7; IL-17 = 1,4; IL-1Ra = 64,7; IL-4 = 0,2; IL-5 = 7,4; IL-9 = 2,6; IL-10 = 2,3; IL-13 = 0,6; FGF-básico = 1,7; PDGF = 4,2; VEGF = 7,3; G-CSF = 2,6; GM-CSF = 0,4; IL-2 = 0,9 e IL-7 = 1,8 pg/mL) e amostras de LCR (CXCL8 = 10,0; CCL11 = 0,2; CCL3 = 0,6; CCL4 = 2,2; CCL2 = 94,4; CCL5 = 2,2; CXCL10 = 48,5; IL-1 β = 0,1; IL-6 = 0,5; TNF-

$\alpha = 3,8$; IL-12 = 0,3; IFN- γ = 3,9; IL-15 = 34,3; IL-17 = 1,1; IL-1Ra = 14,4; IL-4 = 0,3; IL-5 = 4,7; IL-9 = 1,3; IL-10 = 1,3; IL-13 = 0,7; FGF-básico = 4,7; PDGF = 1,8; VEGF = 8,0; G-CSF = 2,2; GM-CSF = 0,5; IL-2 = 1,6 e IL-7 = 1,7 pg/mL). As assinaturas de mediadores imunes solúveis do soro e do LCR foram analisadas considerando o percentil 50 como uma zona cinzenta para identificar o conjunto de mediadores imunológicos com níveis aumentados em cada grupo de estudo e foram posteriormente montadas como perfis de assinatura ascendente.

Circuitos de mediadores imunes solúveis séricos e liquóricos foram construídos com base na análise de correlação (testes de Spearman) entre pares de mediadores solúveis. Apenas correlações significativas ($p < 0,05$) foram empregadas para construir os quatro circuitos de agrupamento (quimiocinas = C; citocinas pró-inflamatórias = P; citocinas regulatórias = R e fatores de crescimento = GF) usando o software de código aberto *Cytoscape* (disponível em <https://cytoscape.org>). Os escores de correlação "r" foram classificados como moderados ou fortes ($|0,36$ a $0,67|$ e $>|0,68|$, respectivamente). A análise comparativa entre os grupos foi realizada considerando a frequência de correlação dentro de cada cluster.

Uma análise adicional de mediadores imunes solúveis foi realizada para comparar e resumir as principais alterações observadas nos compartimentos sérico e liquórico. Para tanto, a normalização dos escores Z (novo valor = (valor original - $\bar{x}$) / DP) foi aplicada ao conjunto de dados séricos e liquóricos e mapas de cores foram construídos para calcular o número de mediadores solúveis com escore $Z \geq 5$ em cada compartimento e subsidiar a análise comparativa entre os grupos.

Mapas de correlação cruzada foram construídos com base na análise de correlação (testes de Spearman) entre pares de mediadores imunes medidos em amostras de soro e LCR. Apenas correlações significativas ($p < 0,05$) foram empregadas para montar correlogramas de mediadores imunes solúveis apresentando correlação negativa ou positiva usando o pacote "corrplot" do software R (*Project for Statistical Computing Version 3.0.1*). O número de correlações foi usado para projetar nuvens excêntricas usando a plataforma de software de código aberto *Cytoscape* (disponível em <https://cytoscape.org>).

5.16 Ética em pesquisa

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, em maio de 2020 (Anexo C - CAAE 32359620.0.0000.5558) com aprovação adicional pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, em outubro de 2021 (Anexo D). Todos os participantes forneceram um consentimento informado por escrito antes da

inclusão no estudo (Anexo E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE).

Foi utilizada a ferramenta de inteligência artificial *ChatGPT (OpenAI)* como apoio para revisão linguística, organização textual e aprimoramento da redação científica durante a elaboração desta tese, sempre com supervisão da autora e em conformidade com os princípios de integridade acadêmica.

5.17 Financiamento do estudo

Os gastos relacionados às atividades assistenciais foram custeados pelo HUB-UnB e HRAN. Os insumos específicos para a coleta dos materiais biológicos foram adquiridos pelo grupo de estudo.

O laboratório Sabin forneceu gratuitamente a execução de sorologias para COVID-19 para as pacientes controles.

A revisão da língua inglesa e taxa de publicação de artigos publicados teve apoio parcial do Fundo Edital DPG/UnB Nº 04/2021 publicado pelo Decanato de Pós-Graduação da UnB.

A análise dos níveis de mediadores imunes solúveis por ensaio multiplex de microesferas de alto rendimento foi custeado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico - CNPq, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG e pela 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”).

5.18 Conflito de interesse

O autor, assim como orientadores, declaram não haver qualquer conflito de interesses para a realização do presente estudo.

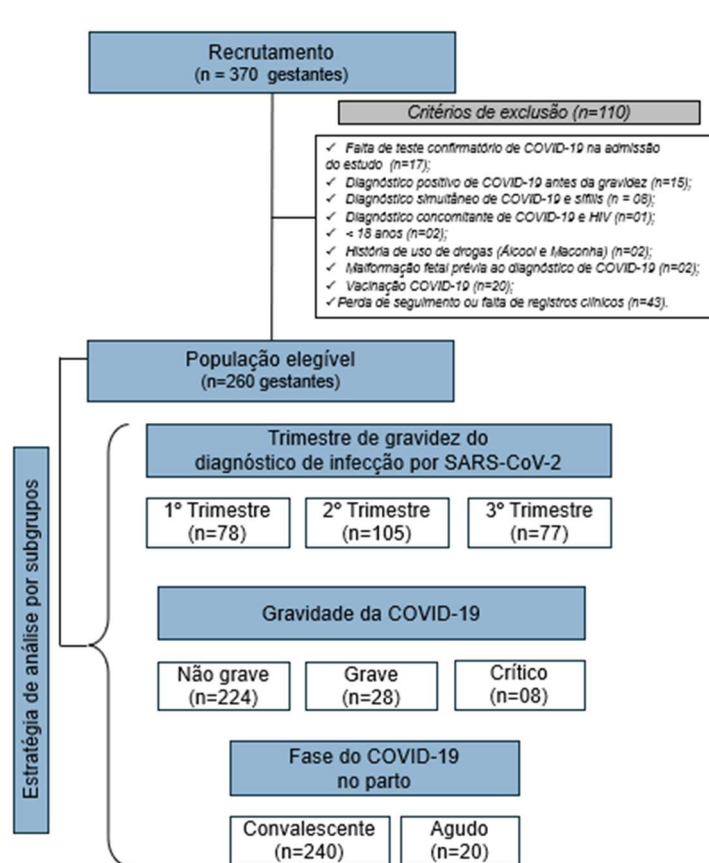
6 RESULTADOS

6.1 RESULTADOS DOS DESFECHOS CLÍNICOS DE GESTANTES ACOMETIDAS POR COVID-19 - ESTUDO PROUDEST

6.1.1 Descrição da população estudada para avaliação dos desfechos clínicos

Após a aplicação dos critérios de exclusão, 260 gestantes infectadas pelo SARS-CoV-2 em distintos trimestres gestacionais foram incluídas no estudo PROUDEST (Figura 4).

Figura 4 – Fluxograma de participantes no estudo PROUDEST, composto por mulheres grávidas acometidas por COVID-19 na gestação



Fonte: elaborado pela autora

A média de idade da população estudada foi de $31,3 \pm 6,0$ anos (variando de 18 a 52 anos). A idade gestacional média no momento do diagnóstico de COVID-19 foi de $20,7 \pm 10,2$ semanas (variando de 4 a 40 semanas).

A maioria das participantes da pesquisa autodeclarou-se de etnia parda (60,8%). Em relação à escolaridade, observou-se que 49,6% concluíram o ensino médio e 38,5%

apresentavam formação em nível superior. Quanto à paridade, verificou-se que a maior parte das gestantes havia tido duas ou mais gestações, incluindo a gestação vigente no momento do estudo. A principal metodologia empregada para confirmação diagnóstica da infecção por COVID-19 foi a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa - RT-PCR, utilizada em 60,4% dos casos (Tabela 2).

A amostra foi estratificada segundo o trimestre gestacional em que ocorreu o diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2, com distribuição da seguinte forma: **30,0% diagnosticadas no primeiro trimestre, 40,4% no segundo trimestre e 29,6% no terceiro trimestre de gestação.** (Tabela 2)

Tabela 2 – Características demográficas e laboratoriais das gestantes acometidas por COVID-19 incluídas no estudo PROUDEST (n=260)

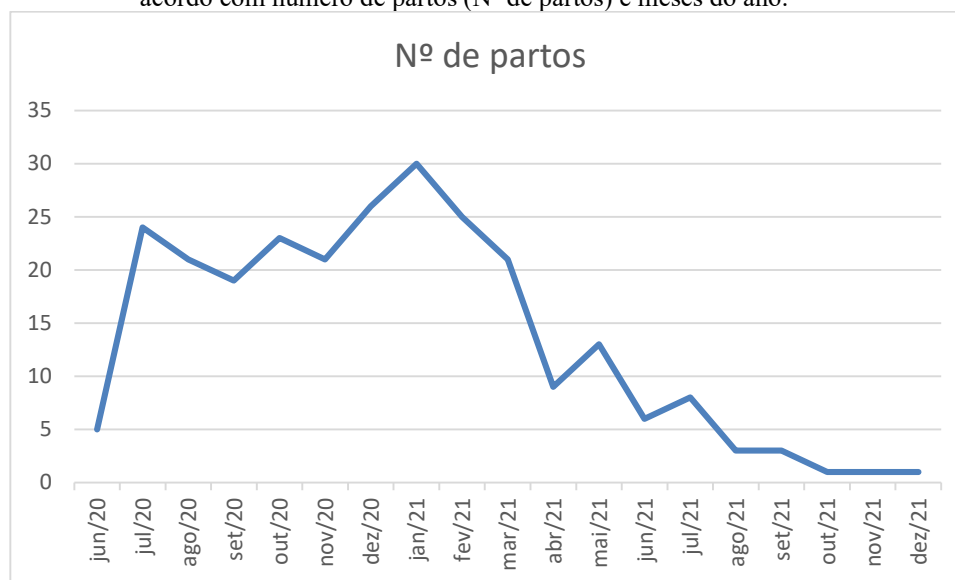
Parâmetro	Frequência n (%)
Idade (anos, média ± DP)	31.3±6.0
Etnia	
Branca	73 (28.0)
Parda	158 (60.8)
Preta	28 (10.8)
Indígena	1 (0.4)
Nível de escolaridade	
Ensino fundamental	31 (11.9)
Ensino médio	129 (49.6)
Ensino superior	100 (38.5)
Paridade	
1 gestação	78 (30.0)
2 gestações	74 (28.5)
≥ 3 gestações	108 (41.5)
Diagnóstico de COVID-19	
Teste rápido de anticorpos no sangue	75 (28.8)
Sorologia	25 (9.6)
RT-PCR	157 (60.4)
TC do tórax + sintomas clínicos	3 (1.2)
Trimestre do diagnóstico de SARS-CoV-2*	
1º	78 (30.0)
2º	105 (40.4)
3º	77 (29.6)

Fonte: elaborado pela autora

RT-PCR = reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa; TC de tórax = tomografia computadorizada de tórax. * 1º = diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no primeiro trimestre gestacional (4 a 13 semanas e 6 dias de gestação); 2º = diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no segundo trimestre gestacional (14 semanas a 27 semanas e 6 dias de gestação); 3º = diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no terceiro trimestre gestacional (28 a 41 semanas e 6 dias de gestação). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP) ou frequência (%).

Os partos das gestantes infectadas por SARS-CoV2 ocorreram prioritariamente de julho de 2020 a março de 2021. (Gráfico 1).

Gráfico 1- Distribuição dos partos realizados no HUB-UnB e HRAN das gestantes acometidas por COVID-19 incluídas no estudo PROUDEST desde o início – junho de 2020 – até o final do estudo – dezembro de 2022, de acordo com número de partos (Nº de partos) e meses do ano.



Fonte: elaborado pela autora

6.1.2 Achados clínicos

As gestantes foram **classificadas de acordo com a gravidade da doença** em: **Não Grave, Grave e Crítica**. Além disso, as gestantes foram classificadas considerando **a fase da COVID-19 no parto (Convalescente e Aguda)** (Tabela 3).

Entre as 260 participantes do estudo, **224 gestantes (86%) desenvolveram COVID-19 na forma não grave, 28 (11%) COVID-19 grave e 8 (3%) COVID-19 crítico**. Baseando-se na fase da COVID-19 no momento do parto, **240 gestantes estavam na fase convalescente (92,3%) e 20 na fase aguda (7,7%)** (Tabela 3).

Um total de 45 gestantes foram submetidas à TC de tórax, das quais 10 (22%) não apresentaram alterações, 23 (51%) apresentaram alterações leves, 8 (18%) apresentaram alterações moderadas e 4 (9%) apresentaram alterações graves.

Quarenta e duas pacientes (16,2%) necessitaram de hospitalização devido à COVID-19 - causas não obstétricas), 15 (5,8%) necessitaram de oxigênio suplementar e 3 (1%) necessitaram de ventilação mecânica.

O parto cesáreo foi o parto mais comumente realizado (n = 158, 60,8%), principalmente

para gestantes diagnosticadas com COVID-19 no 3º trimestre (n = 56, 73%) ou na fase aguda da COVID-19 no momento do parto (n = 20, 100%).

Durante o trabalho de parto e nascimento, 40 pacientes apresentaram complicações (6 das quais tiveram mais de uma complicação). Um total de 8 pacientes apresentaram hipertensão de difícil controle (3,0%), 18 apresentaram hemorragia intra e pós-parto (6,9%), 6 foram diagnosticadas com oligodrâmnio (2,3%) e 2 com (0,8%) polidrâmnio, enquanto 2 pacientes (0,8%) apresentaram distocia de ombro, 2 (0,8%) apresentaram endometrite pós-parto e 2 (0,8%) apresentaram descolamento prematuro da placenta. (Tabela 3).

Tabela 3 – Características clínicas e radiológicas de mulheres infectadas por SARS-CoV-2 durante a gestação incluídas no estudo PROUDEST

Parâmetro	Frequência n (%)
Gravidade da COVID-19*	
Não grave	224 (86.2)
Grave	28 (10.7)
Crítica	8 (3.1)
Fase do COVID-19 no parto**	
Convalescente	240 (92.3)
Aguda	20 (7.7)
Tomografia de tórax	
Sem alterações	10 (22.2)
Alterações leves	23 (51.1)
Alterações moderadas	8 (17.8)
Alterações graves	4 (8.9)
Internação não obstétrica	42 (16.2)
Suplementação de oxigênio	15 (5.8)
Ventilação mecânica	3 (1.2)
Parto	
Vaginal	102 (39.2)
Cesariana	158 (60.8)
Complicações durante o parto	40 (15.4)
Mortalidade materna	2 (0.8)
Doenças gestacionais***	
Gestação estudada	177 (68.0)
Gestações anteriores	78 (30.0)

Fonte: elaborado pela autora

* A gravidade do COVID-19 foi considerada de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (76) ** Fase aguda = até 14 dias do início dos sintomas no parto; Fase convalescente = diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no 1º, 2º e 3º trimestre de gravidez, após 14 dias da infecção. ***As doenças gestacionais incluíram: hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus gestacional, pré-eclâmpsia, doença pulmonar, cardiopatia e restrição do crescimento fetal intrauterino.

A média da idade gestacional no momento do parto foi de 38,6 semanas (mediana = 39 semanas, DP = 1,97, variando de 24,1 a 41,8 semanas). Trinta e uma pacientes (12%) tiveram

partos prematuros, 214 pacientes (82%) tiveram partos a termo e 15 parturientes (6%) tiveram partos pós-termo.

Duas participantes evoluíram para óbito puerperal (0,8%). (Tabela 3). A primeira paciente foi uma mulher de 31 anos que faleceu devido à insuficiência respiratória associada à insuficiência renal aguda no 18º dia pós-parto. A segunda era uma mulher de 24 anos que morreu 12 dias após o parto devido a convulsões tônico-clônicas, comprometimento neurológico difuso e insuficiência respiratória. Uma paciente sofreu aborto espontâneo no 1º trimestre, com 6 semanas e 5 dias de gravidez, sendo o COVID-19 diagnosticado na 5ª semana de gestação.

6.1.3 Doenças encontradas em gestações prévias e na gestação avaliada

Durante o acompanhamento pré-natal, questionou-se às participantes sobre o histórico de doenças, que foram utilizadas como variáveis de controle pré-gestacional, e observou-se que 78 apresentavam doenças prévias à gestação estudada: 24 mulheres (9,2%) tinham obesidade, 16 (6,2%) tinham história de HAS com 3 delas apresentando pré-eclâmpsia sobreposta (1,2%), 15 pacientes tinham história de doença pulmonar (5,8%), incluindo asma, 6 tinham doença cardíaca (2,3%), 2 (0,8%) tinham história de restrição de crescimento fetal intrauterino e 15 (5,8%) foram diagnosticadas com DMG durante uma gravidez anterior. (Tabela 3).

Em relação às condições clínicas apresentadas durante a gestação estudada, 177 pacientes apresentaram-se com doenças assim distribuídas: obesidade - 25 gestantes (9,6%), HAS - 47 gestantes (18%), sendo que 16 (6,2%) desenvolveram pré-eclâmpsia sobreposta, restrição de crescimento fetal intrauterino - 28 gestantes (10,8%) e diabetes gestacional - 78 (30,0%) (Tabela 3).

O DMG foi detectado em 93 das 260 gestantes estudadas (35,8% da população estudada). Quinze pacientes foram diagnosticadas com DMG durante uma gravidez anterior (5,8% de todas as gestantes estudadas), mas 78 pacientes (30,0% de todas as gestantes estudadas) tiveram diabetes diagnosticado exclusivamente durante a gravidez estudada.

6.1.4 Sintomas de COVID-19 na gravidez

A distribuição de sintomas da COVID-19 nas gestantes de acordo com o trimestre gestacional do diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 e a gravidade da COVID-19 é apresentada na Tabela 4.

A análise dos sintomas de acordo com o trimestre da gestação demonstrou que as mulheres infectadas por SARS-CoV-2 no 2º trimestre apresentaram mais sintomas de mialgia ($p < 0,0001$), astenia ($p = 0,0003$), ageusia ($p = 0,0117$), anosmia ($p < 0,0001$), cefaleia ($p < 0,0001$) e dor articular ($p = 0,0015$) do que as infectadas no 1º e 3º trimestres. Gestantes infectadas no 1º e 2º trimestres apresentaram mais sintomas de coriza/congestão nasal ($p = 0,0025$) e náuseas ($p < 0,0001$) do que aqueles infectados no 3º trimestre. As demais variáveis não foram significativamente associadas ao trimestre gestacional e à infecção por SARS-CoV-2 (Tabela 4).

Mais gestantes com COVID-19 crítica apresentaram febre ($p = 0,0046$) do que aquelas com COVID-19 não grave ou grave. A dispneia ($p < 0,0001$) foi mais comum em gestantes com doença grave ou crítica do que naquelas com doença não grave. Ageusia e cefaleia foram significativamente mais comuns em pacientes com doença não grave do que em pacientes com doença grave ou crítica ($p = 0,0303$ e $p = 0,0053$, respectivamente). As demais variáveis não apresentaram associações significativas com a gravidade da COVID-19 (Tabela 4).

Tabela 4 – Sintomas de COVID-19 de acordo com o trimestre de gravidez do diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 e gravidade do COVID-19 das gestantes incluídas no estudo PROUDEST

Sintomas	Total n (%)	Trimestre de gravidez do diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2*				Gravidade da COVID-19** n (%)			
	Todos n=260 (100.0%)	1º n=78 (30.0%)	2º n=105 (40.4%)	3º n=77 (29.6%)	p	Não grave n=224 (86.2%)	Grave n=28 (10.7%)	Crítico n=8 (3.1%)	p
Febre	116 (44.6)	41 (52.6)	50 (47.6)	26 (33.8)	0.0519	95 (42.4)	13 (46.4)	8 (100.0)	0.0046
Tosse	122 (46.9)	30 (38.6)	58 (55.2)	34 (44.2)	0.0674	99 (44.2)	17 (60.7)	6 (75.0)	0.0710
Dispneia	95 (36.5)	22 (28.2)	42 (40.0)	31 (40.3)	0.1884	67 (29.9)	22 (78.6)	6 (75.0)	<0.0001
Dor de garganta	74 (28.5)	21 (26.9)	31 (29.5)	22 (28.6)	0.9281	64 (28.6)	10 (35.7)	0 (0.0)	0.1417
Mialgia	152 (58.5)	51 (65.4)	73 (69.5)	28 (36.4)	<0.0001	131 (58.6)	18 (64.3)	3 (37.5)	0.4159
Astenia	68 (26.1)	16 (20.5)	42 (40.0)	11 (14.3)	0.0003	58 (25.9)	10 (35.7)	1 (12.5)	0.4734
Congestão/ secreção nasal	160 (61.5)	53 (67.9)	72 (68.6)	35 (45.5)	0.0025	143 (64.8)	15 (53.6)	2 (25.0)	0.0504
Diarreia	57 (21.9)	21 (26.9)	25 (23.8)	11 (14.3)	0.1366	45 (20.1)	9 (32.1)	3 (37.5)	0.1937
Ageusia	152 (58.5)	44 (56.4)	72 (68.6)	36 (46.7)	0.0117	138 (61.6)	10 (35.7)	4 (50.0)	0.0303
Anosmia	168 (64.6)	54 (69.2)	79 (75.2)	35 (45.5)	<0.0001	151 (67.4)	14 (50.0)	4 (50.0)	0.1317
Dor de cabeça	158 (60.8)	52 (66.7)	78 (74.3)	28 (36.4)	<0.0001	143 (63.8)	14 (50.0)	1 (12.5)	0.0053
Nausea	17 (6.5)	8 (10.3)	9 (8.6)	0 (0.0)	0.0196	16 (7.1)	1 (3.6)	0 (0.0)	0.6280
Vômito	17 (6.5)	5 (6.4)	7 (6.7)	5 (6.5)	0.9974	9 (4.0)	8 (28.6)	0 (0.0)	0.0009
Tontura	15 (5.8)	3 (3.9)	10 (9.5)	2 (2.6)	0.0975	14 (6.2)	1 (3.6)	0 (0.0)	0.8210
Doenças em pele	9 (3.5)	2 (2.6)	3 (2.9)	4 (5.2)	0.6319	7 (3.1)	1 (3.6)	1 (12.5)	0.2978
Dor articular	11 (4.2)	1 (1.3)	10 (9.5)	0 (0.0)	0.0015	11 (4.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.4606
Outros sintomas	11 (4.2)	11 (14.1)	21 (20.0)	17 (22.1)	0.4138	41 (18.3)	8 (28.6)	0 (0.0)	0.1626

Fonte: elaborado pela autora

*Trimestre de gravidez do diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2: 1º = diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no primeiro trimestre de gestação (4 a 13 semanas e 6 dias de gestação); 2º = diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no segundo trimestre de gestação (14 semanas a 27 semanas e 6 dias de gestação); 3º = diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no terceiro trimestre de gestação (28 a 41 semanas e 6 dias de gestação).

**Gravidade da COVID-19 de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde [75]. A análise comparativa foi realizada pelos testes Qui-quadrado/Fisher. A significância foi considerada em valores de $p > 0,05$.

6.1.5 Desfechos maternos de acordo com o trimestre gestacional da infecção por SARS-CoV-2, gravidade da COVID-19 e fase da COVID-19 no parto

O trimestre gestacional da infecção por SARS-CoV-2, a gravidade da COVID-19 e fase da COVID-19 no parto foram correlacionadas com variáveis sociodemográficas e resultados clínicos e obstétricos (Tabela 5).

Não foram observadas diferenças significativas para parâmetros demográficos/clínicos nos diferentes trimestres em que ocorreu a infecção por SARS-CoV-2. (Tabela 5).

Tabela 5 – Características da infecção por SARS-CoV-2 por trimestre de gravidez, gravidade do COVID-19 e tempo entre a infecção por COVID-19 e o parto das gestantes incluídas no estudo PROUDEST

Característica	Trimestre de gravidez em que ocorreu infecção por SARS-CoV-2				Gravidade da COVID-19				Fase da COVID-19 no parto		
	1º n = 78 (30%)	2º n = 105 (40.4%)	3º n = 77 (29.6%)	p*	Não grave n = 224 (86.2%)	Grave n = 28 (10.7%)	Crítico n = 8 (3.1%)	p*	Conva- lescente n = 240 (92.3%)	Aguda n = 20 (7.7%)	p*
Idade (anos ± DP)	30.7 ± 6.1	32.1 ± 5.8	30.8 ± 6.0	0.22	31.2 ± 5.8	31.8 ± 7.4	31.4 ± 6.1	0.89	31.3 ± 6.0	30.4 ± 6.1	0.51
Nível de escolaridade	0.78				0.92				0.15		
Ensino fundamental	11 (14.1)	10 (9.5)	10 (13.0)		26 (11.6)	4 (14.3)	1 (12.5)		29 (12.1)	2 (10.0)	
Ensino médio	35 (44.9)	54 (51.4)	40 (51.9)		110 (49.1)	14 (50.0)	5 (62.5)		115 (47.9)	14 (70.0)	
Ensino superior	32 (41.0)	41 (39.1)	27 (35.1)		88 (39.3)	10 (35.7)	2 (25.0)		96 (40.0)	4 (20.0)	
Etnia	0.23				0.55				0.75		
Branco	25 (32.1)	32 (30.5)	16 (20.8)		65 (29.0)	7 (25.0)	1 (12.5)		68 (28.3)	5 (25.0)	
Pardo	43 (55.1)	62 (59.0)	53 (68.8)		134 (59.8)	20 (71.4)	5 (62.5)		144 (60)	14 (70.0)	
Preto	10 (12.8)	11 (10.5)	7 (9.1)		24 (10.7)	1 (3.6)	2 (25.0)		27 (11.3)	1 (5.0)	
Indígena	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.3)		1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)		1 (0.4)	0 (0.0)	
Obesidade	9 (11.5)	9 (8.6)	7 (9.1)	0.78	23 (10.3)	2 (7.1)	0 (0.0)	0.63	23 (9.6)	2 (10)	1.00
DMG	29 (37.2)	39 (37.1)	25 (32.5)	0.77	84 (37.5)	9 (32.1)	0 (0.0)	0.09	90 (37.5)	3 (15)	0.04
HAS	16 (20.5)	15 (14.3)	16 (20.8)	0.42	41 (18.3)	6 (21.4)	0 (0.0)	0.37	43 (17.9)	4 (20)	1.00
Pré-eclâmpsia	6 (7.7)	4 (3.8)	6 (7.8)	0.47	13 (5.8)	3 (10.7)	0 (0.0)	0.44	14 (5.8)	2 (10)	0.62
Doenças respiratórias	6 (7.7)	8 (7.6)	1 (1.3)	0.16	15 (6.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.23	15 (6.2)	0 (0)	0.39
Idade gestacional no parto	0.54				0.04				0.01		
Prematuro	9 (11.5)	9 (8.6)	12 (15.6)		21 (9.4)	6 (21.4)	3 (37.5)		23 (9.8) [-3.5] ^a	7 (35.0) [3.5] ^a	
Termo	66 (84.6)	89 (84.8)	60 (77.9)		189 (84.4)	21 (75.0)	5 (62.5)		202 (84.2) [2.3] ^a	13 (65.0) [-2.3] ^a	
Pós-termo	3 (3.9)	7 (6.6)	5 (6.5)		14 (6.2)	1 (3.6)	0 (0)		15 (6.2) [1.1]	0 (0.0) [-1.1]	
Parto	0.78				0.37				0.38		
Vaginal	33 (42.3)	39 (37.1)	30 (39)		86 (38.4)	14 (50)	2 (25)		96 (40)	6 (30)	
Cesárea	45 (57.7)	66 (62.9)	47 (61)		138 (61.6)	14 (50)	6 (75)		144 (60)	14 (70)	

Fonte: elaborado pela autora

*Os valores de p foram calculados por meio de ANOVA ou testes Qui-quadrado/Fisher. [] = resíduos ajustados padronizados $\pm 1,96$, indicando variação significativa ($\alpha = 0,05$). Os valores são expressos como médias $\pm$ desvios-padrão (DP) ou frequências (%). 1º primeiro trimestre de gestação: de 4 a 13 semanas e 6 dias de gestação; 2º segundo trimestre de gestação: de 14 semanas a 27 semanas e 6 dias de gestação; 3º: terceiro trimestre de gravidez: de 28 a 41 semanas e 6 dias de gestação. A gravidade da COVID-19 foi considerada de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (76) A fase aguda - os primeiros 14 dias de sintomas da infecção por SARS-CoV-2 - e a fase de convalescença - 14 dias após o início dos sintomas. Obesidade – Índice de Massa Corpórea ≥ 30 kg/m²; DMG – diabetes mellitus gestacional conforme proposto pelo Painel de Consenso da Associação Internacional de Grupos de Estudo de Diabetes e Gravidez – IADPSG (77); HAS – hipertensão arterial sistêmica definida como pressão arterial maior que 140×90 mmHg durante a gravidez, medida em duas ocasiões distintas; Restrição de crescimento fetal intrauterino - definida como peso fetal estimado ou circunferência abdominal na ultrassonografia abaixo do percentil 10 para a idade gestacional, de acordo com o Colégio Americano de Ginecologia e Obstetrícia - ACOG (81). Idade gestacional no parto definido como prematuro se idade gestacional < 37 semanas de idade gestacional, a termo se parto entre 37 e 40 semanas e 6 dias de idade gestacional e pós-termo se parto com ≥ 41 semanas de idade gestacional. Peso ao nascer classificado como adequados para a idade gestacional - AIG, pequenos para a idade gestacional - PIG ou grandes para a idade gestacional - GIG, de acordo com a classificação proposta pelo *International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century* ou INTERGROWTH-21st (79).

Nenhuma gestante infectada no 1º trimestre apresentou a forma crítica da COVID-19, três delas apresentaram COVID-19 grave (3,9%), e a maioria (96,1%) apresentou forma clínica não grave. Por outro lado, 7 (9,1%) e 15 (19,5%) das gestantes infectadas no 3º trimestre apresentaram formas críticas e graves de COVID-19, respectivamente (Tabela 6). Portanto, há uma associação significativa entre o trimestre gestacional em que ocorre a infecção pelo SARS-CoV-2 e a gravidade da COVID-19, pois **as mulheres infectadas no 3º trimestre têm maior probabilidade de ter doença grave e crítica**, enquanto as infectadas no 1º ou 2º trimestre têm maior probabilidade de ter doença não grave ($p < 0,0001$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Gravidade da COVID-19 de acordo com o diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no trimestre da gravidez das gestantes incluídas no estudo PROUDEST

Gravidade da COVID-19*	Total (n=260) n (%)	Trimestre de gravidez do diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2**			p
		1º (n=78) n (%)	2º (n=105) n (%)	3º (n=77) n (%)	
Não grave	224 (86.2)	75 (96.1)	94 (89.5)	55 (71.4)	< 0.0001
Grave	28 (10.7)	3 (3.9)	10 (9.5)	15 (19.5)	
Crítico	8 (3.1)	0 (0.0)	1 (1.0)	7 (9.1)	

Fonte: elaborado pela autora

*Gravidade do COVID-19 de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (76). ** Trimestre de gravidez do diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2: 1º = diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no primeiro trimestre de gestação (4 a 13 semanas e 6 dias de gestação); 2º = diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no segundo trimestre de gestação (14 semanas a 27 semanas e 6 dias de gestação); 3º = diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no terceiro trimestre de gestação (28 a 41 semanas e 6 dias de gestação). A análise comparativa foi realizada pelo teste Qui-quadrado. A significância foi considerada em valores de $p < 0,05$.

Evidenciou-se também que as gestantes que estavam na **fase aguda da COVID-19 no momento do parto apresentaram gravidade da doença significativamente maior** do que as mulheres que estavam na fase de convalescença no momento do parto ($p < 0,0001$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Gravidade da COVID-19 de acordo com a fase da COVID-19 no parto das gestantes incluídas no estudo PROUDEST

Gravidade da COVID-19	Total (n= 260) n (%)	Fase da COVID-19 no parto*		p
		Convalescente (n=240) n (%)	Aguda (n=20) n (%)	
Não grave	224 (86.2)	217 (90.4)	7 (35)	< 0.0001
Grave	28 (10.7)	21 (8.8)	7 (35)	
Crítico	8 (3.1)	2 (0.8)	6 (30)	

Fonte: elaborado pela autora

* Fase aguda = até 14 dias de início dos sintomas no parto; Fase convalescente = diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no 1º, 2º e 3º trimestre de gravidez. Gravidade da COVID-19 de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (76); A análise comparativa foi realizada pelo teste de tendência Cochran-Armitage. A significância foi considerada em valores de $p < 0,05$.

Outro achado clínico a ser destacado foi a associação significativa entre a **fase aguda da COVID-19 no parto** e a ocorrência de **parto prematuro** ($p = 0,01$) (Tabela 5), assim como a evidência de que a maioria das mulheres com COVID-19 não grave teve parto a termo, enquanto maior proporção de mulheres com **COVID-19 grave ou crítica tiveram parto prematuro** ($p = 0,04$) (Tabela 5).

Na análise multivariada, sem ajuste para as variáveis de controle, a fase da COVID-19 no parto e a gravidade da COVID-19 mostraram-se fatores significativos para a ocorrência de prematuridade (OR = 3,14; IC 95% 1,18; 8,35; $p = 0,0217$) (Tabela 8). Após o ajuste do modelo multivariado de acordo com idade, escolaridade, DMG, hipertensão arterial, pré-eclâmpsia, doenças respiratórias e obesidade, houve aumento das razões de chances, indicando que os recém-nascidos de mães com COVID-19 grave ou crítica no momento do parto tiveram 3,64 vezes mais chances de nascer prematuros do que aqueles nascidos de mães sem COVID-19 grave ou crítica (OR = 3,64; IC 95% 1,26; 10,53; $p = 0,017$) (Tabela 8).

Tabela 8 – Modelagem da razão de chances da idade gestacional no momento do parto de acordo com a gravidade da COVID-19 de gestantes incluídas no estudo PROUDEST

Desfecho	Comparações	Fatores	OR não ajustado (IC 95%)	p	OR ajustado** (IC 95%)	p
Idade gestacional no parto	Prematuro Vs. Termo	Grave & Crítico Vs. Não grave*	3.14 (1.18 - 8.35)	0.0217	3.64 (1.26 - 10.53)	0.017

Fonte: elaborado pela autora

OR = Razão de Chances. *A gravidade da COVID-19 foi considerada de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (76). Idade gestacional no parto definido como prematuro se idade gestacional < 37 semanas de idade gestacional, a termo se parto entre 37 e 40 semanas e 6 dias de idade gestacional e pós-termo se parto com $\geq$ 41 semanas de idade gestacional *Modelo *logit* generalizado. ** Os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) ajustados para idade, escolaridade, diabetes mellitus gestacional, hipertensão arterial sistêmica, pré-eclâmpsia, doença respiratória e obesidade.

6.1.6 Desfechos clínicos nos recém-nascidos

O peso médio dos RN foi de 3.127 g (DP = 567, variando de 620 a 4.568 g). A média do índice de Apgar no 1º minuto foi de 8,0 (mediana = 8,0, DP = 1,2, variando de 2 a 10), e a média do índice de Apgar no 5º minuto foi de 8,9 (mediana = 9,0, DP = 0,7, variando de 5 a 10), sendo que 53 RN (20,3%) apresentaram índice de Apgar no 1º minuto < 7 e 10 RN (3,5%) apresentaram índice de Apgar no 5º minuto abaixo de 7 (3,5%) (Tabela 9).

A maioria dos RN (189) foi classificada como AIG, 34 foram classificados como PIG e 37 foram classificados como GIG (Tabela 9). Não houve casos de malformação fetal entre as gestantes que tiveram COVID-19 durante os diferentes trimestres da gravidez.

A taxa de mortalidade neonatal observada nesta coorte foi de 0,8%, correspondendo a dois casos: um natimorto e um óbito neonatal precoce (Tabela 9). O caso de natimortalidade ocorreu em uma gestante de 41 anos, multipara (G4), diagnosticada com COVID-19 grave na 31ª semana de gestação. A paciente apresentava HAS e DMG classificado como A1. O parto foi induzido com 38 semanas de gestação, e o conceito nasceu com peso AIG, porém sem sinais vitais. A necropsia fetal, associada à análise histopatológica da placenta, identificou hipóxia e hemorragia multiorgânica como causas do óbito. O óbito neonatal ocorreu ao 11º dia de vida e foi atribuído a complicações da prematuridade extrema (26 semanas e 1 dia), insuficiência respiratória e sepse neonatal. O recém-nascido era filho de uma primigesta de 26 anos, diagnosticada com COVID-19 leve e portadora de incompetência istmocervical.

Tabela 9 – Características clínicas de recém-nascidos de mães infectadas com SARS-CoV-2 durante a gravidez

Parâmetro	Frequência n (%)
Sufrimento fetal agudo	28 (10.8)
Peso ao nascer [#]	
Peso (g, média ± DP)	3,127±567
Pequeno (PIG)	36 (13.8)
Adequado (AIG)	187 (71.9)
Grande (GIG)	37 (14.2)
Apgar no 1º minuto de vida	
Escore (média ± DP)	8±1.2
≤ 7	53 (20.4)
> 7	207 (79.6)
Apgar no 5º minuto de vida	
Escore (média ± DP)	9±0.7
≤ 7	10 (3.8)
> 7	250 (96.2)
Mortalidade neonatal	2 (0.8)

Fonte: elaborado pela autora

[#]O peso ao nascer foi classificado em pequeno (PIG), adequado (AIG) e grande (GIG) para a idade gestacional de acordo com a classificação proposta pelo *International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century* ou *INTERGROWTH-21st* (79). A mortalidade neonatal inclui natimortos e óbitos neonatais. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP) ou frequência (%).

O sofrimento fetal agudo, a classificação do peso ao nascer (PIG, AIG ou GIG) e o escore de Apgar no 1º minuto ≤ 7 não diferiram de acordo com o diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no trimestre da gestação (Tabela 10). Poucos RN (n = 10) apresentaram Apgar de 5 minutos ≤ 7, não sendo possível estabelecer relação entre essa variável e nenhum dos fatores estudados.

No entanto, a análise dos dados demonstrou associação significativa entre a presença de **sofrimento fetal agudo** com a **gravidade da doença** (p = 0,01) e com a **fase aguda da COVID-19 no momento do parto** (p = 0,04) (Tabela 10). Esses achados indicam que gestantes com doença grave e crítica têm maior probabilidade de ter RN diagnosticados com sofrimento fetal no momento do parto, assim como na fase aguda da COVID-19 (25,0%) em comparação a gestantes na fase de convalescença (9,6%) (Tabela 10).

Tabela 10 – Características clínicas dos recém-nascidos de mães com infecção por SARS-CoV-2 de acordo com o trimestre da gravidez do diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2, gravidade da COVID-19 e fase da COVID-19 no parto

Parâmetros	Trimestre de gravidez no diagnóstico de COVID-19* n (%)				Gravidade da COVID-19** n (%)				Fase do COVID-19 no parto *** n (%)		
	1º n = 78 (30.0%)	2º n = 105 (40.4%)	3º n = 77 (29.6%)	p	Não grave n = 224 (86.2%)	Grave n = 28 (10.7%)	Crítico n = 8 (3.1%)	p	Convalescente n = 240 (92.3%)	Agudo n = 20 (7.7%)	p
Sofrimento fetal agudo	6 (7.7)	11 (10.5)	11 (14.3)	0.41	20 (8.9)	5 (17.9)	3 (37.5)	0.01	23 (9.6)	5 (25.0)	0.04
Peso ao nascer #	0.86				0.01				0.29		
Pequeno (PIG)	12 (15.4)	14 (13.3)	10 (13.0)		28 (12.5)	7 (25)	1 (12.5)		32 (13.3)	4 (20.0)	
Adequado (AIG)	53 (67.9)	78 (74.3)	56 (72.7)		166 (74.1)	18 (64.3)	3 (37.5)		176 (73.4)	11 (55.0)	
Grande (GIG)	13 (16.7)	13 (12.4)	11 (14.3)		30 (13.4)	3 (10.7)	4 (50.0)		32 (13.3)	5 (25.0)	
Apgar 1º minuto	0.54				0.32				0.25		
≤ 7	19 (24.4)	19 (18.1)	15 (19.5)		42 (18.8)	9 (32.1)	2 (25.0)		47 (19.6)	6 (30.0)	
> 7	59 (75.6)	86 (81.9)	62 (80.5)		182 (81.2)	19 (67.9)	6 (75.0)		193 (80.4)	14 (70.0)	

Fonte: elaborado pela autora

O peso ao nascer foi classificado como pequeno (PIG), adequado (AIG) e grande (GIG) para a idade gestacional de acordo com a classificação proposta pelo *International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century* ou *INTERGROWTH-21st* (79). * Trimestre de gravidez no diagnóstico de COVID-19 1º = diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no primeiro trimestre da gestação (4 a 13 semanas e 6 dias de gestação); 2º = diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no segundo trimestre de gestação (14 semanas a 27 semanas e 6 dias de gestação); 3º = diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no terceiro trimestre de gestação (28 a 41 semanas e 6 dias de gestação). ** A gravidade do COVID-19 foi considerada de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (76). *** Fase aguda = até 14 dias de início dos sintomas no parto; Fase convalescente = diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no 1º, 2º e 3º trimestre de gravidez. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP) ou frequência (%). As análises comparativas foram realizadas por ANOVA ou testes Qui-quadrado/Fisher. A significância foi considerada em valores de $p < 0,05$.

Ajustando os modelos multivariados e de regressão de acordo com idade, escolaridade, DMG, hipertensão, pré-eclâmpsia, doença respiratória e obesidade, foi demonstrado que RN nascidos de mães com **COVID-19 grave ou crítica eram mais propensos ao sofrimento fetal**, com risco **2,4 vezes maior**, do que aqueles nascidos de mães com COVID-19 leve [RP = 2,40; (IC 95% 1,06; 5,46); $p = 0,036$] (Tabela 11).

Apesar de não terem sido observadas diferenças para o escore de Apgar no 5º minuto de acordo com o diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no trimestre da gestação, gravidade da COVID-19 e fase da COVID-19 no parto, a análise da razão de prevalência demonstrou **associação entre a fase da COVID-19 no momento do parto com o escore de Apgar no 1º minuto ≤ 7** (Tabela 11). A modelagem de contagem ajustada para idade, nível de escolaridade, status de DMG, status de hipertensão arterial, status de pré-eclâmpsia, status de doença respiratória e status de obesidade mostraram que os recém-nascidos de mães com **fase aguda de COVID-19 no parto tiveram 2,56 vezes mais chances de ter um escore de Apgar no 1º**

minuto ≤ 7 do que os recém-nascidos de mães com fase convalescente de COVID-19 no parto (RP = 2,56; IC 95% 1,17; 5.56; p = 0,018). (Tabela 11).

Houve também associação significativa entre a gravidade da COVID-19 e a classificação do peso do RN (p = 0,0166) no sentido de que a doença grave foi associada à PIG, a doença não grave foi associada à AIG e a doença crítica foi associada à GIG (Tabela 5).

Tabela 11 – Modelagem de contagem de sofrimento fetal agudo e pontuação de Apgar no 1º minuto ≤ 7 de acordo com a gravidade do COVID-19 e a fase da infecção

Resultado	Fatores	RP não ajustado* (IC 95%)	p	RP ajustado** (IC 95%)	p
Sufrimento fetal agudo	Grave & Crítico Vs. Não grave	2.87 (1.32 - 6.21)	0.007	2.40 (1.06 - 5.46)	0.036
Pontuação de Apgar no 1º minuto ≤ 7	Fase aguda Vs. Fase de convalescença	2.32 (1.07 - 5.05)	0.032	2.56 (1.17 - 5.56)	0.018

Fonte: elaborado pela autora

RP = Razão de Prevalência. IC = Intervalo de confiança. A gravidade da COVID-19 foi considerada de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (76) Fase aguda = até 14 dias de início dos sintomas no parto; Fase convalescente = diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 no 1º, 2º e 3º trimestre de gravidez. * Modelo de regressão de Poisson. **Razão de prevalência ajustada por idade, escolaridade, diabetes mellitus gestacional, hipertensão arterial sistêmica, pré-eclâmpsia, doença respiratória e obesidade com intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

6.2 RESULTADOS DA ANÁLISE RT-PCR PARA SARS-CoV-2 NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE GESTANTES NA FASE AGUDA DE COVID-19 - ESTUDO PROUDEST

Como objetivo secundário, o estudo investigou a presença do SARS-CoV-2 no líquido cefalorraquidiano de gestantes com COVID-19 na fase inicial da infecção. Para isso, amostras de LCR obtidas por punção lombar durante a raquianestesia para parto cesariana foi submetida à análise por RT-PCR para detecção do vírus. A seguir são apresentados os resultados da análise de RT-PCR para SARS-CoV-2 no líquido cefalorraquidiano de gestantes acometidas por COVID-19, conforme dados da coorte PROUDEST.

6.2.1 Descrição da população estudada para investigação de SARS-CoV-2 no LCR

Quatorze gestantes, cujos sintomas de COVID-19 iniciaram-se 4 a 18 dias antes do parto, foram incluídas para pesquisa de RT-PCR para SARS-Co-2 no líquido cefalorraquidiano.

Entre as 14 gestantes estudadas, dez tinham COVID-19 classificada como não grave, três COVID-19 severa e uma COVID-19 crítica, de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (76). Onze gestantes acometidas por COVID-19 relataram anosmia, disgeusia ou cefaleia, manifestações neurológicas associadas à infecção por SARS-CoV-2 (Tabela 12).

Tabela 12 – Características clínicas e resultados da análise do RNA do vírus SARS-CoV-2 por técnica RT-PCR no líquido cefalorraquidiano de gestantes com COVID-19 incluídas no estudo PROUDEST

Nº	Critérios diagnósticos	Severidade	Sintomas neurológicos (a qualquer momento)	Dias desde os primeiros sintomas até o parto e a coleta do LCR ^a	Intervalo entre os testes PCR ^b nasofaríngeo e LCR ^a	Resultado da análise PCR ^b do LCR ^a
1	PCR ^b	Severo	Nenhum	4	Mesmo dia	Negativo
2	PCR ^b	Não grave	Anosmia, disgeusia	5	Mesmo dia	Negativo
3	PCR ^b	Não grave	Cefaleia	6	3 dias	Negativo
4	PCR ^b	Não grave	Cefaleia, anosmia, disgeusia	6	3 dias	Negativo
5	PCR ^b	Não grave	Cefaleia	7	1 dia	Negativo
6	PCR ^b	Severo	Cefaleia, anosmia, disgeusia	7	Mesmo dia	Negativo
7	Ac ^c e TC ^d	Crítico ^e	Nenhum	7	NA ^g	Negativo
8	TC ^d	Não grave	Cefaleia, anosmia, disgeusia	8	NA ^g	Negativo
9	TC ^d	Não grave	Nenhum	9	NA ^g	Negativo
10	PCR ^b	Severo ^f	Anosmia. Convulsões tônico-clônicas generalizadas. TC cerebral: Síndrome de encefalopatia posterior reversível	12	Mesmo dia	Negativo
11	TC ^d	Não grave	Anosmia, disgeusia	13	NA ^g	Negativo
12	PCR ^b	Não grave	Cefaleia	13	11 dias	Negativo
13	Ac ^c e TC ^d	Não grave	Cefaleia, anosmia, disgeusia	14	NA ^g	Negativo
14	PCR ^b	Não grave	Anosmia, disgeusia	18	18 dias	Negativo

Fonte: elaborado pela autora

a - LCR, líquido cefalorraquidiano; b - PCR, reação em cadeia da polimerase; c - Ac, anticorpos; d - TC, tomografia computadorizada; e - óbito no 18º dia pós-parto por insuficiência respiratória; f - Óbito no 13º dia pós-parto por falência de múltiplos órgãos, g - NA, não se aplica.

Dentre as gestantes avaliadas neste estudo com COVID-19, estavam as pacientes que evoluíram para óbito - uma paciente com doença crítica que morreu 18 dias após o parto devido a insuficiência respiratória e uma paciente com doença severa cuja condição respiratória estava melhorando quando desenvolveu convulsões tônico-clônicas generalizadas recorrentes e os achados angiotomográficos indicaram síndrome de encefalopatia posterior reversível sem sinais de trombose ou hemorragia, levando à morte 13 dias após o parto por falência de múltiplos órgãos.

A pesquisa de RT-PCR para SARS-Co-2 no líquido cefalorraquidiano foi negativa em todas as pacientes estudadas. (Tabela 12)

6.3 RESULTADOS DA ANÁLISE DE MEDIADORES IMUNES SOLÚVEIS AVALIADOS NO SORO E LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE PARTURIENTES ACOMETIDAS POR COVID-19 - ESTUDO PROUDEST

Como objetivo secundário, o estudo PROUDEST também buscou caracterizar os mediadores imunes solúveis, tanto sistêmicos quanto compartimentados no líquido cefalorraquidiano (LCR), em parturientes com COVID-19 nas fases aguda ou convalescente, comparando-os com controles saudáveis. A seguir apresentamos os resultados da análise dos mediadores imunes solúveis avaliados no soro e no LCR de parturientes acometidas por COVID-19, conforme os dados da coorte PROUDEST.

6.3.1 Descrição da população estudada para análise do perfil imunológico

Para este estudo, foram incluídas um total de 155 parturientes categorizadas em cinco grupos referidos como: i) "**Aguda**" - parturientes com infecção aguda por SARS-CoV-2 (até 14 dias de início dos sintomas no parto); ii) "**Precoce**" - parturientes convalescentes por COVID-19 com infecção prévia por SARS-CoV-2 adquirida no 3º trimestre gestacional; iii) "**Intermediária**" - parturientes convalescentes por COVID-19 com infecção prévia por SARS-CoV-2 adquirida no 2º trimestre gestacional; iv) "**Tardia**" - parturientes convalescentes por COVID-19 com infecção prévia por SARS-CoV-2 adquirida no 1º trimestre gestacional; e v) "**HC**" - grupo controle de referência composto por parturientes saudáveis sem história clínica de COVID-19 associada a testes sorológicos negativos para infecção por SARS-CoV-2 após o parto. (Tabela 13)

Tabela 13 – Características clínicas das parturientes acometidas por COVID-19 em diferentes períodos da gestação e de parturientes controle, incluídas para avaliação do perfil imunológico no estudo PROUDEST

Parâmetros	COVID-19					p
	HC n=9	Aguda n=21	Convalescente			
			Precoce n=31	Inter n=53	Tardia n=41	
Idade, média (±DP)	32 (±5)	30 (±5)	32 (±6)	32 (±6)	29 (±7)	0.0886
DMG, n (%)	4 (44)	3 (14)	13 (42)	19 (36)	16 (39)	0.2646
HAS, n (%)	2 (22)	3 (14)	6 (19)	12 (23)	7 (17)	0.9250
PE, n (%)	2 (22)	4 (19)	2 (6)	2 (4)	3 (7)	0.1344

Fonte: elaborado pela autora

HC = grupo controle de referência composto por parturientes sem história clínica e achados laboratoriais de COVID-19; Aguda = parturientes com infecção aguda por SARS-CoV-2 (até 14 dias após o início dos sintomas); Precoce, Inter e Tardia = parturientes com COVID-19 convalescente com história de infecção por SARS-CoV-2 no terceiro, segundo e primeiro trimestre gestacional, respectivamente. A idade é expressa em anos. DMG = diabetes mellitus gestacional; HAS = hipertensão arterial sistêmica; PE = pré-eclâmpsia. A idade foi comparada por ANOVA seguida do pós-teste de Tuckey para comparações múltiplas. Os dados categóricos foram comparados pelo teste Qui-quadrado. Em todos os casos, considerou-se significância em $p < 0,05$.

6.3.2 Amostra de soro e líquido cefalorraquidiano para composição da análise do perfil imunológico do estudo PROUDEST

Um total de 155 amostras de sangue total (10 mL cada) foram coletadas por punção venosa no momento do parto, utilizando-se tubos a vácuo sem anticoagulante (HC, n = 9; Aguda, n = 21; Precoce, n = 31; Intermediário, n = 53 e Tardio, n = 41).

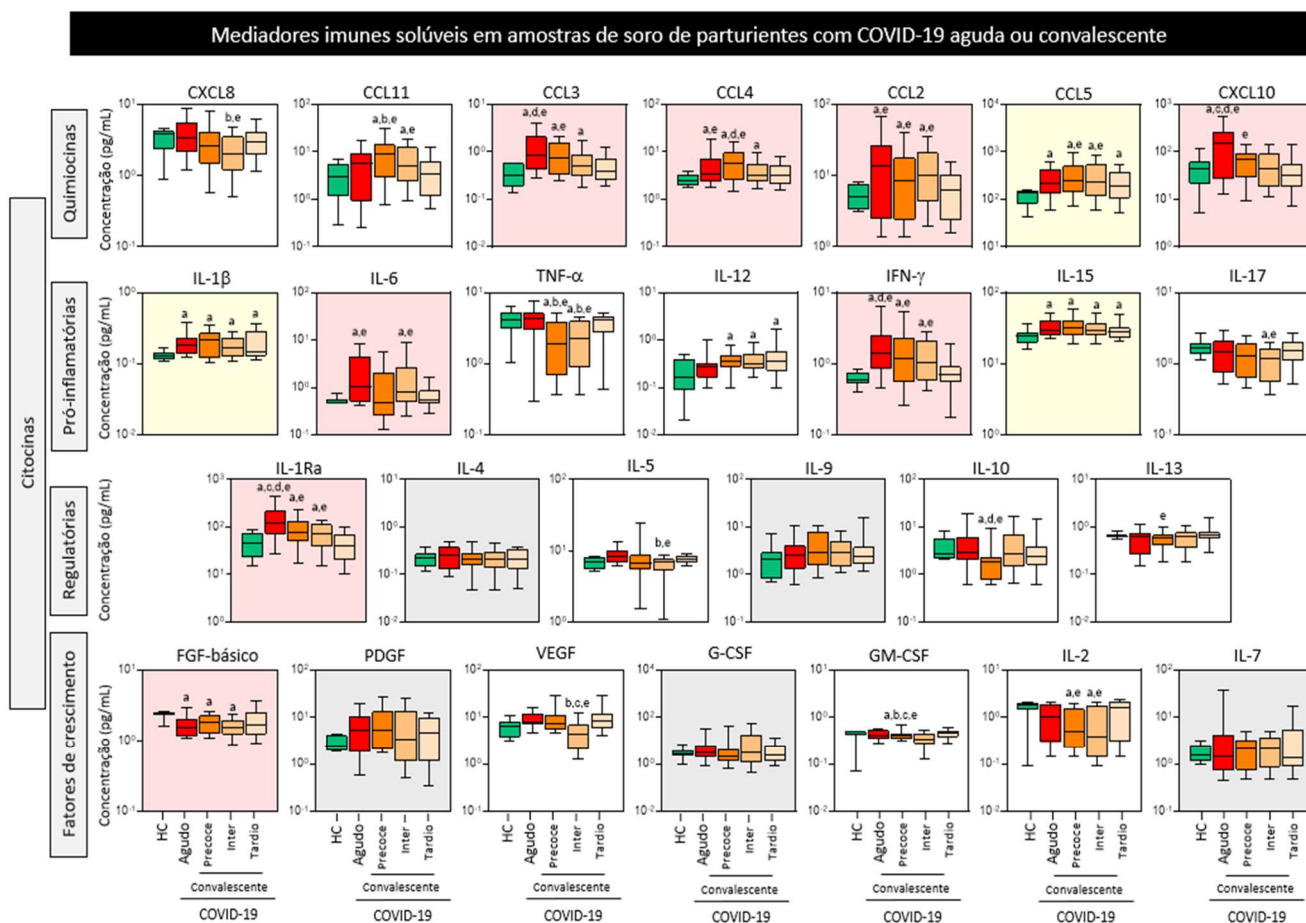
Um total de 65 amostras de líquido cefalorraquidiano - LCR (0,5 mL cada) foram coletadas por punção lombar durante a raquianestesia para cesariana (HC, n = 6; Aguda, n = 8; Precoce, n = 18; Intermediário, n = 11 e Tardio, n = 22).

6.3.3 Mediadores imunes solúveis em amostras de soro de parturientes com fases agudas ou convalescentes de COVID-19

Os níveis de quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-15, IL -17), citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-7) foram medidos em amostras de soro coletadas de parturientes com infecção aguda por SARS-CoV-2 e fases convalescentes de COVID-19 (Precoce, Intermediária e Tardia) em comparação com parturientes controles saudáveis. Os

resultados são apresentados na Figura 5. A análise dos dados demonstrou que os níveis de CCL5, IL-1 β e IL-15 estavam aumentados em todos os subgrupos de COVID-19 em comparação com controles saudáveis. Além disso, os níveis de CCL3, CCL4, CCL2, CXCL10, IL-6, IFN- γ , IL-1Ra e FGF-básico apresentaram aumento significativo nos grupos de convalescença aguda, precoce e/ou intermediária com níveis inalterados no grupo de convalescença tardia em relação ao HC. Adicionalmente, os níveis de IL-4, IL-9, IL-7, PDGF e G-CSF permaneceram inalterados em todos os subgrupos de COVID-19 em comparação com HC. CXCL8, CCL11, TNF- α , IL-12, IL-17, IL-5, IL-10, IL-13, VEGF, GM-CSF e IL-2 exibiram padrões variáveis entre os subgrupos de COVID-19. Os dados sobre as moléculas do sistema imune presentes no soro de mulheres em trabalho de parto com COVID-19 ativa ou em fase de recuperação podem ser vistos na Figura 5 a seguir.

Figura 5 – Mediadores imunes solúveis de soro de parturientes com COVID-19 aguda ou convalescente incluídas no estudo PROUDEST



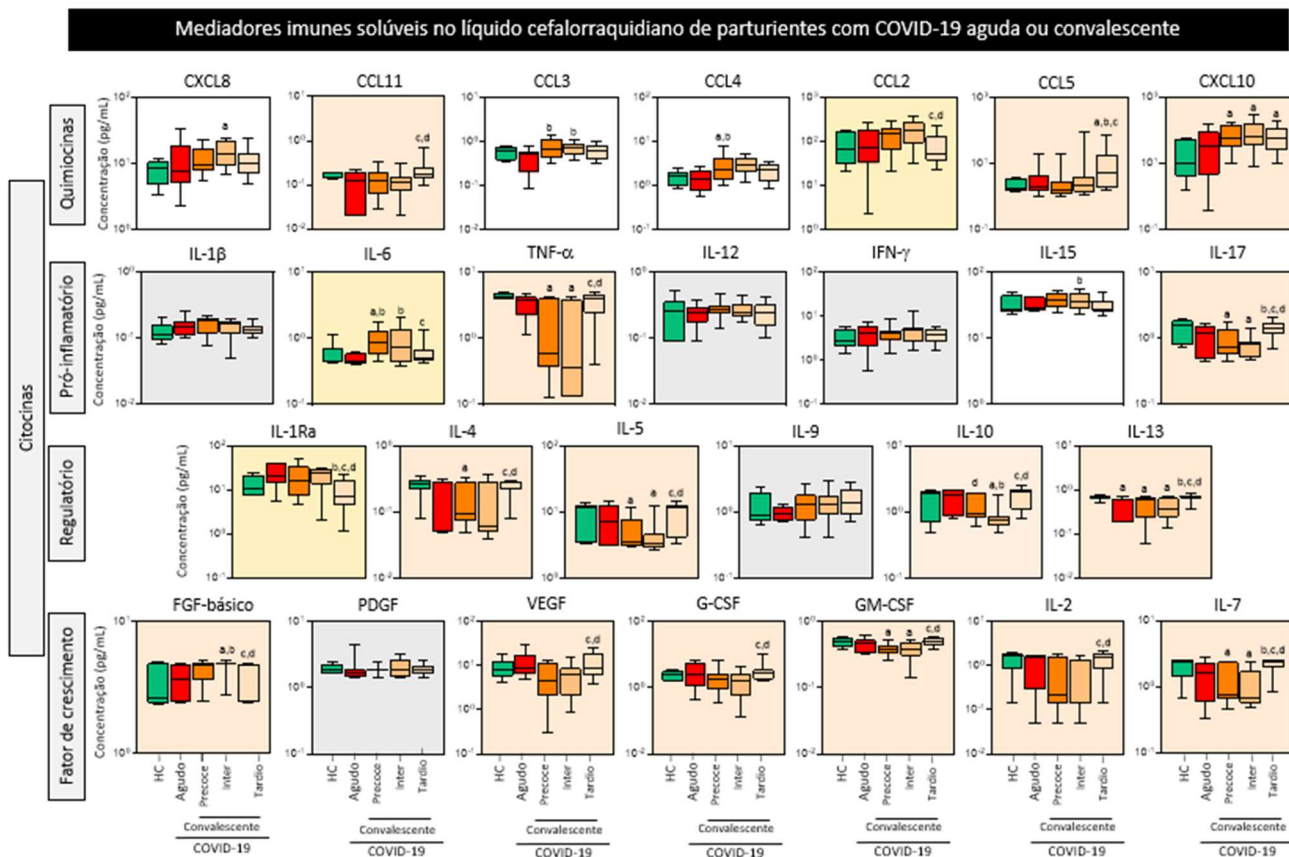
Fonte: elaborado pela autora

HC = grupo controle de referência composto por parturientes saudáveis sem história clínica e achados laboratoriais de COVID-19; Aguda = parturientes com infecção aguda por SARS-CoV-2 (até 14 dias após o início dos sintomas); Precoce, Inter e Tardia = parturientes com COVID-19 convalescente com história de infecção por SARS-CoV-2 no terceiro, segundo e primeiro trimestre gestacional, respectivamente. Agudo (■, n=21); Convalescentes, referido como subgrupos: Precoce (■, n=31), Intermediário (Inter; ■, n=53) ou Tardio (■, n=41) em comparação a parturientes controles saudáveis (HC = ■, n=9). Os resultados são apresentados em gráficos de box plot mostrando a mediana, intervalos interquartis e valores mínimos e máximos de concentração sérica (pg/mL). A análise comparativa múltipla foi realizada por Kruskal-Wallis seguida do pós-teste de Dunn. Em todos os casos, considerou-se significância em $p < 0,05$. Diferenças significativas foram ressaltadas pelas letras "a", "b", "c", "d" e "e" para comparações com os grupos: HC, Agudo, Precoce, Intermediário e Tardio. Fundos de cores foram usados para representar padrões distintos de mediadores imunológicos da seguinte forma: (■) = aumento significativo em todos os subgrupos de COVID-19 em comparação com HC; (■) = aumento significativo nos grupos de convalescença aguda, precoce e/ou intermediária com níveis inalterados no grupo de convalescença tardia em comparação com HC; (■) = níveis inalterados em todos os subgrupos de COVID-19 em comparação com HC e (■) = padrões variáveis de mediadores solúveis entre subgrupos.

6.3.4 Mediadores imunes solúveis em amostras de LCR de parturientes com fases agudas ou convalescentes de COVID-19

Os níveis de mediadores imunes solúveis foram medidos em amostras de LCR coletadas de parturientes com infecção aguda por SARS-CoV-2 ou fases convalescentes de COVID-19 (Precoce, Intermediária e Tardia) em comparação com parturientes controle saudáveis. Os resultados são apresentados na Figura 6. Os dados demonstraram que CCL11, CCL5, CXCL10, TNF- α , IL-17, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, FGF-básico, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2 e IL-7 apresentaram aumento significativo no grupo de convalescentes tardios em comparação com outros subgrupos de COVID-19 e/ou HC. Por outro lado, CCL2, IL-6 e IL-1Ra exibiram diminuição significativa no grupo de convalescentes tardios em comparação com outros subgrupos de COVID-19. Os níveis de IL-1 β , IL-12, IFN- γ , IL-9 e PDGF permaneceram inalterados em todos os subgrupos de COVID-19 em comparação com HC. CXCL8, CCL3, CCL4 e IL-15 mostraram padrões variáveis entre os subgrupos de COVID-19. Na Figura 6, seguinte, apresentam-se os níveis de mediadores imunológicos solúveis no líquido cefalorraquidiano de mulheres em trabalho de parto com COVID-19, tanto na fase aguda quanto na fase de convalescença.

Figura 6 – Mediadores imunes no líquido cefalorraquidiano de parturientes com COVID-19 aguda ou convalescente no estudo PROUDEST



Fonte: elaborado pela autora

HC = grupo controle de referência composto por parturientes saudáveis sem história clínica e achados laboratoriais de COVID-19; Aguda = parturientes com infecção aguda por SARS-CoV-2 (até 14 dias após o início dos sintomas); Precoces, Inter e Tardios = parturientes com COVID-19 convalescente com história de infecção por SARS-CoV-2 no terceiro, segundo e primeiro trimestre gestacional, respectivamente. Agudo (■, n=8); Convalescentes, referido como subgrupos: Precoces (■, n=18), Intermediário (Inter; ■, n=11) ou Tardios (■, n=22) em comparação a parturientes controles saudáveis (HC = ■, n=6). Os resultados são apresentados em gráficos de box plot mostrando a mediana, intervalos interquartis e valores mínimos e máximos de concentração de LCR (pg/mL). A análise comparativa múltipla foi realizada por Kruskal-Wallis seguida do pós-teste de Dunn. Em todos os casos, considerou-se significância em $p < 0,05$. Diferenças significativas foram ressaltadas pelas letras "a", "b", "c", "d" e "e" para comparações com os grupos HC, Agudo, Precoces, Intermediário e Tardios, respectivamente. Fundos de cores foram usados para representar padrões distintos de mediadores imunológicos da seguinte forma: (■) = aumento significativo no grupo de convalescentes tardios em comparação com outros subgrupos de COVID-19 e/ou HC; (■) = diminuição significativa no 1º em comparação com outros subgrupos da COVID-19; (■) = níveis inalterados em todos os subgrupos de COVID-19 em comparação com HC e (■) = padrões variáveis de mediadores solúveis entre os subgrupos.

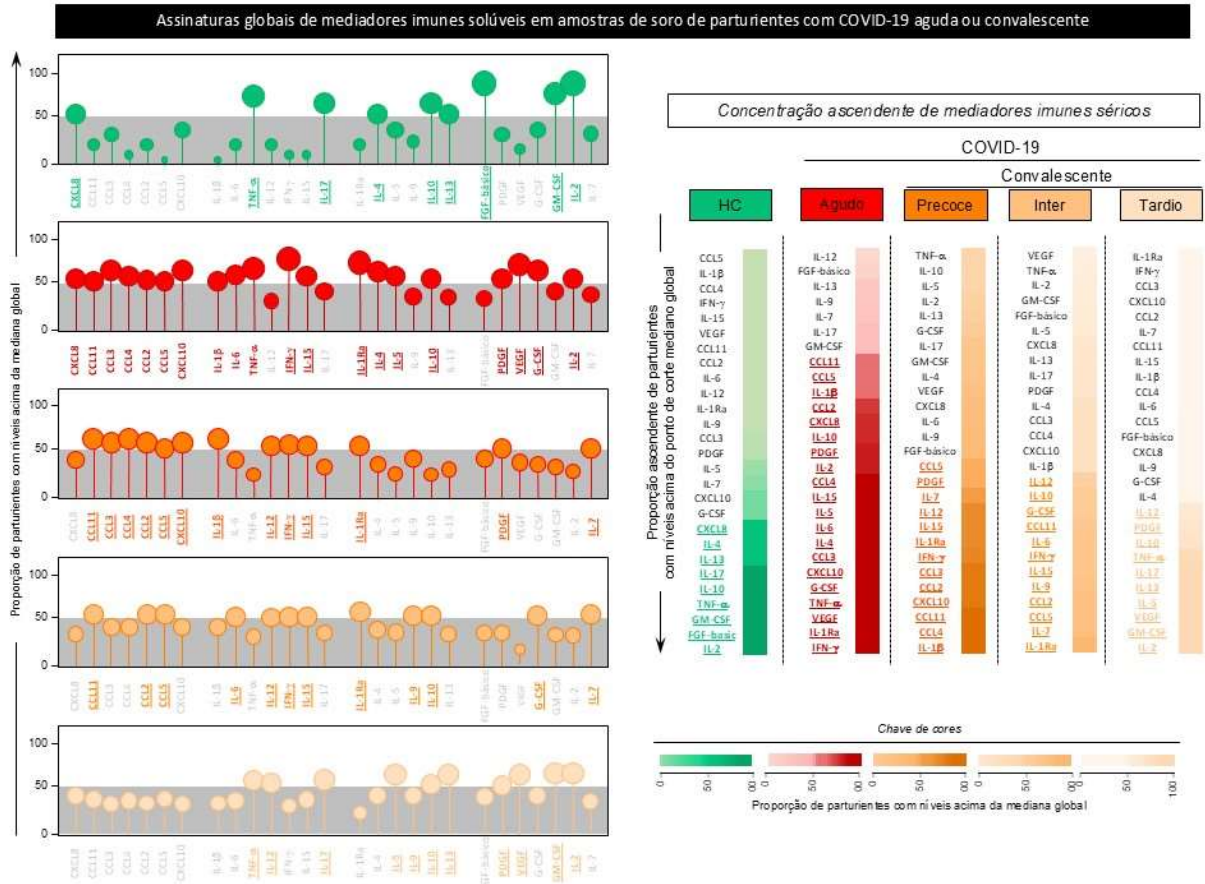
6.3.5 Assinaturas gerais de mediadores imunológicos solúveis em amostras de soro e LCR de parturientes com fases agudas ou convalescentes de COVID-19

As assinaturas dos mediadores imunes solúveis séricos e líquóricos foram construídas como dados categóricos, relatados como a proporção de parturientes com níveis acima dos valores de corte e os resultados apresentados na Figura 7 e na Figura 8. As assinaturas de mediadores solúveis séricos ascendentes foram montadas para selecionar o conjunto de mediadores imunes que exibiam uma proporção de parturientes acima da zona cinzenta (> 50%).

O perfil geral de assinatura observado nas amostras de soro demonstrou que um amplo conjunto de mediadores imunológicos apresentou níveis aumentados na infecção aguda por SARS-CoV-2, incluindo todas as quimiocinas (CXCL8; CCL11; CCL3; CCL4; CCL2; CCL5; CXCL10) e 13 das 20 citocinas e fatores de crescimento (IL-1 β ; IL-6; TNF- α ; IFN- γ ; IL-15; IL-1Ra; IL-4; IL-5; IL-10; PDGF; VEGF; G-CSF; IL-2). Um claro declínio no conjunto de mediadores imunológicos séricos foi observado durante a COVID-19 convalescente, com uma diminuição progressiva com o intervalo de tempo entre a infecção por SARS-CoV-2 e o parto. A maioria dos mediadores imunes solúveis séricos observados no grupo de convalescentes tardios (TNF- α , IL-17, IL-10, IL-13, GM-CSF e IL-2) foram semelhantes aos relatados para HC (Figura 7A e B).

A análise das assinaturas dos mediadores solúveis do LCR demonstrou que apenas um pequeno conjunto de mediadores imunes apresentou níveis aumentados na infecção aguda (IL-1Ra; IL-4; IL-10; G-CSF) com aumento progressivo com o intervalo de tempo entre a infecção por SARS-CoV-2 e o parto, com maior número de mediadores imunes observado no grupo Convalescente tardio (CCL11; CCL5; TNF- α ; IL-17; IL-4; IL-5; IL-9; IL-10; IL-13; VEGF; G-CSF; GM-CSF; IL-7) em comparação com outros subgrupos de COVID-19 (Figura 9A). Um aumento nos mediadores imunes solúveis foi observado no LCR dos subgrupos convalescentes em comparação com o grupo agudo. Um aumento proeminente de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas foi observado no LCR dos subgrupos Precoce e Intermediário, respectivamente. O subgrupo Convalescente tardio apresentou um aumento mais proeminente de citocinas reguladoras e fatores de crescimento em comparação com o grupo Agudo (Figura 8A e B).

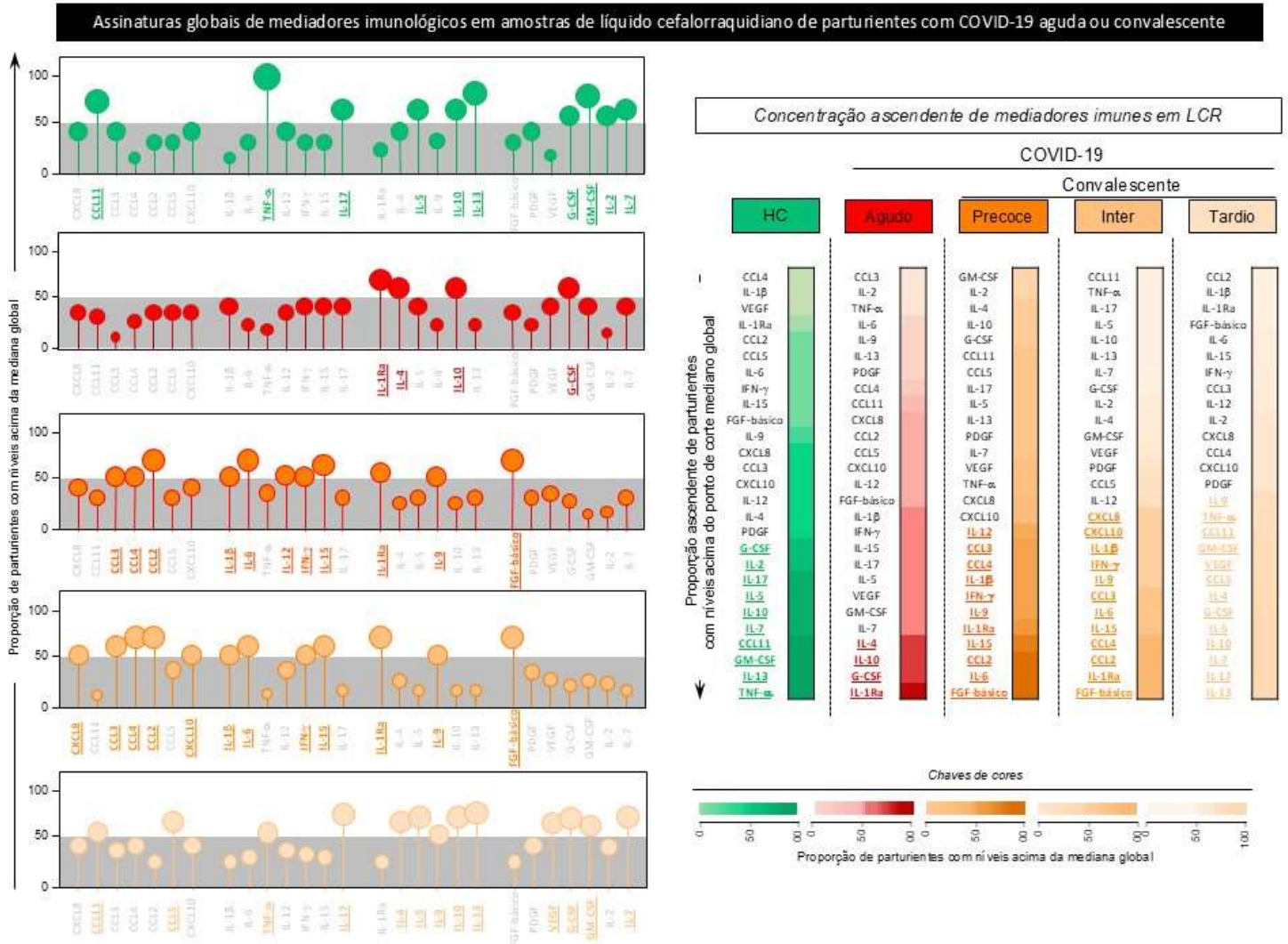
Figura 7A e B – Assinaturas globais de mediadores imunes solúveis em amostras de soro de parturientes com COVID-19 aguda ou convalescente incluídas no estudo PROUDEST



Fonte: elaborado pela autora

HC = grupo controle de referência composto por parturientes saudáveis sem história clínica e achados laboratoriais de COVID-19; Aguda = parturientes com infecção aguda por SARS-CoV-2 (até 14 dias após o início dos sintomas); Precoce, Inter e Tardia = parturientes com COVID-19 convalescente com história de infecção por SARS-CoV-2 no terceiro, segundo e primeiro trimestre gestacional, respectivamente. Assinaturas de quimiocinas séricas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento foram montadas para parturientes com infecção aguda por SARS-CoV-2 (Aguda = ●, n = 21) ou parturientes com infecção prévia por SARS-CoV-2, referidas como convalescentes: Precoce (●, n = 31), Intermediária (●, n = 53) ou Tardia (●, n = 41) em comparação a parturientes controles saudáveis (HC = ●, n = 9). Os níveis de mediadores imunes solúveis foram quantificados por matriz multiplex de microesferas de alto rendimento. As assinaturas foram construídas a partir da conversão de valores contínuos obtidos em pg/mL em dados categóricos. Os resultados são apresentados em gráficos de pirulito mostrando a proporção (%) de parturientes com níveis de mediadores imunes solúveis acima dos valores de corte definidos como a concentração mediana global de cada mediador solúvel. Os mediadores solúveis séricos que apresentaram proporção de parturientes acima de 50% (zona cinza) foram incluídos no conjunto de mediadores imunes com níveis aumentados. As construções do mapa de cores foram montadas para ilustrar as assinaturas ascendentes de mediadores solúveis séricos dos subgrupos COVID-19 e HC. Chaves de cores foram utilizadas para ressaltar o conjunto de mediadores solúveis séricos com proporção > 50%.

Figura 8A e B – Assinaturas globais de mediadores imunológicos solúveis em amostras de líquido cefalorraquidiano de parturientes com COVID-19 aguda ou convalescente incluídas no estudo PROUDEST



Fonte: elaborado pela autora

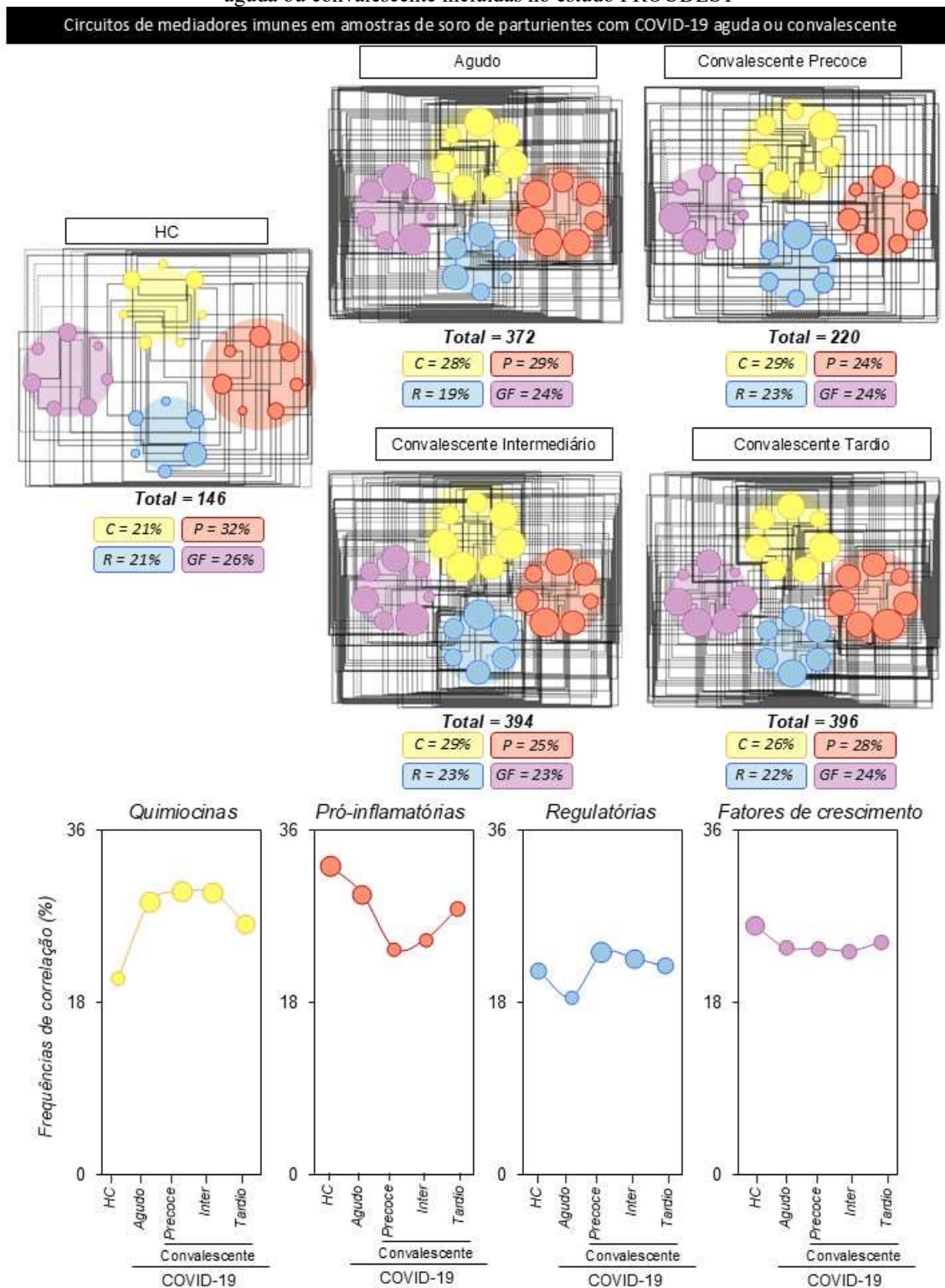
Assinaturas globais em líquido cefalorraquidiano (LCR) de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento montadas para parturientes com infecção aguda por SARS-CoV-2 - até 14 dias após o início dos sintomas ou parturientes convalescentes com infecção prévia por SARS-CoV-2, referidas como: Precoce, Intermediária ou Tardia de acordo com os trimestres de gestação (Terceiro, Segundo ou Primeiro, respectivamente) em comparação a parturientes controles saudáveis. Parturientes Agudas (●, n = 8); Parturientes convalescentes: Precoce (●, n = 18), Intermediária (Inter, ●, n = 11) ou Tardia (●, n = 22); Parturientes controles saudáveis (HC = ●, n = 6). Os níveis de mediadores imunes solúveis foram quantificados por matriz multiplex de microesferas de alto rendimento. As assinaturas foram realizadas mediante conversão de valores contínuos obtidos em pg/mL em dados categóricos. Os resultados são apresentados em gráficos de pirulito mostrando a proporção (%) de parturientes com níveis de mediadores imunes solúveis acima dos valores de corte definidos como a concentração mediana global de cada mediador solúvel. Os mediadores solúveis do LCR que apresentaram proporção de parturientes acima de 50% (zona cinza) foram incluídos no conjunto de mediadores imunes com níveis aumentados. As construções do mapa de cores foram montadas para ilustrar as assinaturas ascendentes de mediadores solúveis séricos dos subgrupos COVID-19 e HC. Chaves de cores foram utilizadas para ressaltar o conjunto de mediadores solúveis séricos com proporção > 50%.

6.3.6 Circuitos de mediadores imunes solúveis em amostras de soro e LCR de parturientes com fases agudas ou convalescentes de COVID-19

Com o objetivo de caracterizar ainda mais a interação entre mediadores solúveis no soro e microambientes liquóricos em parturientes com fases agudas ou convalescentes de COVID-19, circuitos de rede integrativa foram construídos como circuitos de cluster de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento. Foram calculados o número total de correlações e a frequência de conexões intracluster, e os resultados apresentados nas Figuras 9 e 10. No geral, correlações moderadas e fortes (escores "r" variando de 0,67 a 1,00) foram observadas entre os mediadores imunológicos séricos e do LCR.

A análise dos circuitos de mediadores imunes solúveis em amostras de soro demonstrou que, no geral, o número de conexões séricas foi maior para todos os subgrupos de COVID-19 (Agudo = 372; Cedo = 220; Intermediário = 394 e Tardio = 396) em comparação com controles saudáveis (HC = 146), conforme Figura 9A. A análise comparativa do intracluster demonstrou ainda que os subgrupos COVID-19 apresentaram mais correlações envolvendo quimiocinas e conectividade ligeiramente menor compreendendo fatores de crescimento em comparação com HC (Figura 9A e B). A análise dos circuitos intracluster demonstrou maior envolvimento de citocinas pró-inflamatórias e menores conexões envolvendo citocinas reguladoras durante a infecção aguda por SARS-CoV-2 no parto. Por outro lado, observou-se um equilíbrio oposto para COVID-19 convalescente (Precoces, Intermediário e Tardio) que apresentou menores correlações envolvendo citocinas pró-inflamatórias e maior conectividade mediada por citocinas regulatórias, conforme demonstrado na Figura 9.

Figura 9A e B – Circuitos de mediadores imunes solúveis em amostras de soro de parturientes com COVID-19 aguda ou convalescente incluídas no estudo PROUDEST



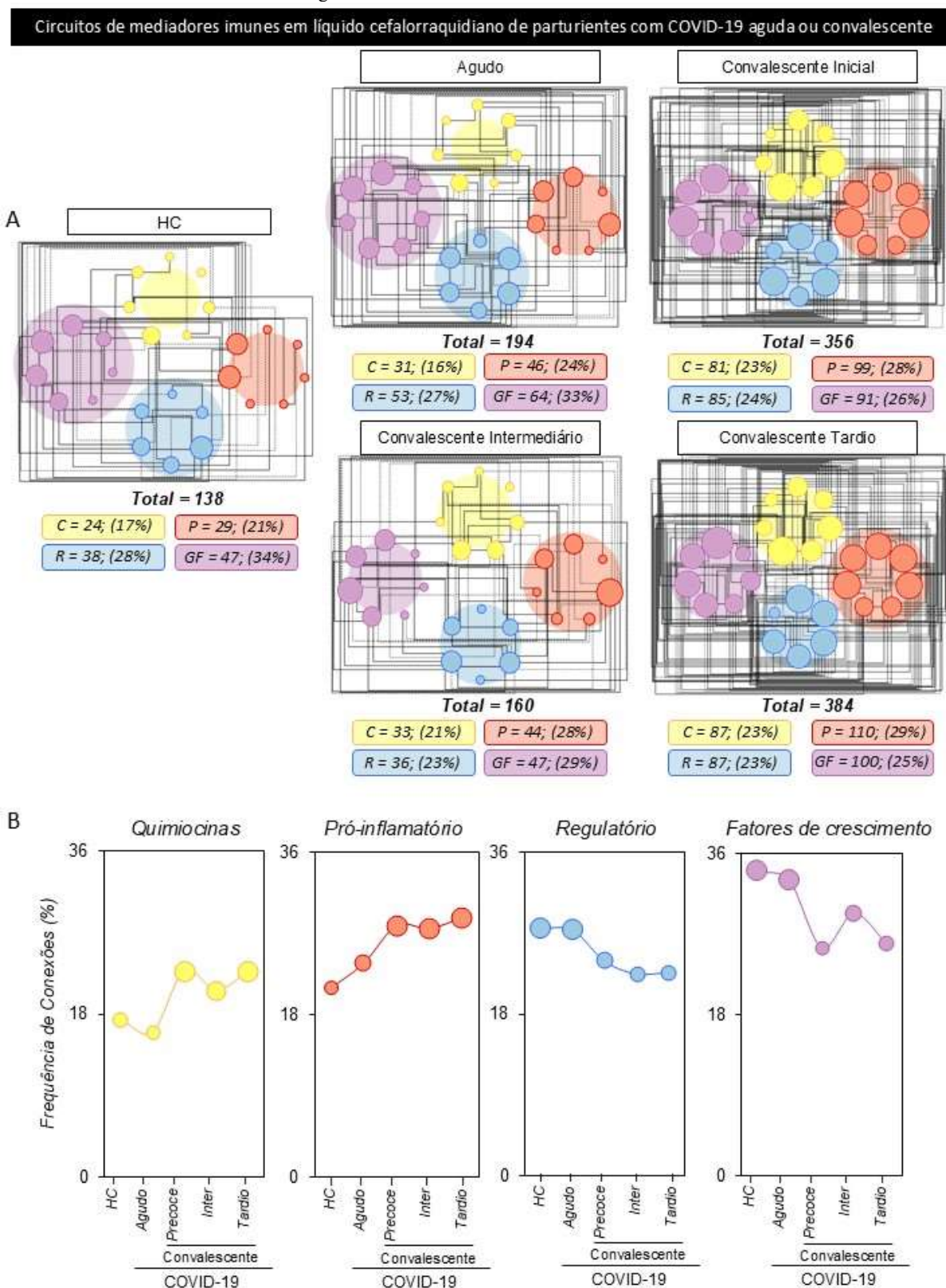
Fonte: elaborado pela autora

Circuitos de rede abrangentes foram montados para quimiocinas séricas (C), citocinas pró-inflamatórias (P), citocinas reguladoras (R) e fatores de crescimento (GF) medidos em amostras de soro coletadas de parturiente com infecção aguda por SARS-CoV-2 até 14 dias após o início dos sintomas (Aguda = ■, n = 21) ou parturientes convalescentes por COVID-19 com infecção prévia por SARS-CoV-2, referidas como subgrupos: Precoce (■, n = 31), Intermediária (Inter; ■, n = 53) ou Tardia (■, n = 41) de acordo com os trimestres de gestação (Terceiro, Segundo ou Primeiro, respectivamente) em comparação com parturientes controles saudáveis (HC = ■, n = 9).

Os níveis de mediadores imunes solúveis foram quantificados por matriz multiplex de microesferas de alto rendimento. Os circuitos de mediadores solúveis séricos foram construídos com base na análise de correlação (testes de postos de Spearman) entre pares de mediadores solúveis. Apenas correlações significativas ($p < 0,05$) foram empregadas para construir os quatro circuitos de cluster (quimiocinas = C; citocinas pró-inflamatórias = P; citocinas regulatórias = R e fatores de crescimento = GF) usando o software de código aberto *Cytoscape*. O número total de correlações e a frequência dentro de cada cluster são fornecidos na figura. Os fundos de cores dos circuitos ressaltam a contribuição proporcional (%) de cada cluster para o número total de correlações. Os gráficos de linhas ilustram a análise comparativa das frequências de correlação dentro de cada cluster entre os subgrupos.

A análise de circuitos de mediadores imunes solúveis em amostras de LCR também demonstrou maior número de conexões no LCR para todos os subgrupos de COVID-19 (Agudo = 194; Cedo = 356; Intermediário = 160 e Tardio = 384) em comparação com controles saudáveis (HC = 138), como consta na Figura 10A. A análise da conectividade intracluster mostrou uma tendência de queda na conectividade envolvendo citocinas regulatórias e fatores de crescimento para todos os subgrupos de COVID-19 convalescentes em comparação à infecção aguda por SARS-CoV-2 no parto e HC. Por outro lado, foi observado aumento da conectividade envolvendo quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias para todos os subgrupos de COVID-19 convalescentes em comparação com a infecção aguda por SARS-CoV-2 no parto e HC, apresentado nas Figura 10A e B.

Figura 10 A e B – Circuitos de mediadores imunes insolúveis em amostras de líquido cefalorraquidiano de parturientes com COVID-19 aguda ou convalescente incluídas no estudo PROUDEST



Fonte: Elaborado pela autora

Circuitos de rede abrangentes foram montados para quimiocinas (C) do líquido cefalorraquidiano (LCR), citocinas pró-inflamatórias (P), citocinas reguladoras (R) e fatores de crescimento (GF) medidos em amostras de soro coletadas de parturiente com infecção aguda por SARS-CoV-2 até 14 dias após o início dos sintomas (agudo = ■, n = 8) ou parturientes convalescentes por COVID-19 com infecção prévia por SARS-CoV-2, referidas como: Precoces (■, n = 18), Intermediário (Inter; ■, n = 11) ou Tardio (■, n = 22) em comparação com parturientes de controle saudáveis (HC = ■, n = 6). Os níveis de mediadores imunes solúveis foram quantificados por matriz multiplex de microesferas de alto rendimento. Os circuitos de mediadores solúveis do LCR foram construídos com base na análise de correlação (testes de postos de Spearman) entre pares de mediadores solúveis. Apenas correlações significativas ($p < 0,05$) foram empregadas para construir os quatro circuitos de cluster (quimiocinas = C; citocinas pró-inflamatórias = P; citocinas regulatórias = R e fatores de crescimento = GF) usando o software de código aberto *Cytoscape*. O número total de correlações e a frequência dentro de cada cluster são fornecidos na figura. Os fundos de cores dos circuitos ressaltam a contribuição proporcional (%) de cada cluster para o número total de correlações. Os gráficos de linhas ilustram a análise comparativa das frequências de correlação dentro de cada cluster entre os subgrupos.

6.3.7 Resumo das alterações nos mediadores imunes solúveis em amostras de soro e líquido cefalorraquidiano de parturientes com COVID-19 nas fases aguda e convalescente

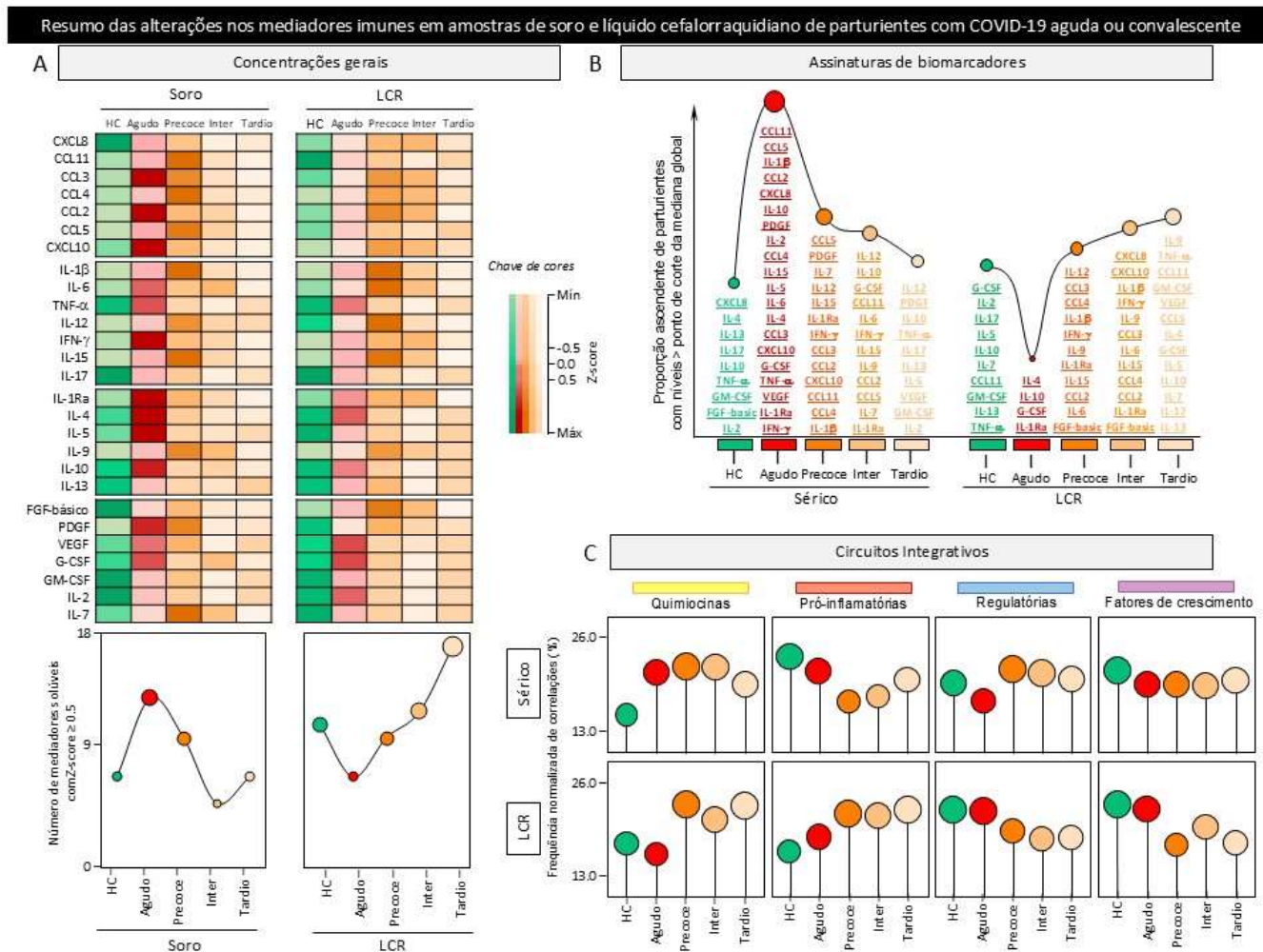
Um resumo das concentrações gerais, assinaturas de mediadores imunológicos e circuitos integrativos de mediadores imunes solúveis foi obtido para análise comparativa entre amostras de soro e LCR obtidas na infecção aguda por SARS-CoV-2 no parto, COVID-19 convalescente (precoces, intermediário e tardio), bem como parturientes de controle saudáveis, conforme apresentado na Figura 11. Os escores Z foram calculados para normalizar os dados e mapas de cores foram construídos para análise comparativa entre os compartimentos. Os resultados demonstraram um perfil invertido para amostras de soro e LCR. No compartimento sérico, foi observado um aumento de mediadores imunológicos solúveis na infecção aguda por SARS-CoV-2 em comparação com HC, com um declínio dos subgrupos COVID-19 convalescentes precoces para tardios. Por outro lado, no compartimento do LCR, foi observada uma diminuição dos mediadores imunológicos solúveis na infecção aguda por SARS-CoV-2 em comparação com o HC, com um aumento progressivo dos subgrupos de COVID-19 convalescentes precoces para tardios, como pode ser visto na figura 11A.

As assinaturas dos mediadores imunes foram compiladas para permitir comparações entre os conjuntos de mediadores solúveis com níveis aumentados nos compartimentos sérico e líquórico entre os subgrupos, o que é mostrado na Figura 11B. Corroborando os resultados expressos nas concentrações gerais, as assinaturas do mediador imunológico demonstraram um perfil invertido para amostras de soro e LCR. No compartimento sérico, um conjunto aumentado de mediadores imunes solúveis foi observado na infecção aguda por SARS-CoV-2 em comparação com HC, com um declínio dos subgrupos COVID-19 convalescentes precoces para os tardios. Por outro lado, no compartimento do LCR, um conjunto reduzido de mediadores imunológicos solúveis foi observado na infecção aguda por SARS-CoV-2 em comparação com

HC, com um aumento progressivo dos subgrupos COVID-19 convalescentes precoces para tardios, o que consta na figura 11B.

A análise descritiva dos circuitos integrativos foi realizada para comparar a frequência de correlações intracluster entre os subgrupos (Figura 11C). Os resultados mostraram perfis distintos de conectividade entre mediadores solúveis no soro em comparação com o compartimento do LCR. Em detalhes, as quimiocinas exibiram uma frequência aumentada de correlações em subgrupos convalescentes de COVID-19 em comparação com HC. Os fatores de crescimento mostraram uma ligeira diminuição na frequência de correlações nos subgrupos de COVID-19 convalescentes em comparação com o HC. Perfis opostos de conectividade envolvendo citocinas pró-inflamatórias e regulatórias foram observados nos compartimentos sérico e liquórico. Observou-se uma diminuição da conectividade envolvendo citocinas pró-inflamatórias e um aumento das correlações que compreendem citocinas reguladoras no compartimento sérico da COVID-19 aguda para a convalescente. Por outro lado, o aumento da frequência de correlações envolvendo mediadores pró-inflamatórios com um envolvimento diminuído de citocinas reguladoras foi a marca registrada do microambiente do LCR de COVID-19 agudo a convalescente, demonstrado na Figura 11C.

Figura 11A, B e C – Resumo das alterações nos mediadores imunológicos solúveis em amostras de soro e líquido cefalorraquidiano de parturientes com COVID-19 aguda ou convalescente incluídas no estudo PROUDEST



Fonte: elaborado pela autora

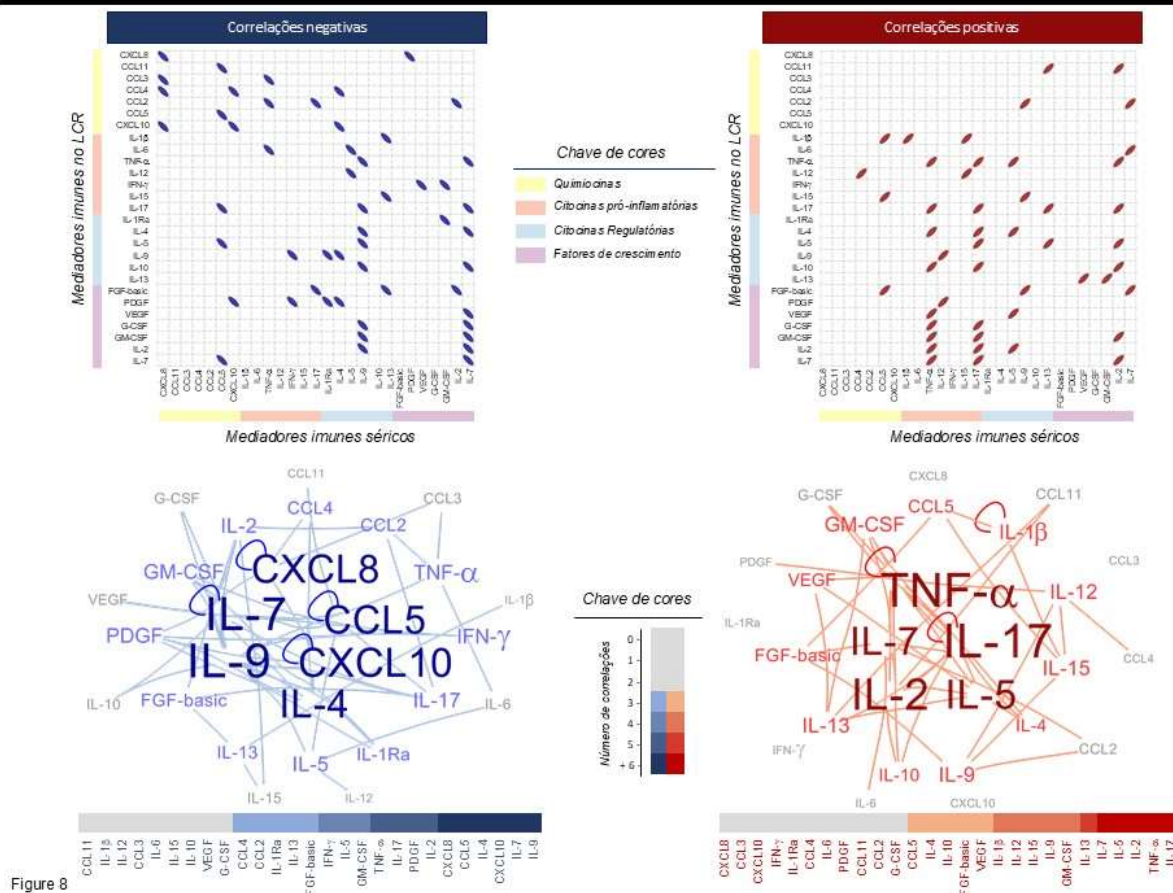
Uma imagem instantânea de (A) as concentrações gerais, (B) assinaturas de mediadores imunológicos e (C) circuitos integrativos de mediadores imunes solúveis (quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento) foi composto para amostras de soro e líquido cefalorraquidiano (LCR) coletadas de parturientes com infecção aguda por SARS-CoV-2 até 14 dias após os sintomas (Agudo = ■, soro = 21; LCR = 8) ou parturientes convalescentes de COVID-19 com infecção prévia por SARS-CoV-2, referidas como: Precoc (■, soro = 31; LCR = 18), Intermediário (Inter; ■, soro = 53; LCR = 11) e tardio (■, soro = 41; LCR = 22) em comparação com parturientes controles saudáveis (HC = ■, soro = 9; LCR = 6). Para resumir as principais mudanças observadas na concentração geral de mediadores solúveis nos compartimentos sérico e líquórico, foi aplicada a normalização dos escores Z e construídos mapas de cores para calcular o número de mediadores solúveis com escore Z ≥ 5 em cada compartimento. Os resultados são apresentados em gráficos de linhas para ilustrar a análise comparativa entre os subgrupos. As assinaturas dos mediadores imunes foram compiladas para permitir comparações entre os conjuntos de mediadores solúveis com níveis aumentados nas amostras de soro e LCR de cada subgrupo. Os gráficos de linhas ilustram o ritmo dos mediadores solúveis observados no soro e no LCR entre os subgrupos. Os circuitos integrativos foram comparados considerando a frequência de correlações dentro de cada cluster de rede (quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento). Os gráficos de pirulito ilustram a análise comparativa das frequências de correlação entre os subgrupos.

6.3.8 Nuvens de correlação de mediadores imunes solúveis em amostras de soro e líquido cefalorraquidiano de parturientes com fases agudas ou convalescentes de COVID-19

Com o objetivo de identificar os conjuntos de mediadores imunológicos que conduzem o padrão dicotômico observado no soro e no LCR, foi realizada uma análise de correlograma usando os valores medianos detectados da infecção aguda por SARS-CoV-2 em direção às fases convalescentes da COVID-19 (Precoce, Intermediária e Tardia). As nuvens de correlação cruzada foram projetadas para destacar os conjuntos de mediadores imunológicos envolvidos em correções negativas ou positivas. Os resultados são apresentados na Figura 12. No geral, fortes correlações (escores "r" variando de 0,91 a 1,00) foram observadas entre os mediadores imunes séricos e do LCR. A análise dos dados demonstrou que a IL-7 estava envolvida em um perfil equilibrado de correlações negativas e positivas. Por outro lado, IL-5, IL-2, TNF- α e IL-17 foram associados a correlações positivas e, portanto, não contribuíram efetivamente para direcionar os perfis dicotômicos do soro e do LCR. Digno de nota, os resultados apontaram que CXCL8, CCL5, IL-4, CXCL10 e IL-9 compuseram o conjunto de mediadores imunes com alto número de correlações negativas (+6), representando as moléculas mais relevantes que impulsionam os perfis dicotômicos observados entre os compartimentos sérico e líquórico (Figura 12). Esses biomarcadores imunológicos podem representar alvos potenciais para estratégias terapêuticas em parturientes com COVID-19.

Figura 12 – Nuvens de correlação de mediadores imunes solúveis em amostras de soro e líquido cefalorraquidiano de parturientes com COVID-19 aguda ou convalescente incluídas no estudo PROUDEST

Nuvens de correlação de mediadores imunes em amostras de soro e líquido cefalorraquidiano de parturientes com COVID-19 aguda ou convalescente



Fonte: elaborado pela autora

Mapas de correlação cruzada foram montados para compilar os correlogramas de mediadores imunes solúveis a partir de amostras de soro e líquido cefalorraquidiano coletadas de parturientes com infecção aguda por SARS-CoV-2 até 14 dias após o início dos sintomas (aguda, $n = 8$) ou parturientes convalescentes por COVID-19 com infecção prévia por SARS-CoV-2, referidas como subgrupos precoce ($n = 18$), intermediário ($n = 11$) ou tardio ($n = 22$). Os níveis de mediadores imunes solúveis foram quantificados por matriz multiplex de microesferas de alto rendimento. Os correlogramas foram construídos com base na análise de correlação (testes de Spearman) entre pares de mediadores imunes medidos em amostras de soro e LCR. Correlações significativas ($p < 0,05$) foram empregadas para construir mapas de correlogramas baseados em glifos em forma de elipse para correlação negativa (■) ou positiva (●) usando o pacote "corrplot" do software R (*Project for Statistical Computing Version 3.0.1*). O número de correlações foi usado para projetar nuvens excêntricas usando a plataforma de software de código aberto Cytoscape (disponível em <https://cytoscape.org>). Três conjuntos de mediadores imunes foram organizados com base no número de correlações (0-2 anel externo; 3-5 anel intermediário e +6 = cluster interno) de acordo com a chave de cores fornecida na figura.

7 DISCUSSÃO

7.1 Contexto epidemiológico das variantes do SARS-COV-2 no período do estudo

Nosso estudo — que recrutou pacientes entre maio de 2020 e maio de 2021 — foi conduzido em um período caracterizado pela circulação simultânea de múltiplas linhagens do SARS-CoV-2 no Brasil (10,12,82–84).

No início desse período, predominaram as linhagens B.1.1.28 e B.1.1.33 e, no final de 2020, emergiu a VOI Zeta (P.2), seguida pela VOC Gama (P.1), detectada pela primeira vez em Manaus (Brasil), e que se tornou a variante dominante durante a segunda onda no início de 2021. Em maio de 2021, a VOC Alpha (B.1.1.7) também estava presente, embora com circulação mais limitada. Essas variantes apresentavam mutações distintas, especialmente na proteína spike, associadas a maior transmissibilidade, redução da neutralização por anticorpos previamente existentes e, em alguns casos, a quadros clínicos de maior gravidade (83–85).

Há evidências de que os desfechos maternos e neonatais foram piores durante a onda da variante Delta da pandemia de SARS-CoV-2, em comparação aos períodos anteriores, contudo o nosso estudo incluiu majoritariamente gestantes infectadas por variantes Alpha ou pré-Delta com a maior parte dos partos realizados entre julho de 2020 a março de 2021 (86–88).

7.2 Sintomas associados à COVID-19

Na revisão sistemática do PregCOV-19, tosse e febre foram os sintomas mais comuns de COVID-19 em mulheres grávidas, enquanto dispneia, mialgia, ageusia e diarreia foram menos comuns (55)O estudo PRIORITY revelou que tosse, dor de garganta, mialgia e febre foram os sintomas iniciais mais prevalentes em gestantes infectadas (89).

Em nosso estudo, diferentes sintomas de COVID-19 foram observados nas gestantes estudadas variando de acordo com o trimestre em que ocorreu a infecção e a gravidade da doença. Anosmia, coriza e/ou congestão nasal, cefaleia, ageusia e mialgia foram os sintomas mais comuns relatados durante a fase aguda da COVID-19 e, em geral, foram associados à doença não grave. Febre e dispneia estavam associadas à maior gravidade da doença.

7.3 Taxa de cesárea

Uma metanálise analisou 602 mulheres a partir de 42 estudos publicados majoritariamente do início da pandemia, entre janeiro e maio de 2020, e os resultados mostrou que a estimativa combinada para o parto vaginal foi de apenas 8,07% (IC 95% = 4,39% a 12,74%). Em muitos casos, a infecção por SARS-CoV-2 foi isoladamente utilizada como indicação para a cesárea, mesmo sem deterioração clínica materna ou fetal (90). Tal estudo destacou ainda que a via vaginal não foi associada a piores desfechos e que a indicação de cesariana deve se restringir a critérios obstétricos clássicos ou agravamento do quadro clínico, evitando riscos desnecessários às mulheres e aos recém-nascidos (90).

Fatores como o receio de transmissão vertical, preocupações com complicações respiratórias e o desejo de reduzir a exposição da equipe médica também influenciaram a decisão. No entanto, a escolha pela cesariana não se justificou por diferenças nos desfechos maternos ou neonatais, como mortalidade, admissão em unidade de terapia intensiva ou infecção neonatal (90).

Em nosso estudo, a taxa de cesárea foi de 60,8%, superior à média mensal de parto cesárea no Hospital Universitário de Brasília entre os anos 2015-2020 que é de 43%, mas bem abaixo do elevadíssimo percentual citado na metanálise acima citada (90). Uma possível explicação é o fato de o estudo ter sido conduzido em hospitais universitários, que adotaram, com a avançar da pandemia, as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil, as quais desaconselham a indicação de parto cesárea com base apenas no diagnóstico de COVID-19 (91).

7.4 Resultados clínicos adversos da infecção por SARS-COV-2 nas gestantes e neonatos

Como a gravidez causa alterações mecânicas, fisiológicas e imunológicas no corpo das mulheres, a gestação aumenta potencialmente a suscetibilidade a doenças infecciosas, complicações associadas e resultados adversos, incluindo uma resposta alterada à infecção por SARS-CoV-2 (92–99).

No estudo aqui apresentado, a infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez associou-se a desfechos maternos e neonatais adversos, especialmente entre gestantes no 3º trimestre, naquelas na fase aguda da infecção por SARS-CoV-2 durante o parto e nas que tinham a forma grave ou crítica da doença.

Trabalho de parto prematuro, sofrimento fetal agudo e um escore de Apgar no 1º min de vida do RN ≤ 7 foram associados à fase aguda da COVID-19 no parto e/ou maior severidade da doença, e gestantes infectadas por SARS-CoV-2 no 3º trimestre tiveram maior probabilidade de ter doença grave e crítica.

Outros estudos também sugeriram que a infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez está associada a vários resultados adversos, incluindo parto cesárea, pré-eclâmpsia, parto prematuro, natimorto e baixo peso ao nascer, especialmente entre gestantes com COVID-19 grave, no final da gestação ou com COVID-19 no momento do parto (98,100–107). O Estudo de Coorte Multinacional INTERCOVID, compreendendo 43 centros em 18 países, revelou que a COVID-19 estava associada a riscos aumentados de pré-eclâmpsia/eclâmpsia (1,7 vezes), parto prematuro (1,6 vezes), baixo peso ao nascer (1,5 vezes) e morbidade neonatal grave (2,6 vezes) (54). O registro COVI-PREG revelou riscos aumentados de resultados adversos e maternos, incluindo parto prematuro, necessidade de oxigênio, hospitalização e internação em unidade de terapia intensiva - UTI, em mulheres grávidas infectadas com SARS-CoV-2 (53).

Tais desfechos podem ser explicados por diversos mecanismos subjacentes aos efeitos adversos da infecção por SARS-CoV-2 no feto e na placenta, incluindo problemas relacionados à hipoxia, resposta imune excessiva, inflamação alterada e trombose.

O dano placentário, evidenciado por anormalidades histológicas relacionadas ao SARS-CoV-2, pode comprometer o fluxo sanguíneo fetal e levar à insuficiência placentária. Essas anormalidades, caracterizadas principalmente por deposição significativa de fibrina perivillosa e intervilosite histiocítica crônica, são chamadas de placentite por SARS-CoV-2 e podem ocorrer mesmo sem infecção placentária (108–111). Alterações na interface materno-fetal durante a infecção sistêmica ligadas a uma condição inflamatória na placenta podem servir para proteger a placenta e o feto da infecção; no entanto, essas mudanças também têm o potencial de conduzir a mudanças patológicas com consequências adversas para a prole, como hipoxia e sofrimento fetal (112,113).

Um desfecho materno adverso observado neste estudo de coorte se destacou: diabetes *mellitus* gestacional.

Verificou-se que um número elevado de gestantes infectadas pelo SARS-CoV-2 apresentou DMG (35,8%). Em uma meta-análise de mulheres antes da pandemia de COVID-19 que usou os critérios diagnósticos da *International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group's Criteria* - IADPSG para DMG, a prevalência global de DMG foi de 14,2% (IC 95%: 14,2–14,3%). Em países de renda baixa, média e alta, as taxas de prevalência foram de 14,7% (IC 95%: 12,9-16,7%), 9,9% (IC 95%: 9,0-10,1%) e 14,4% (IC 95%: 14,3-14,4%),

respectivamente, e essas taxas foram muito menores do que as evidenciadas em nosso estudo (114). Outros estudos também relataram um aumento significativo da prevalência de DMG em mulheres grávidas durante a pandemia de COVID-19 (107,115). Estudos sugerem que o SARS-CoV-2 pode desencadear hiperglicemia e diabetes *mellitus* por meio de sua interação com os receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), resultando em danos às células das ilhotas pancreáticas (115). Esse resultado pode aumentar o risco de resultados maternos e perinatais adversos de curto prazo, incluindo distocia de ombro, macrossomia fetal, cesariana, distúrbios hipertensivos, hipoglicemia neonatal e internação de neonatos na unidade de terapia intensiva.

Em nosso estudo, a prevalência de pré-eclâmpsia em mulheres grávidas infectadas com SARS-CoV-2 foi de 6,15%, semelhante ao descrito em estudos de prevalência global (2-8%) (116,117). Outros estudos demonstraram um risco aumentado de pré-eclâmpsia em mulheres grávidas com COVID-19, sugerindo que o SARS-CoV-2 induz efeitos nas células endoteliais via receptor ACE2 e co-receptor TMPRSS2, causando disfunção endotelial, alterando a integridade vascular e levando à hiperinflamação e hipercoagulabilidade - mecanismos imunopatológicos sobrepostos entre COVID-19 e pré-eclâmpsia (57,118). O estudo longitudinal prospectivo INTERCOVID mostrou um aumento da incidência de PE em gestantes com COVID-19 (8,1%), em comparação a gestantes não diagnosticadas (4,4%), especialmente em mulheres nulíparas; a associação parecia ser independente de condições preexistentes e outros fatores de risco, como obesidade, diabetes e hipertensão (54). Em uma metanálise com dados coletados até meados de 2021, a infecção materna por COVID-19 mostrou estar ligada a um aumento de aproximadamente 60% no risco de pré-eclâmpsia (OR 1,6) em comparação a gestantes sem COVID-19 (57).

Observou-se ainda associação estatisticamente significativa entre a gravidade da infecção por SARS-CoV-2 e a classificação do peso do recém-nascido. Especificamente, gestantes com COVID-19 grave tiveram maior frequência de recém-nascidos PIG. De forma inesperada, casos classificados como críticos mostraram associação com recém-nascidos grandes para a idade gestacional - GIG. Essa última associação não encontra respaldo fisiopatológico claro na literatura atual. A presença de recém-nascidos GIG em contextos de doença materna crítica é biologicamente improvável, uma vez que condições associadas à hipoxemia sistêmica, inflamação sistêmica e disfunção placentária — características comuns em casos graves e críticos de COVID-19 — tendem a prejudicar o crescimento fetal, não a promovê-lo. Uma possível explicação para esse achado pode estar relacionada a viés de classificação ou amostragem, dado o número reduzido de casos críticos e potencial efeito do

acaso. Portanto, ainda que o resultado tenha alcançado significância estatística, sua interpretação deve ser feita com cautela, não sendo possível atribuir causalidade direta entre doença crítica e maior peso fetal sem investigação adicional. Mais estudos com amostras maiores e controle rigoroso de fatores de confusão são necessários para esclarecer essa associação.

7.5 Impacto da COVID-19 na mortalidade materna

No presente estudo, que incluiu apenas gestantes não vacinadas, a taxa de mortalidade referente à circulação das cepas SARS-CoV-2 B.1.1.28 e B.1.1.33 (variante Alpha) foi de 0,7% (2 em 260 mulheres); óbitos ocorridos exclusivamente no puerpério. Se considerarmos apenas as participantes com doença grave e crítica (36 das 260 gestantes), a taxa de mortalidade foi de 5,55% (2 de 36 mulheres).

A infecção por SARS-CoV-2 durante a gestação foi associada a um aumento significativo da mortalidade materna em diversos contextos globais. No Brasil, esse impacto foi particularmente severo: a taxa de mortalidade materna por COVID-19 elevou-se de 5% em 2020, para 10% em 2021, com posterior redução após o início da vacinação em gestantes em abril de 2021 (51,119–122).

Um estudo conduzido por Takemoto *et al.* evidenciou a gravidade do impacto da COVID-19 sobre a mortalidade materna no Brasil já nos primeiros meses da pandemia. Entre fevereiro e junho de 2020, foram registrados 978 casos de gestantes e puérperas com síndrome respiratória aguda grave - SRAG associada à COVID-19, dos quais 124 evoluíram para óbito — uma taxa alarmante de mortalidade de 12,7%, consideravelmente superior à média global descrita na literatura. O estudo apontou ainda que mais de 20% das mulheres que faleceram não foram admitidas em unidades de terapia intensiva - UTI e 14,6% não receberam qualquer suporte ventilatório, sugerindo falhas críticas no acesso a cuidados intensivos. A mortalidade foi mais elevada entre puérperas do que gestantes (86). Outro estudo de coorte retrospectivo com 1.386 gestantes brasileiras revelou que a infecção na gravidez aumentou em mais de 18 vezes o risco de morte materna (RR 18,73; IC 95%: 11,07–31,69) (87).

Diferenças marcantes foram observadas entre países de alta renda e países de baixa e média renda. Uma revisão sistemática envolvendo 10.582 gestantes com COVID-19 demonstrou que mulheres em países de baixa renda apresentaram riscos significativamente maiores de aborto (OR 6,2; IC 95%: 3,43–12,44), óbito materno (OR 7,8; IC 95%: 4,90–13,16) e natimortalidade (OR 2,0; IC 95%: 1,17–3,57), além de infecção neonatal (OR 1,8; IC 95%:

1,33–2,59) e pneumonia neonatal (OR 7,5; IC 95%: 3,16–21,80), quando comparadas às de maior renda (123).

Dentre os fatores contribuintes, destaca-se que a pandemia interrompeu o acesso a serviços essenciais de saúde materno-infantil nos países de baixa renda, como demonstrado por uma revisão que incluiu 45 estudos de 28 países. Foram observadas reduções nas consultas pré e pós-natais, nos atendimentos de planejamento familiar e nos níveis de vacinação infantil, além de aumento nos óbitos neonatais precoces. Esses impactos foram exacerbados por barreiras estruturais, medo da contaminação, escassez de profissionais e insumos, e dificuldades econômicas e logísticas (124).

Uma revisão sistemática global, com 169 estudos e mais de 319 mil gestantes infectadas por SARS-CoV-2, estimou uma taxa de mortalidade materna de 0,87% (IC 95%: 0,64%–1,16%), com ampla variação geográfica. A análise de sensibilidade mostrou variações dependente da metodologia dos estudos: 0,70% em estudos prospectivos e 2,00% em registros populacionais. As maiores taxas foram observadas na África Subsaariana (3,48%) e na América Latina e Caribe (3,16%), e as menores na América do Norte (0,22%) e em países de alta renda (0,19%). A grande maioria dos óbitos (98,6%) foi diretamente atribuída à COVID-19, reforçando o papel da infecção viral como causa de mortalidade materna nesse período. (125)

Esses achados destacam a necessidade de estratégias globais e locais para mitigar riscos, como a priorização da vacinação, o acesso oportuno a tratamentos eficazes e o fortalecimento dos sistemas de saúde materna, sobretudo em contextos de maior vulnerabilidade socioeconômica.

7.6 Manifestações neurológicas associadas à COVID-19: investigação da presença do vírus SARS-COV-2 no líquido cefalorraquidiano

Em geral, o sistema nervoso central - SNC é considerado um local imunoprivilegiado com interações neuroimunes complexas que ocorrem durante condições homeostáticas e patológicas (126).

Diversos estudos apontam que manifestações neurológicas ocorrem em até 35% dos pacientes hospitalizados por COVID-19, entretanto, o mecanismo fisiopatológico das condições neurológicas associadas ao COVID-19 ainda não é totalmente conhecido (27,66,127). Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar como o SARS-CoV-2 poderia acessar o sistema nervoso central (SNC), incluindo a migração transcelular mediada pelo receptor ACE2, a passagem paracelular através do endotélio vascular, a infecção de células

capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), ou ainda, a progressão direta via nervo olfatório e placa cribriforme (128). Alterações pré-existentes no SNC também poderiam comprometer a integridade da BHE, favorecendo a entrada viral (129).

Entretanto, apesar dessas hipóteses, a detecção do RNA viral no líquido cefalorraquidiano (LCR) tem sido raríssima em pacientes com COVID-19. Em uma metanálise que avaliou 339 pacientes com resultados disponíveis de PCR para SARS-CoV-2 no LCR, apenas três apresentaram positividade, reforçando a hipótese de que a invasão direta do SNC pelo vírus não seja o principal mecanismo responsável pelas manifestações neurológicas (68).

O estudo aqui apresentado avaliou gestantes com sintomas neurológicos nas fases iniciais da COVID-19, com coletas de LCR entre o 4º e o 18º dia após o início dos sintomas. Em todas as amostras, o PCR para SARS-CoV-2 no LCR foi negativo (67). Sugere-se, portanto, que os sintomas neurológicos observados — como cefaleia, anosmia e disgeusia — são mais provavelmente secundários à resposta inflamatória sistêmica do que à invasão viral direta do SNC. A anosmia, por exemplo, tende a ser transitória, com recuperação rápida, o que é incompatível com danos neuronais diretos, e parece estar relacionada a lesões no epitélio olfatório, onde há expressão de ACE2 nas células sustentaculares, mas não nos neurônios sensoriais (128).

Evidências crescentes apontam para um mecanismo imunomediado, com consequente neuroinflamação, como a principal via fisiopatológica das manifestações neurológicas da COVID-19 e apontam alterações consistentes nos perfis de citocinas no LCR de pacientes com COVID-19, mesmo na ausência de detecção viral. (127,130–132).

Na coorte prospectiva aqui apresentada, a investigação da presença do SARS-CoV-2 no líquido cefalorraquidiano (LCR) foi realizada ainda no início da pandemia, período em que a detecção do vírus nesse compartimento permanecia incerta e controversa. Até então, os estudos com análise de LCR restringiam-se, em sua maioria, a pacientes em estágios mais avançados da doença, considerando que manifestações neurológicas graves costumam se manifestar tardiamente. A realização da punção lombar para anestesia raquidiana durante a cesariana representou uma oportunidade única para avaliar a presença do vírus no LCR na fase aguda da infecção. O resultado negativo da pesquisa viral motivou, posteriormente, uma análise aprofundada dos marcadores imunológicos nesse compartimento. Os achados obtidos sustentam a compreensão atual de que os efeitos neurológicos associados à COVID-19 são predominantemente mediados por mecanismos imunes, e não pela ação citopática direta do vírus no sistema nervoso central.

7.7 Análise do perfil imunológico de parturientes acometidas por SARS-COV-2 na gestação

A gravidez compreende uma condição imunológica única associada a um estado pró e anti-inflamatório distinto (60). As alterações fisiológicas durante a gravidez têm efeitos significativos no sistema imunológico e a COVID-19 durante a gravidez desencadeia uma resposta imune desequilibrada que pode contribuir para complicações tardias na fase pós-sintomática da doença (65).

No presente estudo, realizamos uma caracterização aprofundada do perfil de mediadores imunológicos em amostras de soro e LCR de parturientes com COVID-19, abrangendo o espectro de estágios agudos e convalescentes da infecção adquirida em trimestres gestacionais distintos. Abordagens distintas de mineração de dados foram empregadas para obter um retrato instantâneo dos microambientes sistêmicos e compartimentados associados aos estágios agudos e convalescentes do COVID-19. Nossos dados mostraram um perfil dicotômico geral de quimiocinas entre os microambientes sérico e líquórico. As parturientes com infecção aguda e convalescente por SARS-CoV-2 exibiram padrões distintos de mediadores imunológicos no soro e no LCR.

Notavelmente, nossos resultados evidenciaram uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada — com perfil compatível com uma “tempestade de citocinas” — nas amostras de soro do grupo Agudo de parturientes com COVID-19, em concordância com achados prévios (19,62) Os níveis elevados de mediadores inflamatórios observados na fase aguda apresentaram um declínio progressivo ao longo da convalescença, refletindo a resolução da resposta imune inicial. No entanto, ainda são escassas as informações sobre as alterações longitudinais desses parâmetros imunológicos em gestantes com COVID-19.

Uma possível hipótese é que a diminuição dos mediadores solúveis possa representar o estabelecimento de mecanismos regulatórios mediados pelos componentes anti-inflamatórios do sistema imunológico durante a gravidez (133). Um estudo anterior realizado com amostras do estudo PROUDEST mostrou que a infecção por SARS-CoV-2 adquirida no 1º trimestre da gravidez levou a níveis mais baixos de mediadores solúveis em comparação a infecções adquiridas no 3º trimestre da gravidez (65). Este cenário distinto pode potencialmente impactar o declínio observado desde a fase de convalescença precoce - infecção adquirida no 3º trimestre - até a fase de convalescença tardia da COVID-19 - resultante de infecções adquiridas durante o 1º trimestre de gravidez.

Em contraste com o perfil observado nas amostras de soro, notamos um aumento

progressivo de mediadores solúveis no LCR desde a infecção aguda até a COVID-19 convalescente. Esse fenômeno pode representar uma consequência da disfunção endotelial devido à ativação imunológica persistente. A infecção por COVID-19 pode causar complicações extrapulmonares que persistem após a recuperação, incluindo déficits neurológicos devido a complicações vasculares mediadas pelo excesso de citocinas pró-inflamatórias (65).

No presente estudo, não investigamos biomarcadores associados ao dano às células endoteliais nem monitoramos o estado neurológico das parturientes ou de seus filhos ao longo do tempo. Outros estudos sugerem que a infecção materna por SARS-CoV-2 durante a gravidez pode afetar o desenvolvimento do cérebro da prole, particularmente em regiões cerebrais relacionadas à linguagem e comunicação social (134). Nosso grupo de pesquisa publicou um estudo derivado da coorte PROUDEST, no qual avaliamos, por meio de neuroimagem, recém-nascidos de parturientes incluídas no estudo. O objetivo foi monitorar alterações cerebrais pediátricas associadas à infecção materna por SARS-CoV-2, tanto em sua fase aguda quanto convalescente, adquirida em diferentes trimestres gestacionais (135).

A análise de neuroimagem incluiu dados morfométricos, hemodinâmicos e de elasticidade do tecido cerebral obtidos por meio de ultrassonografia de alta frequência, englobando imagens em escala de cinza craniana, estudos de Doppler colorido e espectral, além de elastografia cerebral baseada em ultrassom, com avaliação de regiões específicas de interesse: substância branca superficial e profunda, substância cinzenta cortical, corpo caloso e gânglios da base. A infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez foi associada a alterações encefálicas em uma proporção relevante de recém-nascidos, especialmente quando a infecção materna foi adquirida no período periparto (até 14 dias do início dos sintomas no parto). Os achados de neuroimagem mostraram que a infecção materna estava relacionada ao envolvimento predominante da substância branca profunda cerebral, com hiperecogenicidade regional e redução dos coeficientes de elasticidade, sugerindo um comprometimento regional na integridade ou na quantidade de mielina cerebral.

As principais alterações foram observadas quando as infecções maternas por SARS-CoV-2 ocorreram nos últimos 14 dias de gestação (135). Os presentes achados mostraram que as parturientes durante a infecção aguda e convalescente precoce apresentaram níveis mais elevados de mediadores imunes séricos. Nesta linha, levantamos a hipótese de que o amplo conjunto de mediadores imunológicos aumentado na infecção aguda por SARS-CoV-2, levando a um estado hiperinflamatório sistêmico, pode estar associado a um prejuízo no neurodesenvolvimento em descendentes após a infecção materna por SARS-CoV-2.

Como parte do protocolo PROUDEST, também houve a oportunidade de quantificar os níveis de mediadores solúveis em amostras de soro materno pareado a sangue do cordão umbilical dos mesmos neonatos nascidos de parturientes inscritas na presente investigação. Embora não se acredite que ocorra transferência transplacentária de mediadores solúveis maternos em humanos, o microambiente imunológico materno pode interferir no perfil do neonato. Esta declaração de hipótese direcionou o curso de um estudo e a exploração de dados que estão atualmente em processo de publicação.

A análise das assinaturas dos mediadores imunes e dos circuitos de correlação integrativa também reforçaram os perfis distintos observados entre as amostras de soro e LCR. Esses perfis dicotômicos sugeriram uma impressionante falta de semelhanças entre o soro e o LCR, sugerindo que os biomarcadores imunológicos sistêmicos podem não refletir o estado imunológico do SNC, reforçando a relevância dos estudos de microambientes compartimentados. Nesse cenário divergente, mapas de correlograma e análise de nuvens de correlação apontaram um conjunto de moléculas que supostamente impulsionam os perfis dicotômicos entre soro e LCR, incluindo quimiocinas (CXCL8, CCL5, CXCL10) e citocinas reguladoras (IL-4 e IL-9). Essas moléculas podem representar biomarcadores subjacentes ao *crosstalk* entre soro e LCR e podem ter implicações importantes para futuras propostas terapêuticas para cenários agudos e convalescentes de COVID-19 em parturientes.

A amostragem paralela de sangue periférico e líquido cefalorraquidiano representa uma abordagem única para medir perfis de biomarcadores compartimentados e permite a análise comparativa de padrões comuns e seletivos identificados em amostras de soro e LCR. Poucos relatos se concentraram na análise paralela de perfis imunológicos no soro e no LCR durante a infecção por SARS-CoV-2 (68,127,130,131,136,137). Além disso, há falta de informações sobre os mediadores inflamatórios no soro e no LCR de gestantes ou parturientes afetadas pela COVID-19. A maioria dos estudos foi realizada na população em geral e se concentrou particularmente na ocorrência de COVID longa ou nas manifestações neurológicas tardias pós-infecção aguda (138–140).

De fato, a resposta imune sistêmica exacerbada desencadeada pela infecção por SARS-CoV-2 pode contribuir para a lesão do sistema nervoso central durante a infecção aguda ou disfunção neurológica tardia (27). Foi proposto que as barreiras disfuncionais do SNC, incluindo a barreira hematoencefálica e a barreira hematoencefálica, "abrem a porta" para a interferência entre o sistema imunológico nervoso periférico e central e também são reguladas pelo ambiente inflamatório (129).

Estudos prévios encontraram níveis elevados de CXCL8 e IL-6 no soro e no LCR de

pacientes com neuro-COVID (136). Especificamente, enquanto níveis elevados de CCL2 são identificados exclusivamente no LCR, níveis aumentados de CXCL10, CCL9, IL-1Ra e IL-10 ocorrem seletivamente em amostras de soro. Esses achados lançam luz sobre a intrincada interação da interface entre soro e LCR de pacientes neuro-COVID durante a infecção aguda e ressaltam a importância de caracterizar os perfis sistêmicos e compartimentados do LCR associados às manifestações neurológicas do COVID-19 (68).

Uma revisão sistemática abrangente da resposta imune compartimentada do LCR indicou que, entre os marcadores investigados, surgiram observações impressionantes, apontando que CXCL8, CXCL2, CXCL10, IL-6, IL-10, IL-2, IL-4, IL-18 estão elevados no SNC de pacientes com manifestação neurológica associada à COVID-19. Não obstante, concluiu que ainda não é possível definir os mecanismos precisos envolvidos na lesão neuronal e na geração de sintomas neurológicos (68). Outros estudos sugeriram que a ativação imunológica, possivelmente desencadeada por danos e reparos vasculares contínuos, pode desempenhar um papel nas consequências a longo prazo das alterações cognitivas associadas ao COVID-19 (138,139,141).

Durante a fase pós-aguda, marcadores inflamatórios como CXCL10, IL-6 e TNF- α têm sido associados a sintomas persistentes de COVID-19 e desempenham um papel na interferência neuroimune associada a efeitos neuropsiquiátricos duradouros de COVID-19 (138). No entanto, os dados sobre a conexão entre biomarcadores de ativação imunológica, lesão neurológica e sintomas neurológicos durante a fase pós-aguda ainda são limitados (142).

O comprometimento neurológico é uma das sequelas mais frequentes experimentadas por pacientes com COVID longo, na qual sintomas semelhantes aos da COVID-19 persistem ou se desenvolvem após a infecção aguda (143). De fato, a “névoa cerebral” é uma condição pós-COVID-19 que não pode ser explicada por um diagnóstico alternativo, em vez disso, é um termo abrangente para a ampla gama de consequências para a saúde física e mental experimentadas por alguns pacientes após a infecção por SARS-CoV-2 (143). Foi proposto que uma “assinatura inflamatória” no LCR pode estar associada à névoa cerebral persistente observada mais tardiamente em relação aos primeiros sintomas da COVID-19. Pacientes com sintomas cognitivos persistentes após COVID-19 leve apresentaram níveis mais altos de marcadores inflamatórios no LCR em comparação com controles cognitivos recuperados da infecção por SARS-CoV-2 (132). Os mecanismos associados ao fenômeno da névoa cerebral são desconhecidos e mais investigações são necessárias para conectar as respostas imunes periféricas e nervosas centrais. Além disso, ainda não está claro quais mediadores imunes séricos ou do LCR estão relacionados a mecanismos relacionados à COVID longa ou podem

representar biomarcadores prognósticos relevantes da gravidade da doença.

Em conjunto, nossos achados revelaram um cenário divergente de mediadores imunes solúveis entre o soro e o líquido cefalorraquidiano, destacando a complexidade das respostas imunes desencadeadas pela infecção por SARS-CoV-2 durante a gestação. A análise paralela dos perfis imunológicos nos compartimentos periférico e central demonstrou uma dicotomia notável entre a atividade aumentada de citocinas no soro durante a fase aguda e a elevação progressiva de mediadores solúveis no LCR na fase convalescente, o que sugere uma intrincada interação entre os ambientes imunológicos sistêmico e do sistema nervoso central. Biomarcadores imunológicos como CXCL8, CCL5, IL-4, CXCL10 e IL-9 apresentaram um perfil dicotômico com correlações negativas significativas entre os compartimentos, o que implica que sua utilização como alvos terapêuticos deve considerar cuidadosamente as particularidades de cada ambiente imunológico. Os níveis elevados de mediadores no soro durante a infecção aguda sugerem um quadro de hiperinflamação sistêmica, enquanto a persistência de mediadores no LCR em estágios tardios da convalescença pode refletir ativação imunológica sustentada no SNC, possivelmente associada a manifestações neurológicas pós-COVID-19.

Dessa forma, torna-se evidente a necessidade de se considerar as respostas imunes compartimentadas na elucidação da fisiopatologia do COVID-19, sobretudo em populações vulneráveis como as gestantes. A incorporação do perfil de biomarcadores imunológicos séricos e líquóricos pode potencialmente orientar práticas clínicas mais precisas e contribuir para a mitigação de desfechos adversos relacionados à neuroinflamação em gestações acometidas pela COVID-19.

Estudos longitudinais adicionais são imprescindíveis para esclarecer os impactos de longo prazo da infecção por SARS-CoV-2 na saúde materna e neonatal, especialmente no que tange ao envolvimento neurológico e às consequências no desenvolvimento infantil. A publicação dos resultados do braço BORN do estudo PROUDEST, que acompanhará os filhos de gestantes infectadas até os cinco anos de idade, certamente trará valiosas contribuições.

8 POSSÍVEIS LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A amostra não incluiu gestantes assintomáticas, uma vez que, no início da pandemia, os testes diagnósticos estavam disponíveis apenas para pacientes sintomáticas, em virtude da escassez de recursos públicos. Além disso, a coleta de dados foi realizada majoritariamente durante a circulação das variantes B.1.1.28 e B.1.1.33 do SARS-CoV-2, o que pode limitar a

generalização dos achados, considerando que diferentes variantes podem induzir distintas manifestações clínicas e respostas imunológicas.

Outra limitação diz respeito ao desenho observacional com comparações múltiplas, sem controle para potenciais variáveis de confusão, como comorbidades, gravidade da infecção, estado nutricional e outras condições clínicas que podem influenciar os níveis de mediadores imunes. Ademais, não foi conduzida uma análise de seguimento das parturientes com o objetivo de identificar possíveis manifestações neurológicas de longo prazo, como a névoa cerebral, frequentemente observada em pacientes com COVID-19 persistente. Essa condição, cuja fisiopatologia permanece parcialmente elucidada, pode estar associada à ruptura da barreira hematoencefálica e à inflamação sistêmica sustentada, fenômenos já descritos em indivíduos com comprometimento cognitivo pós-COVID-19, entretanto ainda não se sabe se essas alterações podem ser antecipadas ou correlacionadas com perfis específicos de biomarcadores imunológicos séricos ou do LCR.

O presente estudo também apresenta importantes fortalezas. Trata-se de uma coorte prospectiva conduzida no contexto inicial da pandemia, período no qual os dados clínicos e epidemiológicos ainda eram escassos. A investigação seguiu um protocolo rigoroso, com exclusão de pacientes com outras infecções concomitantes ou vacinadas contra o SARS-CoV-2, o que reduz a ocorrência de viés de seleção. A coleta sistemática de dados durante os períodos gestacional, periparto e pós-parto, mesmo diante de significativos obstáculos logísticos, conferiu robustez e qualidade ao banco de dados analisado.

Uma contribuição peculiar deste estudo foi ter analisado os efeitos da COVID-19 em 65 amostras de LCR de mulheres grávidas, o maior número publicado nesse grupo populacional até o presente momento. A descrição de um padrão específico de resposta imunológica, divergente do observado no soro, foi um achado inédito no estudo dos efeitos da infecção por SARS-CoV-2 na gestação.

9 CONCLUSÃO

A realização de estudos de coorte durante o início da pandemia de COVID-19 enfrentou diversos desafios metodológicos, éticos e operacionais. O caráter emergencial da crise sanitária exigia respostas rápidas, o que favoreceu inicialmente a predominância de estudos observacionais retrospectivos, relatos de caso e séries de casos com amostras pequenas e sem controle adequado de viés. A ausência de protocolos previamente estruturados e a sobrecarga dos sistemas de saúde dificultavam a padronização e a continuidade da coleta de dados prospectivos. Além disso, havia incertezas quanto aos riscos da infecção pelo SARS-CoV-2 em populações vulneráveis, como gestantes, o que gerava hesitação na inclusão dessas mulheres em estudos clínicos e demandava rigorosos cuidados éticos.

Adicionalmente, o receio por parte das equipes de saúde em atender pacientes infectadas por SARS-CoV-2, motivado pelo medo de contaminação e agravado pela escassez inicial de equipamentos de proteção individual, impôs obstáculos adicionais ao acolhimento, abordagem clínica e realização de exames complementares. Tal contexto exigiu o estabelecimento de protocolos rígidos de biossegurança, com intensificação das medidas de higiene e adaptação dos fluxos de atendimento para garantir a proteção de profissionais e participantes.

As restrições logísticas impostas pelas medidas de distanciamento social e isolamento também dificultavam o recrutamento e o seguimento presencial das participantes, exigindo adaptações por parte das pacientes e equipe de pesquisa.

Mesmo frente a essas limitações, o desenvolvimento de estudos prospectivos como o PROUDEST foi fundamental para gerar evidências mais sólidas e confiáveis sobre os efeitos da infecção ao longo da gestação e seus desfechos maternos, perinatais e infantis.

Os achados deste estudo evidenciam que a infecção por SARS-CoV-2 durante a gestação constitui um fator de risco importante para desfechos obstétricos e neonatais adversos, com impacto mais acentuado em gestantes infectadas no terceiro trimestre, na fase aguda da doença ao parto ou que evoluíram com quadros graves e críticos.

Complementariamente, nossos resultados evidenciaram ausência de cópias virais do SARS-CoV-2 no líquido cefalorraquidiano de gestantes acometidas por COVID-19, além de perfis contrastantes de mediadores imunológicos nos compartimentos sistêmico e neurológico, refletindo a complexidade da resposta imune materna frente ao vírus. A avaliação simultânea de marcadores no soro e no líquido cefalorraquidiano revelou uma diferenciação marcante: enquanto a fase aguda foi caracterizada por níveis elevados de citocinas no sangue periférico, a fase convalescente demonstrou incremento progressivo de mediadores inflamatórios no LCR.

Essa dualidade aponta para uma comunicação dinâmica e especializada entre os sistemas imune periférico e central, reforçando a necessidade de estratégias diagnósticas e terapêuticas que considerem as especificidades de cada compartimento fisiológico.

Tais resultados reforçam a necessidade de reconhecimento da gestante como grupo prioritário para ações de prevenção e cuidado, sobretudo em cenários de alta circulação viral. Ao identificar subgrupos mais vulneráveis, associar fatores clínicos à gravidade dos desfechos e avaliar mecanismos imunológicos envolvidos na infecção por SARS-CoV-2 durante a gestação, este estudo contribui de forma relevante para o aperfeiçoamento das estratégias de vigilância, manejo clínico e políticas de saúde direcionadas à população obstétrica.

10 PERSPECTIVAS

Considerando as especificidades do cenário pandêmico e o perfil das variantes do SRAS-CoV-2 em circulação, os achados aqui apresentados são relevantes para a compreensão dos desfechos obstétricos e neonatais associados à infecção por SARS-CoV-2.

Entretanto, diante da natureza dinâmica da pandemia, com o surgimento contínuo de novas variantes e lacunas na cobertura vacinal global entre gestantes, torna-se imperativo o investimento contínuo em sistemas de vigilância epidemiológica e em estudos multicêntricos prospectivos com acompanhamento a longo prazo que permitam acompanhar a evolução dos riscos maternos e perinatais.

A continuidade dessas investigações é essencial para a avaliação dos possíveis efeitos diretos da infecção viral ou da resposta inflamatória materna sobre o desenvolvimento fetal e neonatal, assim como o monitoramento longitudinal dos recém-nascidos para avaliação do impacto no neurodesenvolvimento. Nos anos vindouros, os resultados do braço BORN do estudo PROUDEST e de outras coortes prospectivas que continuam acompanhando os filhos de gestantes infectadas certamente trarão mais luzes sobre os efeitos a longo prazo da infecção pelo SARS-COV na gravidez.

11 PRODUÇÃO CIENTÍFICA DO ESTUDO PROUDEST

11.1 Produções científicas relacionadas à defesa da tese

Sasaki, Lizandra Moura Paravidine; Fernandes, Geraldo Magela; Silva, Ângelo Pereira da; Pereira, Yacara Ribeiro; Carvalho, Aleida Oliveira de; Motta, Felipe; Araújo Júnior, David Alves de; Castro, Maria Eduarda Canellas de; Jardim-Santos, Gabriela Profírio; Schulte, Heidi Luise; Siracusa, Clara Correia de; Rabelo, Isadora Pastrana; Monteiro, Pedro Sadi; Zucchi, Fabiola Cristina Ribeiro; Santos Júnior, Agenor de Castro Moreira dos; Costa-Rocha, Ismael Artur; Coelho-Dos-Reis, Jordana Graziela Alves; Kurizky, Patricia Shu; Tristão, Rosana; Silva, Dayde Lane Mendonça da; Nobrega, Otávio de Toledo; Soares, Alexandre Anderson de Sousa Munhoz; Albuquerque, Cleandro Pires de; Gomes, Ciro Martins; Espindola, Laila Salmen; Martins-Filho, Olindo Assis; Zaconeta, Alberto Moreno; Mota, Licia Maria Henrique da. **Clinical characteristic and outcomes of pregnant women with COVID-19: The PROUDEST prospective cohort study**, *PLOS One*. 2025 Jul 3; 20(7): e0327174 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0327174> (Apêndice A, Qualis Capes Medicina 1 - A1 – Fator de Impacto (FI) 2,9 – 3,3) *Artigo Open Access*

Sasaki, Lizandra Moura Paravidine; Canellas-de-Castro, Maria Eduarda; Fernandes, Geraldo Magela; Motta, Felipe; Júnior, David Alves Araújo; Schulte, Heidi Luise; Jardim-Santos, Gabriela Profírio; Silva, Ângelo Pereira; Carvalho, Aleida Oliveira; Pereira, Yacara Ribeiro; Siracusa, Clara Correia; Rabelo, Isadora Pastrana; Júnior, Agenor de Castro Moreira Santos; Alves, Caroline de Oliveira; Lauand, Lucas; Nery, Rodrigo de Resende; Mendonça-Silva, Dayde Lane; Tristão, Rosana; Jesus, José Alfredo Lacerda; Costa, Karina Nascimento; Castro, Luiz Cláudio Gonçalves; Kurizky, Patricia Shu; Nobrega, Otávio de Toledo; Espindola, Laila Salmen; Coelho-dos-Reis, Jordana Graziela Alves; Brito-de-Sousa, Joaquim Pedro; Costa-Rocha, Ismael Artur; Campi-Azevedo, Ana Carolina; Peruhype-Magalhaes, Vanessa; Teixeira-Carvalho, Andrea; Gomes, Ciro Martins; Albuquerque, Cleandro Pires; Soares, Alexandre Anderson de Sousa Munhoz; Zaconeta, Alberto Moreno; Martins-Filho, Olindo Assis; Mota, Licia Maria Henrique. **Systemic and cerebrospinal fluid immune mediators coordinate a dichotomic microenvironment in parturients with acute or convalescent phases of COVID-19**. *Immunology Letters*. Volume 274, August 2025, 106979 <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2025.106979> (Qualis Capes Medicina 1 – A3 – FI 3,3) *Artigo com acesso restrito*

Sasaki, Lizandra Moura Paravidine; Fernandes, Geraldo Magela; Silva, Ângelo Pereira da; Motta, Felipe; Siracusa, Clara Correia de; Rabelo, Isadora Pastrana; Santos Júnior, Agenor de Castro Moreira dos; França, Paulo Sérgio; Kurizky, Patricia Shu; Tristão, Rosana Maria; Albuquerque, Cleandro Pires de; Gomes, Ciro Martins; Mota, Licia Maria Henrique da; Zaconeta, Alberto Moreno. **Cerebrospinal fluid analysis of pregnant women at early stages of COVID-19**. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, v. 61, n. 4, p. 672-674, Jul. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2022.03.043>. (Apêndice B – Qualis Capes Medicina 1 - B1 – FI 2.2); *Artigo Open Access*

11.2 Produções científicas publicadas relacionadas ao estudo PROUDEST

Fernandes, Geraldo Magela; Motta, Felipe; Sasaki, Lizandra Moura Paravidine; Silva, Ângelo Pereira da; Miranda, Andreza Monforte; Carvalho, Aleida Oliveira de; Gomides, Ana Paula Monteiro; Soares, Alexandre Anderson de Sousa Munhoz; Santos Jr, Agenor de Castro Moreira dos; Alves, Caroline de Oliveira; Gomes, Ciro Martins; Siracusa, Clara Correia de; Araújo Jr, David Alves de; Mendonça-Silva, Dayde Lane; Jesus, José Alfredo Lacerda de; Costa, Karina Nascimento; Castro, Maria Eduarda Canellas de; Kurizky, Patricia Shu; França, Paulo Sérgio; Tristão, Rosana; Pereira, Yacara Ribeiro; Castro, Luiz Cláudio Gonçalves de; Zaconeta, Alberto Moreno; Albuquerque, Cleandro Pires de; Mota, Licia Maria Henrique da. **The Pregnancy Outcomes and Child Development Effects of SARS-CoV-2 Infection Study (PROUDEST): a multicenter prospective cohort study protocol.** *JMIR Research Protocols*, v. 10, n. 4, p. e26477, 20 abr. 2021. DOI: 10.2196/26477(Apêndice C – Qualis Capes Medicina 1 – C – FI 1,4); *Artigo Open Access*

Fernandes, Geraldo Magela; Sasaki, Lizandra Moura Paravidine; Jardim-Santos, Gabriela Profirio; Schulte, Heidi Luise; Motta, Felipe; Da Silva, Ângelo Pereira; Carvalho, Aleida Oliveira de; Pereira, Yacara Ribeiro; Alves, Caroline de Oliveira; Araújo Júnior, David Alves de; Silva, Dayde Lane Mendonça; Costa, Karina Nascimento; Castro, Maria Eduarda Canellas de; Lauand, Lucas; Nery, Rodrigo de Resende; Tristão, Rosana; Kurizky, Patricia Shu; Nóbrega, Otávio de Toledo; Espindola, Laila Salmen; Castro, Luiz Cláudio Gonçalves de; Alpoim, Patrícia Nessleralla; Godoi, Lara Carvalho; Dusse, Luci Maria Sant Ana; Coelho dos Reis, Jordana Graziela Alves; Amaral, Laurence Rodrigues do; Gomes, Matheus de Souza; Bertarini, Pedro Luiz Lima; Brito-De-Sousa, Joaquim Pedro; Rocha, Ismael Artur da Costa; Azevedo, Ana Carolina Campi; Magalhães, Vanessa Peruhype; Carvalho, Andrea Teixeira; Zaconeta, Alberto Moreno; Soares, Alexandre Anderson de Sousa Munhoz; Valim, Valéria; Gomes, Ciro Martins; Albuquerque, Cleandro Pires de; Martins Filho, Olindo Assis; Mota, Licia Maria Henrique da. **Panoramic snapshot of serum soluble mediator interplay in pregnant women with convalescent COVID-19: an exploratory study.** *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1176898, 12 abr. 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1176898. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1176898> (Apêndice D – Qualis Capes Medicina 1 - A2 – FI 5.9); *Artigo Open Access*

Araujo Júnior, David Alves de; Motta, Felipe; Fernandes, Geraldo Magela; Castro, Maria Eduarda Canellas de; Sasaki, Lizandra Moura Paravidine; Luna, Licia Pacheco; Rodrigues, Thalys Sampaio; Kurizky, Patricia Shu; Soares, Alexandre Anderson de Sousa Munhoz; Nobrega, Otavio de Toledo; Espindola, Laila Salmen; Zaconeta, Alberto Moreno; Gomes, Ciro; Martins Filho, Olindo Assis Martins; Albuquerque, Cleandro Pires de; Mota, Licia Maria Henrique da. **Neuroimaging assessment of pediatric cerebral changes associated with SARS-CoV-2 infection during pregnancy.** *Frontiers in Pediatrics*, v. 11, p. 1194114, 24 maio 2023. DOI: 10.3389/fped.2023.1194114. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fped.2023.1194114> (Apêndice E – Qualis Capes Medicina 1 - A2 – FI 2.0); *Artigo Open Access*

11.3 Produções científicas em processo de publicação relacionadas ao estudo PROUDEST

Motta, Felipe; Canellas-de-Castro, Maria Eduarda; Fernandes, Geraldo Magela; Sasaki, Lizandra Paravidine; Júnior, David Alves Araújo; Zaconeta, Alberto Moreno; Silva, Ângelo Pereira da; Gomes, Ciro Martins; Albuquerque, Cleandro Pires de; Costa-Rocha, Ismael Artur; Santos, Janaina Araujo Teixeira; Jesus, José Alfredo Lacerda; Costa, Karina Nascimento; Espindola, Laila Salmen; Mota, Licia Maria Henrique da; Lauand, Lucas; Castro, Luiz Cláudio Gonçalves; Xavier, Marcelo Antônio Pascoal; Nóbrega, Otávio Toledo; Silva, Pabline Cavalcante da; Nery, Rodrigo Resende; Santos, Wanessa Tavares; Tristão, Rosana; Alves, Caroline Oliveira; Martins-Filho, Olindo Assis; Soares, Alexandre Anderson de Sousa Munhoz. **Neuropsychomotor development of children exposed in utero to SARS-CoV-2 during COVID-19 pandemic period, Biomedicines** (Qualis Capes Medicina 1 – A2 – Fator de Impacto – 3,9 – 4,2)

Canellas-de-Castro, Maria Eduarda; Sasaki, Lizandra Moura Paravidine; Fernandes, Geraldo Magela; Motta, Felipe; Junior, David Alves de Araujo; Schulte, Heidi Luise; Silva, Ângelo Pereira da; Alves, Caroline de Oliveira; Tristão, Rosana Maria; Jesus, José Alfredo Lacerda de; Costa, Karina Nascimento; Castro, Luiz Claudio Gonçalves de; Nóbrega, Otávio de Toledo; Espindola, Laila Salmen; Coelho-dos-Reis, Jordana Graziela; Brito-de-Sousa, Joaquim Pedro; Costa-Rocha, Ismael Artur; Miranda, Vitor Hugo Simões; Campi-Azevedo, Ana Carolina; Peruhype-Magalhaes, Vanessa; Teixeira-Carvalho, Andréa; Gomes, Ciro Martins; Zaconeta, Alberto Carlos Moreno; Albuquerque, Cleandro Pires de; Mota, Licia Maria Henrique da; Martins-Filho, Olindo Assis; Soares, Alexandre Anderson de Sousa Munhoz.. **The dialog between mother and newborn: insights from immune mediator crosstalk elicited by antenatal SARS-COV-2 exposure. Front. Immunol. Sec. Viral Immunology. Volume 16 - 2025 | doi: 10.3389/fimmu.2025.1606582** (Qualis Capes Medicina 1 – A2 – Fator de Impacto – 5.9)

12. BIBLIOGRAFIA

1. Shultz JM, Perlin A, Saltzman RG, Espinel Z, Galea S. Pandemic March: 2019 Coronavirus Disease's First Wave Circumnavigates the Globe. *Disaster Med Public Health Prep.* 2020 Oct 16;14(5):e28–32.
2. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.* 2020 Feb 20;382(8):727–33.
3. World Health Organization. WHO. 2020 [cited 2025 Jun 21]. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [Internet]. . Available from: <https://covid19.who.int>
4. World Health Organization. WHO. 2020 [cited 2025 Jun 21]. COVID 19 cases [Internet]. . Available from: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>
5. Ludwig S, Zarbock A. Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. Vol. 131, *Anesthesia and Analgesia*. Lippincott Williams and Wilkins; 2020. p. 93–6.
6. Hasöksüz M, Kiliç S, Saraç F. Coronaviruses and sars-cov-2. Vol. 50, *Turkish Journal of Medical Sciences*. *Turkiye Klinikleri*; 2020. p. 549–56.
7. Ravi V, Saxena S, Panda PS. Basic virology of SARS-CoV 2. *Indian J Med Microbiol.* 2022 Apr;40(2):182–6.
8. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021 Mar 28;19(3):155–70.
9. 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.* 2021 May;154:104831.
10. GISAID Initiative. Tracking of SARS-CoV-2 variants [Internet]. [Internet]. [cited 2025 Apr 20]. Available from: <https://www.gisaid.org/hcov19-variants/>
11. European Centre for Disease Prevention and Control. SARS-CoV-2 variants of concern as of [data] [Internet]. [cited 2025 Apr 20]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>.
12. World Health Organization. WHO. [cited 2025 Jun 21]. Historical working definitions and primary actions for SARS-CoV-2 variants [Internet]. . Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/historical-working-definitions-and-primary-actions-for-sars-cov-2-variants>
13. Zhu Y, Sharma L, Chang D. Pathophysiology and clinical management of coronavirus

- disease (COVID-19): a mini-review. *Frontiers in Immunology*. 2023 Aug 14;14:1116131.
14. Mohamadian M, Chiti H, Shoghli A, Biglari S, Parsamanesh N, Esmaeilzadeh A. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *J Gene Med*. 2021 Feb 6;23(2).
 15. Ferrara JL, Abhyankar S, Gilliland DG. Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1. *Transplant Proc*. 1993 Feb;25(1 Pt 2):1216–7.
 16. Wang J, Jiang M, Chen X, Montaner LJ. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *J Leukoc Biol*. 2020 Jul 1;108(1):17–41.
 17. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. Vol. 395, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2020. p. 1033–4.
 18. Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of covid-19. Vol. 12, *Viruses*. MDPI AG; 2020.
 19. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol*. 2021 Jan 30;93(1):250–6.
 20. Li H, Liu L, Zhang D, Xu J, Dai H, Tang N, et al. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. *The Lancet*. 2020 May;395(10235):1517–20.
 21. Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, Nguyen Q, Zhong JC, Turner AJ, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2. Vol. 126, *Circulation Research*. Lippincott Williams and Wilkins; 2020. p. 1456–74.
 22. Ortega-Paz L, Capodanno D, Montalescot G, Angiolillo DJ. Coronavirus disease 2019–associated thrombosis and coagulopathy: Review of the pathophysiological characteristics and implications for antithrombotic management. *J Am Heart Assoc*. 2021 Feb 1;10(3):1–24.
 23. Ruzzenenti G, Maloberti A, Giani V, Biolcati M, Leidi F, Monticelli M, et al. Covid and Cardiovascular Diseases: Direct and Indirect Damages and Future Perspective. Vol. 28, *High Blood Pressure and Cardiovascular Prevention*. Adis; 2021. p. 439–45.
 24. Khreefa Z, Barbier MT, Koksai AR, Love G, Del Valle L. Pathogenesis and Mechanisms of SARS-CoV-2 Infection in the Intestine, Liver, and Pancreas. *Cells*. 2023 Jan 9;12(2):262.
 25. Jansen J, Reimer KC, Nagai JS, Varghese FS, Overheul GJ, de Beer M, et al. SARS-

- CoV-2 infects the human kidney and drives fibrosis in kidney organoids. *Cell Stem Cell*. 2022 Feb 3;29(2):217-231.e8.
26. Selby NM, Forni LG, Laing CM, Horne KL, Evans RD, Lucas BJ, et al. Covid-19 and acute kidney injury in hospital: summary of NICE guidelines. *BMJ*. 2020 May 26;369:m1963
 27. Najjar S, Najjar A, Chong DJ, Pramanik BK, Kirsch C, Kuzniecky RI, et al. Central nervous system complications associated with SARS-CoV-2 infection: integrative concepts of pathophysiology and case reports. *J Neuroinflammation*. 2020 Dec 6;17(1):231.
 28. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. Vol. 20, *Nature Reviews Immunology*. Nature Research; 2020. p. 363–74.
 29. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*. 2020 Jan 23;25(3).
 30. Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG. COVID-19 diagnosis —A review of current methods. *Biosens Bioelectron*. 2021 Jan;172:112752.
 31. Peluso MJ, Takahashi S, Hakim J, Kelly JD, Torres L, Iyer NS, et al. SARS-CoV-2 antibody magnitude and detectability are driven by disease severity, timing, and assay. *Sci Adv*. 2021 Jul 30;7(31).
 32. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F, et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clinical Infectious Diseases*. 2020 Jul 28;71(15):778–85.
 33. Wang H, Li X, Li T, Zhang S, Wang L, Wu X, et al. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2020 Sep 24;39(9):1629–35.
 34. Wang Q, Du Q, Guo B, Mu D, Lu X, Ma Q, et al. A Method To Prevent SARS-CoV-2 IgM False Positives in Gold Immunochromatography and Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *J Clin Microbiol*. 2020 May 26;58(6).
 35. Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, Davenport C, Spijker R, Taylor-Phillips S, et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2020 Jun 25;2020(6).
 36. Lawandi A, Danner RL. Antibody tests have higher sensitivity at ≥ 15 days after symptom onset and 99% specificity for detecting SARS-CoV-2. *Ann Intern Med*. 2020

- Nov 17;173(10):JC57.
37. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA*. 2020 Aug 25;324(8):782.
 38. Wang D, Yin Y, Hu C, Liu X, Zhang X, Zhou S, et al. Clinical course and outcome of 107 patients infected with the novel coronavirus, SARS-CoV-2, discharged from two hospitals in Wuhan, China. *Crit Care*. 2020 Dec 30;24(1):188.
 39. Ochani RK, Kumar Ochani R, Asad A, Yasmin F, Shaikh S, Khalid H, et al. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. *Infez Med*. 2021 Mar 1;29(1):20-36.
 40. Zhang J jin, Dong X, Liu G hui, Gao Y dong. Risk and Protective Factors for COVID-19 Morbidity, Severity, and Mortality. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2023 Feb;64(1):90-107.
 41. Turpin A, Semenzato L, Le Vu S, Jabagi MJ, Bouillon K, Drouin J, et al. Risk factors for COVID-19 hospitalization after booster vaccination during the Omicron period: A French nationwide cohort study. *J Infect Public Health*. 2024 Jul;17(7):102450.
 42. Syeda S, Baptiste C, Breslin N, Gyamfi-Bannerman C, Miller R. The clinical course of COVID in pregnancy. *Semin Perinatol*. 2020 Nov 1;44(7).
 43. Schwartz DA. An Analysis of 38 Pregnant Women With COVID-19, Their Newborn Infants, and Maternal-Fetal Transmission of SARS-CoV-2: Maternal Coronavirus Infections and Pregnancy Outcomes. *Arch Pathol Lab Med*. 2020 Jul 1;144(7):799-805
 44. 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*. 2020 May;2(2):100107
 45. Schwartz DA, Graham AL. Potential maternal and infant outcomes from coronavirus 2019-NCOV (SARS-CoV-2) infecting pregnant women: Lessons from SARS, MERS, and other human coronavirus infections. *Viruses*. 2020 Feb 10;12(2):194.
 46. Christian MD, Poutanen SM, Loutfy MR, Muller MP, Low DE. Severe Acute Respiratory Syndrome. *Clinical Infectious Diseases*. 2004 May 15;38(10):1420–7.
 47. Xu J, Zhao S, Teng T, Abdalla AE, Zhu W, Xie L, et al. Systematic Comparison of Two Animal-to-Human Transmitted Human Coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Viruses*. 2020 Feb 22;12(2):244.

48. Wong SF, Chow KM, Leung TN, Ng WF, Ng TK, Shek CC, et al. Pregnancy and perinatal outcomes of women with severe acute respiratory syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Jul;191(1):292–7.
49. Babarinsa IA, Okunoye GO, Odukoya O. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV-1) and Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infections in pregnancy – An overview. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 2021 Aug 1;263:171–5.
50. Alfaraj SH, Al-Tawfiq JA, Memish ZA. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infection during pregnancy: Report of two cases & review of the literature. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2019 Jun;52(3):501–3.
51. SRAG. Síndrome Respiratória Aguda Grave em Gestantes e Puérperas. Observatório Obstétrico Brasileiro. SRAG. Síndrome Respiratória Aguda Grave em Gestantes e Puérperas [Internet]. 2021 [cited 2025 Jun 21]. Available from: https://observatorioobstetrico.shinyapps.io/covid_gesta_puerp_br/
52. Souza RT, Cecatti JG, Pacagnella RC, Ribeiro-Do-Valle CC, Luz AG, Lajos GJ, et al. The COVID-19 pandemic in Brazilian pregnant and postpartum women: results from the REBRACO prospective cohort study. *Sci Rep*. 2022 Dec 1;12(1).
53. Favre G, Maisonneuve E, Pomar L, Daire C, Poncelet C, Quibel T, et al. Maternal and perinatal outcomes following pre-Delta, Delta, and Omicron SARS-CoV-2 variants infection among unvaccinated pregnant women in France and Switzerland: a prospective cohort study using the COVI-PREG registry. *The Lancet Regional Health - Europe*. 2023 Mar 1;26.
54. 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: The INTERCOVID Multinational Cohort Study. *JAMA Pediatr*. 2021 Aug 1;175(8):817-826.
55. Allotey J, Stallings E, Bonet M, Yap M, Chatterjee S, 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. *The BMJ*. 2020 Sep 1;370.
56. Chmielewska B, Barratt I, Townsend R, Kalafat E, van der Meulen J, Gurol-Urganci I, et al. Effects of the COVID-19 pandemic on maternal and perinatal outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2021 Jun 1;9(6):e759–72.
57. Marchand G, Patil AS, Masoud AT, Ware K, King A, Ruther S, et al. Systematic review

- and meta-analysis of COVID-19 maternal and neonatal clinical features and pregnancy outcomes up to June 3, 2021. *AJOG Glob Rep.* 2022 Feb;2(1):100049
58. Smith V, Seo D, Warty R, Payne O, Salih M, Chin KL, et al. Maternal and neonatal outcomes associated with COVID-19 infection: A systematic review. *PLoS One.* 2020 Jun 4;15(6):e0234187.
 59. 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.* 2021 Nov 1;225(5):522.e1-522.e11.
 60. Mor G, Cardenas I. The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. *Am J Reprod Immunol.* 2010 Jun;63(6):425-33.
 61. Monroe JM, Quach HQ, Punia S, Enninga EAL, Fedyshyn Y, Girsch JH, et al. Vertical Transmission of SARS-CoV-2–Specific Antibodies and Cytokine Profiles in Pregnancy. *J Infect Dis.* 2024 Feb 14;229(2):473–84.
 62. Muthuka J, Kiptoo M, Oluoch K, Nzioki JM, Nyamai EM. Association of Pregnancy With Coronavirus Cytokine Storm: Systematic Review and Meta-analysis. *JMIR Pediatr Parent.* 2022 Oct 4;5(4): e31579.
 63. Jardim-Santos GP, Schulte HL, Kurizky PS, Gomes CM, Nóbrega OT, de Gois ET, et al. Unbalanced networks and disturbed kinetics of serum soluble mediators associated with distinct disease outcomes in severe COVID-19 patients. *Front Immunol.* 2022 Nov 14; 13:1004023.
 64. Cabaro S, D’Esposito V, Di Matola T, Sale S, Cennamo M, Terracciano D, et al. Cytokine signature and COVID-19 prediction models in the two waves of pandemics. *Sci Rep.* 2021 Oct 21;11(1):20793.
 65. Fernandes GM, Sasaki LMP, Jardim-Santos GP, Schulte HL, Motta F, da Silva ÂP, et al. Panoramic snapshot of serum soluble mediator interplay in pregnant women with convalescent COVID-19: an exploratory study. *Front Immunol.* 2023 Apr 12;14:1176898.
 66. Etter MM, Martins TA, Kulsvehagen L, Pössnecker E, Duchemin W, Hogan S, et al. Severe Neuro-COVID is associated with peripheral immune signatures, autoimmunity and neurodegeneration: a prospective cross-sectional study. *Nat Commun.* 2022 Nov 9;13(1):6777.
 67. Sasaki LP, Fernandes GM, Silva AP da, Motta F, Siracusa C, Rabelo IP, et al. Cerebrospinal fluid analysis of pregnant women at early stages of COVID-19. *Taiwan J*

- Obstet Gynecol. 2022 Jul;61(4):672–4.
68. Domingues RB, Leite FBV de M, Senne C. Cerebrospinal fluid analysis in patients with COVID-19-associated central nervous system manifestations: a systematic review. *Arq Neuropsiquiatr*. 2022 Mar;80(3):296–305.
 69. 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 Apr 1;10(4).
 70. REBEC. Plataforma Brasileira de Ensaios Clínicos. Registro do estudo PROUDEST [Internet]. [cited 2025 Jun 25]. Available from: <https://ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-65qxs2>
 71. Harvard Dataverse. Repli. Dados do estudo PROUDEST [Internet]. [cited 2025 Jun 25]. Available from: <https://doi.org/10.7910/DVN/GOHQY>
 72. Ang XL, Chonkar SP, Chua MSQ, Sulaiman S, Lee JCS. Problems with Early Systematic Reviews: The Case of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Pregnancy. *Matern Child Health J*. 2021 Jan 1;25(1):38–41.
 73. Sutton D, Fuchs K, D’Alton M, Goffman D. Universal Screening for SARS-CoV-2 in Women Admitted for Delivery. *New England Journal of Medicine*. 2020 May 28;382(22):2163–4.
 74. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos – SINASC [Internet]. [Internet]. [cited 2020 Sep 1]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinasc/cnv/nvdf.def>
 75. Conselho Nacional de Secretarias Municipais de Saúde (CONASS), Ministério da Saúde do Brasil. COVID-19: guia orientador para o enfrentamento da pandemia covid-19 na rede de atenção à saúde [Internet]. 4ª. CONASS, editor. Brasília; 2021 [cited 2024 May 28]. Available from: <https://www.conass.org.br/biblioteca/covid-19-guia-orientador-para-o-enfrentamento-da-pandemia-na-rede-de-atencao-a-saude/>
 76. World Health Organization. COVID-19 Clinical Management: Living Guidance [Internet]. 2021 [cited 2024 May 28]. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/338882>
 77. Wang H, Li N, Chivese T, Werfalli M, Sun H, Yuen L, et al. IDF Diabetes Atlas: Estimation of Global and Regional Gestational Diabetes Mellitus Prevalence for 2021 by International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group’s Criteria. *Diabetes*

- Res Clin Pract. 2022 Jan;183:109050.
78. Fetal Growth Restriction: ACOG Practice Bulletin, Number 227. Obstetrics and Gynecology. 2021 Feb 1;137(2): E16–28.
 79. Silveira M, Barros F, Sclowitz I, Domingues M, Mota D, Fonseca S, et al. Implementation of the INTERGROWTH-21st Project in Brazil. BJOG. 2013 Sep 17;120(s2):81–6.
 80. Agresti A. An introduction to categorical data analysis. In: Hoboken (NJ): John Wiley & Sons. 2nd ed. 2006.
 81. Galan H, Grobman W. ACOG Practice Bulletin No. 204: Fetal Growth Restriction. Vol. 133, Obstetrics and Gynecology. Lippincott Williams and Wilkins; 2019. p. E297–E109.
 82. Flores-Vega VR, Monroy-Molina JV, Jiménez-Hernández LE, Torres AG, Santos-Preciado JI, Rosales-Reyes R. SARS-CoV-2: Evolution and Emergence of New Viral Variants. Viruses. 2022 Mar 22;14(4):653.
 83. Vieira DFB, Bandeira DM, da Silva MAN, de Almeida ALT, Araújo M, Machado AB, et al. Comparative analysis of SARS-CoV-2 variants Alpha (B.1.1.7), Gamma (P.1), Zeta (P.2) and Delta (B.1.617.2) in Vero-E6 cells: ultrastructural characterization of cytopathology and replication kinetics. Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2024 Jan 1;28(1).
 84. Giovanetti M, Slavov SN, Fonseca V, Wilkinson E, Tegally H, Patané JSL, et al. Genomic epidemiology of the SARS-CoV-2 epidemic in Brazil. Nat Microbiol. 2022 Sep 1;7(9):1490–500.
 85. van Dorp L, Acman M, Richard D, Shaw LP, Ford CE, Ormond L, et al. Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2. Infection, Genetics and Evolution. 2020 Sep;83:104351.
 86. Takemoto MLS, Menezes M de O, Andreucci CB, Nakamura-Pereira M, Amorim MMR, Katz L, et al. The tragedy of COVID-19 in Brazil: 124 maternal deaths and counting. International Journal of Gynecology and Obstetrics. 2020 Oct 1;151(1):154–6.
 87. Santos APB dos, Vicente CR, Cola JP, Tanaka LF, Garbin JRT, Antonio LSD, et al. The impact of COVID-19 on maternal death and fetal death, a cohort study in Brazil. PLoS One. 2023 Aug 17;18(8)
 88. Silva T de S, Salvato RS, Gregianini TS, Gomes IA, Pereira EC, de Oliveira E, et al. Molecular characterization of a new SARS-CoV-2 recombinant cluster XAG identified in Brazil. Front Med (Lausanne). 2022 Sep 28;9.
 89. Afshar Y, Gaw SL, Flaherman VJ, Chambers BD, Krakow D, Berghella V, et al. Clinical

- Presentation of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Pregnant and Recently Pregnant People. *Obstetrics & Gynecology*. 2020 Dec;136(6):1117–25.
90. Omar M, Youssef MR, Trinh LN, Attia AS, Elshazli RM, Jardak CL, et al. Excess of cesarean births in pregnant women with COVID-19: A meta-analysis. *Birth*. 2022 Jun 7;49(2):179–93.
 91. Ministério da Saúde do Brasil. Manual de recomendações para a assistência à gestante e puérpera frente à pandemia de COVID-19 [Internet]. 2^a. Ministério da Saúde do Brasil, editor. Brasília; 2021 [cited 2025 May 23]. Available from: <https://www.gov.br/saude>
 92. 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*. 2021 Sep 2;31(5):1–16.
 93. Jamieson DJ, Rasmussen SA. An update on COVID-19 and pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2022 Feb;226(2):177–86.
 94. Grünebaum A, Dudenhausen J, Chervenak FA. Covid and pregnancy in the United States - An update as of August 2022. *J Perinat Med*. 2023 Jan 1;51(1):34–8.
 95. Xu K, Sun W, Yang S, Liu T, Hou N. The impact of COVID-19 infections on pregnancy outcomes in women. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2024 Dec 1;24(1).
 96. Wang CL, Liu YY, Wu CH, Wang CY, Wang CH, Long CY. Impact of covid-19 on pregnancy. *Int J Med Sci*. 2021;18(3):763–7.
 97. 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 Apr 19;193(16): E540–8.
 98. 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. Vol. 27, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2021. p. 36–46.
 99. Gomez UT, Francisco RPV, Baptista FS, Gibelli MABC, Ibidi SM, Carvalho WB de, et al. Impact of SARS-CoV-2 on pregnancy and neonatal outcomes: An open prospective study of pregnant women in Brazil. *Clinics*. 2022 Jan 1;77.
 100. Ghayda RA, Li H, Lee KH, Lee HW, Hong SH, Kwak M, et al. COVID-19 and adverse pregnancy outcome: A systematic review of 104 cases. *J Clin Med*. 2020 Nov 1;9(11).
 101. Jeong Y, Kim MA. The coronavirus disease 2019 infection in pregnancy and adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol Sci*. 2023;66(4):270–89.

102. Smith ER, Oakley E, Grandner GW, Ferguson K, Farooq F, Afshar Y, et al. Adverse maternal, fetal, and newborn outcomes among pregnant women with SARS-CoV-2 infection: An individual participant data meta-analysis. *BMJ Glob Health*. 2023 Jan 16;8(1).
103. Smith ER, Oakley E, Grandner GW, Rukundo G, Farooq F, Ferguson K, et al. Clinical risk factors of adverse outcomes among women with COVID-19 in the pregnancy and postpartum period: a sequential, prospective meta-analysis. Vol. 228, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Elsevier Inc.; 2023. p. 161–77.
104. Huntley BJF, Mulder IA, Di Mascio D, Vintzileos WS, Vintzileos AM, Berghella V, et al. Adverse Pregnancy Outcomes Among Individuals With and Without Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) A Systematic Review and Meta-analysis. *Obstetrics and Gynecology*. 2021 Apr 1;137(4):585–96.
105. Capobianco G, Saderi L, Aliberti S, Mondoni M, Piana A, Dessole F, et al. COVID-19 in pregnant women: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 2020 Sep 1;252:543–58.
106. 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. Vol. 56, *American Journal of Emergency Medicine*. W.B. Saunders; 2022. p. 188–95.
107. Wei SQ, Bilodeau-Bertrand M, Liu S, Auger N. The impact of COVID-19 on pregnancy outcomes: A systematic review and meta-analysis. Vol. 193, *CMAJ. Canadian Medical Association*; 2021. p. E540–8.
108. Wong YP, Khong TY, Tan GC. The effects of covid-19 on placenta and pregnancy: What do we know so far? Vol. 11, *Diagnostics. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*; 2021.
109. Shanes ED, Mithal LB, Otero S, Azad HA, Miller ES, Goldstein JA. Placental Pathology in COVID-19. *Am J Clin Pathol*. 2020 Jun 8;154(1):23–32.
110. Baergen RN, Heller DS. Placental Pathology in Covid-19 Positive Mothers: Preliminary Findings. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2020 Jun 1;23(3):177–80.
111. Aghaamoo S, Ghods K, Rahmanian M. Pregnant women with COVID-19: the placental involvement and consequences. Vol. 52, *Journal of Molecular Histology*. Springer Science and Business Media B.V.; 2021. p. 427–35.
112. Chen J, Du L, Wang F, Shao X, Wang X, Yu W, et al. Cellular and molecular atlas of the placenta from a COVID-19 pregnant woman infected at midgestation highlights the defective impacts on fetal health. *Cell Prolif*. 2022 Apr 1;55(4).

113. Lu-Culligan A, Chavan AR, Vijayakumar P, Irshaid L, Courchaine EM, Milano KM, et al. Maternal respiratory SARS-CoV-2 infection in pregnancy is associated with a robust inflammatory response at the maternal-fetal interface. *Med.* 2021 May;2(5):591-610.e10.
114. Wang H, Li N, Chivese T, Werfalli M, Sun H, Yuen L, Hoegfeldt CA, et al. IDF Diabetes Atlas Committee Hyperglycaemia in Pregnancy Special Interest Group. IDF Diabetes Atlas: Estimation of Global and Regional Gestational Diabetes Mellitus Prevalence for 2021 by International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group's Criteria. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022 Jan;183:109050
115. Ramirez Zegarra R, Dall'Asta A, Revelli A, Ghi T. COVID-19 and Gestational Diabetes: The Role of Nutrition and Pharmacological Intervention in Preventing Adverse Outcomes. Vol. 14, *Nutrients*. MDPI; 2022.
116. ACOG Practice Bulletin No. 202 Summary: Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Obstetrics & Gynecology.* 2019 Jan;133(1):1–1.
117. Poon LC, Shennan A, Hyett JA, Kapur A, Hadar E, Divakar H, et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* 2019 May 1;145(S1):1–33.
118. Agostinis C, Mangogna A, Balduit A, Aghamajidi A, Ricci G, Kishore U, et al. COVID-19, Pre-Eclampsia, and Complement System. Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
119. Maza-Arnedo F, Paternina-Caicedo A, Sosa CG, de Mucio B, Rojas-Suarez J, Say L, et al. Maternal mortality linked to COVID-19 in Latin America: Results from a multi-country collaborative database of 447 deaths. *The Lancet Regional Health - Americas.* 2022 Aug;12:100269.
120. Costa ML, Souza RT, Pacagnella RC, Bento SF, Ribeiro-Do-Valle CC, Luz AG, et al. Brazilian network of COVID-19 during pregnancy (REBRACO: A multicentre study protocol). *BMJ Open.* 2021 Dec 1;11(12).
121. Takemoto M, Menezes M, Andreucci C, Knobel R, Sousa L, Katz L, et al. Clinical characteristics and risk factors for mortality in obstetric patients with severe COVID-19 in Brazil: a surveillance database analysis. *BJOG.* 2020 Dec 14;127(13):1618–26.
122. Takemoto MLS, Menezes MO, Andreucci CB, Knobel R, Sousa LAR, Katz L, et al. Maternal mortality and COVID-19. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine.* 2020;1–7.

123. Gajbhiye RK, Sawant MS, Kuppusamy P, Surve S, Pasi A, Prusty RK, et al. Differential impact of COVID-19 in pregnant women from high-income countries and low- to middle-income countries: A systematic review and meta-analysis. Vol. 155, *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. John Wiley and Sons Ltd; 2021. p. 48–56.
124. Kuandyk A, Ortega MA, Ntegwa MJ, Sarria-Santamera A. Impact of the COVID-19 pandemic on access to and delivery of maternal and child healthcare services in low-and middle-income countries: a systematic review of the literature. *Front Public Health*. 2024 Apr 8;12:1346268
125. Barry K, Fernández-García S, Khashaba A, Ruiz-Calvo G, Redin MR, Mahmoud G, et al. Global maternal mortality associated with SARS-CoV-2 infection: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Glob Health*. 2025 Apr 21;10(4).
126. Louveau A, Harris TH, Kipnis J. Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends Immunol*. 2015 Oct;36(10):569–77.
127. Paterson RW, Benjamin LA, Mehta PR, Brown RL, Athauda D, Ashton NJ, et al. Serum and cerebrospinal fluid biomarker profiles in acute SARS-CoV-2-associated neurological syndromes. *Brain Commun*. 2021 Jul 1;3(3).
128. Butowt R, von Bartheld CS. Anosmia in COVID-19: Underlying Mechanisms and Assessment of an Olfactory Route to Brain Infection. *Neuroscientist*. 2021 Dec 1;27(6):582–603.
129. Yu W, He J, Cai X, Yu Z, Zou Z, Fan D. Neuroimmune Crosstalk Between the Peripheral and the Central Immune System in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Aging Neurosci*. 2022 May 3;14.
130. Neumann B, Schmidbauer ML, Dimitriadis K, Otto S, Knier B, Niesen WD, et al. Cerebrospinal fluid findings in COVID-19 patients with neurological symptoms. Vol. 418, *Journal of the Neurological Sciences*. Elsevier B.V.; 2020.
131. Devlin L, Gombolay GY. Cerebrospinal fluid cytokines in COVID-19: a review and meta-analysis. *J Neurol*. 2023 Nov;270(11):5155–61.
132. Apple AC, Oddi A, Peluso MJ, Asken BM, Henrich TJ, Kelly JD, et al. Risk factors and abnormal cerebrospinal fluid associate with cognitive symptoms after mild COVID -19. *Ann Clin Transl Neurol*. 2022 Feb 19;9(2):221–6.
133. Zeng Z, Yu H, Chen H, Qi W, Chen L, Chen G, et al. Longitudinal changes of inflammatory parameters and their correlation with disease severity and outcomes in patients with COVID-19 from Wuhan, China. *Crit Care*. 2020 Dec 27;24(1):525.

134. Norman M, Navér L, Söderling J, Ahlberg M, Hervius Askling H, Aronsson B, et al. Association of Maternal SARS-CoV-2 Infection in Pregnancy with Neonatal Outcomes. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2021 May 25;325(20):2076–86.
135. Alves de Araujo Junior D, Motta F, Fernandes GM, Castro MEC De, Sasaki LMP, Luna LP, et al. Neuroimaging assessment of pediatric cerebral changes associated with SARS-CoV-2 infection during pregnancy. *Front Pediatr*. 2023 May 24;11.
136. Guasp M, Muñoz-Sánchez G, Martínez-Hernández E, Santana D, Carbayo Á, Naranjo L, et al. CSF Biomarkers in COVID-19 Associated Encephalopathy and Encephalitis Predict Long-Term Outcome. *Front Immunol*. 2022 Apr 11;13.
137. Gigase FAJ, Smith E, Collins B, Moore K, Snijders GJLJ, Katz D, et al. The association between inflammatory markers in blood and cerebrospinal fluid: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2023 Apr 13;28(4):1502–15.
138. Peluso MJ, Lu S, Tang AF, Durstenfeld MS, Ho H en, Goldberg SA, et al. Markers of Immune Activation and Inflammation in Individuals With Postacute Sequelae of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. *J Infect Dis*. 2021 Dec 1;224(11):1839–48.
139. Peluso MJ, Sans HM, Forman CA, Nylander AN, Ho H en, Lu S, et al. Plasma Markers of Neurologic Injury and Inflammation in People With Self-Reported Neurologic Postacute Sequelae of SARS-CoV-2 Infection. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2022 Sep;9(5).
140. Hanson BA, Visvabharathy L, Ali ST, Kang AK, Patel TR, Clark JR, et al. Plasma Biomarkers of Neuropathogenesis in Hospitalized Patients With COVID-19 and Those With Postacute Sequelae of SARS-CoV-2 Infection. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2022 May;9(3).
141. Ong SWX, Fong SW, Young BE, Chan YH, Lee B, Amrun SN, et al. Persistent Symptoms and Association With Inflammatory Cytokine Signatures in Recovered Coronavirus Disease 2019 Patients. *Open Forum Infect Dis*. 2021 Jun 1;8(6).
142. Bozzetti S, Ferrari S, Zanzoni S, Alberti D, Braggio M, Carta S, et al. Neurological symptoms and axonal damage in COVID-19 survivors: are there sequelae? *Immunol Res*. 2021 Dec 7;69(6):553–7.
143. Centers for Disease Control and Prevention. . Post-COVID Conditions: Information for Healthcare Providers [Internet]. 2024 [cited 2024 Aug 17]. Available from: <https://cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-care/post-covid-conditions.html>
144. Moreira C. Mães da quarentena relatam alívio e esperança após nascimento dos filhos.

- Correio Braziliense [Internet]. 2020 Jul 7 [cited 2025 Jun 24]; Available from: <https://www.correiobraziliense.com.br>
145. Albuquerque B. Hospital Universitário de Brasília monitora gestantes que tiveram Covid-19. Radioagência Nacional. 2020 Jun 12
 146. Pesquisa em Turismo. Ceará entre os estados que mais receberam turistas nacionais em 2019. Pesquisa de COVID-19 em gestantes. O Povo, Fortaleza. 2020 Aug 13
 147. TV Bandeirantes – DF. Hospital Universitário de Brasília deve acompanhar gestantes com Covid-19. Band Cidade 2ª Edição. 2020 Jun 12
 148. HUB/UnB. Comunicado sobre atendimento pré-natal para gestantes com COVID-19. HUB-UNB Universidade de Brasília. 2020;
 149. Castro M. UnB vai pesquisar efeitos da Covid-19 nas gestantes e recém-nascidos. G1 Distrito Federal [Internet]. 2020 Jun 26 [cited 2025 Jun 24]; Available from: <https://g1.globo.com/df>

13. APÊNDICES

13.1 APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL Clinical characteristic and outcomes of pregnant women with COVID-19: The PROUDEST prospective cohort study. *PLOS One*.



RESEARCH ARTICLE

Clinical characteristic and outcomes of pregnant women with COVID-19: The PROUDEST prospective cohort study

Lizandra Paravidino Sasaki^{1,2*}, Geraldo Magela Fernandes^{1*}, Ângelo Pereira da Silva², Yacara Ribeiro Pereira^{2,3}, Ajolda Oliveira de Carvalho², Felipe Motta⁴, David Alves de Araújo Junior⁴, Maria Eduarda Canellas de Castro⁴, Gabriela Proffirio Jardim-Santos⁴, Helder Luis Schulte⁴, Clara Corroia de Siracusa⁴, Isadora Pastrana Rabelo⁴, Pedro Sadi Monteirol⁴, Fabiola Cristina Ribeiro Zucchi⁴, Agenor de Castro Moreira dos Santos Junior⁴, Ismael Artur Costa-Rocha⁴, Jordana Graziola Alves Coelho-dos-Reis⁴, Patricia Shu Kuritzky⁴, Rosana Tristão⁴, Dayde Lane Mendonça Da Silva², Otávio de Toledo Nobrega⁴, Alexandre Anderson de Sousa Munhoz Soares⁴, Cleandro Pires de Albuquerque^{1,2}, Cleo Martins Gomes^{1,2,4,5}, Laila Salmen Espindola⁴, Olindo Assis Martins-Filho^{4,6*}, Alberto Moreno Zaconeta^{4,7}, Licia Maria Henrique da Mota^{1,2,7*}



1 Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brazil, **2** Hospital Universitário de Brasília, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brazil, **3** Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brazil, **4** Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brazil, **5** Secretaria de Saúde do Distrito Federal (SES/DF), Brasília, Distrito Federal, Brazil, **6** Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Minas), Belo Horizonte, MG, Brazil, **7** Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **8** Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brazil

* These authors contributed equally to this work.

† These authors share senior authorship on this work.

* lizandra78@gmail.com (LMPS); liciamota228@gmail.com (LMHdaM); camfilho@gmail.com (CAM-F)

OPEN ACCESS

Citation: Sasaki LP, Fernandes GM, Silva APd, Pereira YR, Canellis AOC, Motta F, et al. (2025) Clinical characteristic and outcomes of pregnant women with COVID-19: The PROUDEST prospective cohort study. *PLOS One* 20(7): e0327174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0327174>

Editor: Elma Izra Da Silva Magalhães, Federal University of Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, BRAZIL

Received: April 18, 2025

Accepted: June 10, 2025

Published: July 3, 2025

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0327174>

Copyright: © 2025 Sasaki et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract

The present study intended to characterize the clinical features and outcomes of SARS-CoV-2 infection at distinct pregnancy trimesters. A total of 260 pregnant women with SARS-CoV-2 infection at any pregnancy trimester were enrolled in a prospective follow-up study. Clinical features were recorded between the SARS-CoV-2 infection diagnosis towards delivery and postpartum period. ANOVA and Chi-square/Fisher tests, Bi- and multivariate analyses were performed to verify the effect of predictors on disease outcome, adjusted for the pregestational variables. Data demonstrated that anosmia (64.6%), nasal congestion/discharge (61.5%), headache (60.8%), ageusia (58.5%) and myalgia (58.5%) were the most common symptoms observed amongst pregnant women with non-severe COVID-19. Fever (44.6%) and dyspnea (36.5%) were associated with higher disease severity. Gestational diabetes mellitus (35.8%), systemic arterial hypertension (18.1%), preterm delivery (11.5%) and superimposed preeclampsia (6.2%) were reported as adverse pregnancy outcomes amongst pregnant women with COVID-19. Parturients with acute COVID-19

which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data availability statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information files](#).

Funding: The author(s) received no specific funding for this work.

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

and pregnant women infected at the 3rd trimester presented more severe or critical outcomes as compared to those infected at 2nd and 1st trimesters. Preterm labor (Odds Ratio=3.64), acute fetal distress (Prevalence Ratio=2.40) and Apgar 1st minute score ≤ 7 (Prevalence Ratio=2.56) were adverse outcomes reported in parturients with acute COVID-19 and those with severe or critical outcomes. Together these findings demonstrated that SARS-CoV-2 infection during pregnancy was associated with relevant maternal and neonatal adverse outcomes. The understanding of the clinical and obstetric outcomes of COVID-19 during pregnancy can provide insights to establish the most suitable approach for clinical management of pregnant women.

Introduction

Since the initial outbreak of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19), caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2), the numbers of confirmed cases and reports of mortality/morbidity have continuously increased worldwide. The World Health Organization (WHO) declared COVID-19 a pandemic, which has been lasting for more than 3 years [1,2].

Globally, there have been 777,368,929 confirmed COVID-19 cases, including 7,087,731 deaths, reported to the WHO until February 2nd, 2025 [3]. According to the Brazilian Obstetric Observatory, as of February 20th, 2025, amongst the 2,247,377 COVID-19 cases reported in Brazil, 25,327 cases were diagnosed in pregnant and postpartum women (1%) [4].

At the onset of the pandemic, the real impacts of COVID-19 on pregnancy, maternal and fetal health, puerperium, as well as the consequences on the long-term development of children born to women infected during pregnancy, were completely unknown [5,6]. As the COVID-19 pandemic progressed, pregnant women were considered at high-risk for complications and disease severity, similar to other coronavirus infections outbreaks [5,6].

Multicenter studies evaluating maternal and perinatal outcomes following SARS-CoV-2 infection during pregnancy and the postpartum period include the REBRACO Study Group [7], COVI-PREG Cohort [8], INTERCOVID Multinational Cohort Study [9] and others. Moreover, all the outcomes of SARS-CoV-2 infection during pregnancy and the postpartum period are still unclear.

In this context, we conducted a prospective cohort study including pregnant women infected by SARS-CoV-2 during any pregnancy trimester, referred as *Pregnancy Outcome and child Development – Effects of SARS-CoV-2 infection Trial* (PRODEST), which analyzed effective clinical and epidemiological data collection [10]. The present study was designed to provide multiple deliverables, including primary and secondary outcomes. The primary goal focused on describing the clinical characteristics and maternal and perinatal outcomes of women infected with SARS-CoV-2 during any pregnancy trimester. The secondary outcome aimed at providing supporting evidence regarding the associations between maternal and perinatal

outcomes with i) pregnancy trimester of SARS-CoV-2 infection diagnosis ii) the severity of COVID-19 during pregnancy or iii) acute or convalescent phase of COVID-19.

Materials and methods

Study design

The present study was carried out according to the ethical principles stated in the Helsinki Declaration involving research with human beings. The protocol was submitted and approved by the Institutional review board of the medical faculty of the Universidade de Brasília (CAAE 32359620.0.0000.5558) in May 2020, with additional approval by the Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) in October 2021. All participants have provided written informed consent prior inclusion in the study. The study was registered on the Brazilian clinical trials platform (Rede Brasileira de Ensaios Clínicos – REBEC; <https://ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-65qxs2>) in September 2020. All relevant data are available in the Harvard Dataverse repository 2024, "Repli": <https://doi.org/10.7910/DVN/GOHQUY>.

This is a prospective cohort study in the Brazilian Federal District (Brazil) that included pregnant women aged ≥ 18 years infected by SARS-CoV-2 during any pregnancy trimester. The participants were recruited as non-probabilistic convenience sampling, from May 2020 to May 2021 and followed prospectively from July 2020 to December 2021. Recruitment was conducted primarily through digital channels, including institutional websites, social media platforms, and professional networks. Institutional dissemination: an invitation to participate in the study was posted on official websites and internal bulletins of participating academic and healthcare institutions of Brasília, Federal District, Brazil. Social media: we utilized platforms such as Instagram and Facebook to circulate the study invitation. Posts included a brief description of the study objectives, eligibility criteria, and a phone number to schedule the first clinical study visit. Professional and academic groups: we shared the study invitation in closed messaging groups and online communities (e.g., WhatsApp groups) that included students, healthcare trainees, and professionals, particularly those involved in university hospitals or public health services. Snowball technique: we also encouraged participants and contacts to share the invitation with their peers, which further expanded the reach of our sample. While we acknowledge the inherent limitations of this strategy, including the potential for selection bias and reduced generalizability, we adopted this approach to maximize reach during a period when in-person recruitment was not feasible due to the public health crisis context. To mitigate bias, we sought to diversify dissemination channels and target a broad range of participants from different regions, institutions, and backgrounds.

The study was performed at two public hospitals – the University Hospital of Brasília and the Asa Norte Regional Hospital, both considered public reference centers for COVID-19 in the Federal District of Brazil.

To reduce the risk of confounding bias for the clinical characteristics and outcomes, pregnant women vaccinated for COVID-19 before or during pregnancy were excluded from the study. Moreover, pregnant women with confirmed co-infections, such as toxoplasmosis, syphilis, rubella, herpes, Chagas disease, cytomegalovirus, Zika virus, or human immunodeficiency virus (HIV) were also excluded. In addition, smokers and women with excessive alcohol/illicit drug use were also excluded. Failure to comply with the study protocol or attend the scheduled prenatal visits before delivery (loss to follow-up) were also exclusion criteria. Fig 1 provides a summary flowchart of study population recruitment and exclusion criteria.

The diagnosis of SARS-CoV-2 infection during pregnancy was based on a history of recent COVID-19 symptoms in addition to the following laboratorial tests: i) positive quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) results for nasopharyngeal swab samples; ii) positive serum reactivity of IgM and/or IgG for SARS-CoV-2 (serological or rapid testing, Biomanguinhos, FIOCRUZ, Brazil) or iii) positive chest computed tomography (CT) results indicating pulmonary involvement suggestive of COVID-19. These criteria were recommended by the Ministry of Health of Brazil at the beginning of the COVID-19 pandemic [11].

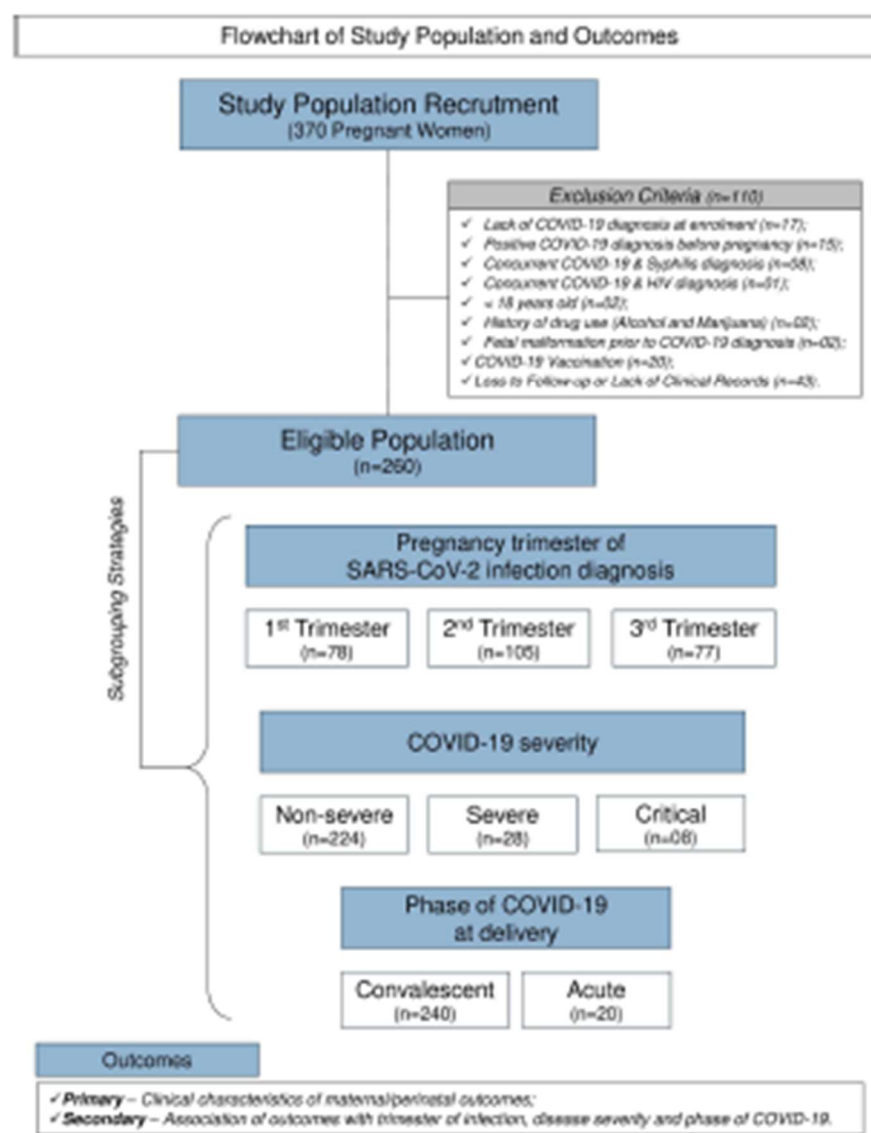


Fig 1. Flowchart of study population and outcomes. This is a prospective cohort study including pregnant women infected by SARS-CoV-2 during three pregnancy trimesters, referred as to *Pregnancy Outcome* and *child Development – Effects of SARS-CoV-2 Infection Trial (PROUDEST)*. Information about the study population recruitment and exclusion criteria is presented in the *Material and Methods* section. The protocol was designed to provide primary and secondary outcomes. Details regarding the deliverables included in the primary and secondary goals are presented in the main manuscript.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0327174.g001>

Demographic and clinical records

Demographic and clinical records from participants, including epidemiological data, COVID-19 symptoms, COVID-19 severity, alcohol/illicit drug or cigarette use, a history of pregnancy diseases, actual pregnancy diseases or infections other than COVID-19, and other data were obtained at the first medical appointment by interview and questionnaires, followed by clinical and laboratorial tests to confirm the COVID-19 diagnosis.

Clinical obstetric data were recorded during prenatal follow-up, which occurred monthly up to 33 weeks of pregnancy, biweekly between 34–36 weeks of pregnancy, and weekly between 37 weeks of pregnancy and delivery. Data regarding childbirth was acquired during hospitalization and collected from medical records. Outpatient postpartum care was performed from 10 to 28 days after delivery. Intrauterine fetal evaluation was performed at least three times via serial ultrasounds: ≤ 14 weeks of pregnancy, between 20–24 weeks and 34–40 weeks of pregnancy. Efforts to minimize response bias were employed, consisting of medical appointments performed regularly in a short time interval.

As in any cohort study, follow-up losses were observed. To minimize follow-up losses, the participants were regularly contacted to continue in the study, proposing pre-delivery medical care, assistance at delivery and post-delivery follow-up, as well as the monitoring of newborns and children.

To preserve the anonymity of the participants, alphanumeric codes were used as identifiers in databases to enter, store and retrieve information. Ethnicity was classified as white, brown, black and indigenous, as self-reported by the participant. Pregnancy trimester was classified as: 1st = first trimester, comprising 4–13 weeks and 6 days of gestation; 2nd = second trimester, comprising 14 weeks to 27 weeks and 6 days of gestation and 3rd = third trimester, comprising 28–41 weeks and 6 days of gestation. The acute phase of COVID-19 was defined as the first 14 days of symptoms of SARS-CoV-2 infection at delivery. Convalescent phase included SARS-CoV-2 infection diagnosed at 1st, 2nd and 3rd pregnancy trimester.

The severity of the COVID-19 disease was classified as proposed by the WHO, referred as: non-severe, severe or critical [12]. Briefly, severe COVID-19 was defined as an oxygen saturation $<90\%$ in room air, a respiratory rate >30 breaths/min, >30 breaths/min, or signs of severe respiratory distress (accessory muscle use, inability to complete full sentences), that were not life threatening. Critical COVID-19 was defined as acute respiratory distress syndrome (ARDS), sepsis, septic shock, or other conditions that normally require the provision of life-sustaining therapies, such as mechanical ventilation (invasive or non-invasive) or vasopressor therapy. Non-severe COVID-19 consisted of the absence of the aforementioned criteria for severe or critical COVID-19.

Pulmonary involvement on lung CT scans was defined as mild ($<25\%$ lung involvement), moderate (25–50% lung involvement) or severe ($>50\%$ lung involvement). Gestational diabetes mellitus (GDM) was defined as glucose intolerance first identified during pregnancy, with a fasting blood glucose level ≥ 92 mg/dL in any pregnancy trimester or a blood glucose level ≥ 180 mg/dL or ≥ 153 mg/dL 1 and 2 hours, respectively, after the 75 g oral glucose tolerance test (OGTT) between the 24th and 28th week of gestation, as proposed by the International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel (IADPSG) [13]. Systemic arterial hypertension (SAH) was defined as a blood pressure greater than 140 x 90 mmHg during pregnancy measured on two separate occasions. Obesity was defined as body mass index ≥ 30 kg/m², and intrauterine fetal growth restriction was defined as an estimated fetal weight or abdominal circumference on ultrasound below the 10th percentile for gestational age.

Premature birth was defined as birth at <37 weeks of gestational age, full-term delivery was defined as delivery between 37–40 weeks and 6 days of gestational age, and post-term delivery was defined as delivery at ≥ 41 weeks of gestational age. Newborns were classified as adequate for gestational age (AGA), small for gestational age (SGA) or large for gestational age (LGA), according to the classification proposed by the International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century (INTERGROWTH-21st) [14].

Statistical analysis

Qualitative variables are presented by absolute (n) and relative (%) frequencies, and quantitative variables are presented as descriptive means and standard deviations.

The analyses were carried out in two stages: initially, bivariate analyses were performed to verify the isolated effect of each predictor on the outcomes, and subsequently, multivariate analyses adjusted by the pregestational control variables were performed to verify the effect of each predictor on the outcomes. The $p < 0.05$ was considered significant. The analyses were performed via SAS 9.4 software.

The Student's *t*-test or ANOVA was used to compare mean age values. Associations between qualitative variables were verified via Pearson's chi-square test, the Cochran-Armitage trend test or Fisher's exact test [15].

A generalized regression model was used to determine whether the severity of COVID-19 is a significant predictor of the occurrence of preterm or post-term birth in relation to the occurrence of full-term birth, adjusting for the effects of the pregestational control variables (GDM, hypertension, preeclampsia, asthma, obesity, education level, and maternal age).

Multivariate Poisson regression models with robust variance were employed to determine whether COVID-19 severity is a significant predictor for the occurrence of fetal distress and whether acute labor due to COVID-19 is a significant predictor for 1st minute scores ≤ 7 . In both analyses, the effects of pregestational variables (GDM, hypertension, preeclampsia, asthma, obesity, education level and maternal age) were treated as control variables.

Results

Description of the study population

After applying the exclusion criteria, a total of 260 pregnant women infected with SARS-CoV-2 at distinct pregnancy trimester were selected for follow-up towards the postpartum period (Fig 1).

The mean age of the study population was 31.3 ± 6.0 years old (ranging from 18 to 52 years). The mean gestational age at COVID-19 diagnosis was 20.7 ± 10.2 weeks (ranging from 4 to 40 weeks). The ethnicity of participants was predominantly brown (60.8%). Education level comprised 11.9% of elementary school, 49.6% of high school and 38.5% of college degrees. Parity analysis demonstrated that most participants presented 2 or ≥ 3 pregnancies, including the pregnancy studied. The majority of COVID-19 diagnosis was performed by RT-PCR (60.4%). The study population was categorized according to the pregnancy trimester of SARS-CoV-2 infection diagnosis, comprising: 78 (30.0%) infected in the 1st trimester, 105 (40.4%) in the 2nd trimester and 77 in the 3rd trimester (29.6%) (Table 1).

Clinical findings

Based on the clinical features, pregnant women were classified according to disease severity as follows: Non-Severe (86.2%), Severe (10.7%) and Critical (3.1%). Moreover, pregnant women were sub-grouped considering the phase of COVID-19 at delivery (Convalescent = 92.3% and Acute = 7.7%) (Table 2).

Of the 260 study participants, 42 patients (16.2%) required hospitalization due to COVID-19 (non-obstetric causes), 15 (5.8%) required oxygen supplementation, and 3 (1.1%) needed mechanical ventilation. Cesarean section was the most common delivery method ($n = 158$, 60.8%). A total of 40 patients experienced labor complications (6 of whom had more than one complication). Labor complications included: arterial hypertension (3.0%), intra- and postpartum hemorrhage (6.9%), oligohydramnios (2.3%), shoulder dystocia and polyhydramnios (0.8%), postpartum endometritis (0.8%), placental abruption (0.4%) and surgical wound infection (0.4%) (Table 2).

Maternal mortality comprised two participants who progressed to puerperal death (0.8%), including a 31-years-old patient who died due to respiratory failure associated with acute renal failure on the 18th postpartum day a 24-years-old woman who died 12 days postpartum due to tonic-clonic seizures, diffuse neurological impairment, and respiratory failure. Among the study population, one pregnant women experienced miscarriage that occurred spontaneously at 6 weeks and 5 days of pregnancy, with COVID-19 diagnosed at week 5 (Table 2).

Table 1. Demographic and laboratorial features of the study population.

Parameter	Frequency n (%)
Age (years, mean $\pm$ SD)	31.3 $\pm$ 6.0
Ethnicity	
White	73 (28.0)
Brown	158 (60.8)
Black	28 (10.8)
Indigenous	1 (0.4)
Education level	
Elementary school	31 (11.9)
High school	129 (49.6)
College	100 (38.5)
Parity	
1 pregnancy	78 (30.0)
2 pregnancies	74 (28.5)
≥ 3 pregnancies	108 (41.5)
COVID-19 diagnosis	
Rapid blood antibody test	75 (28.6)
Serology	25 (9.6)
RT-PCR	157 (60.4)
Chest CT + clinical symptoms	3 (1.2)
Trimester of SARS-CoV-2 diagnosis*	
1*	78 (30.0)
2*	105 (40.4)
3*	77 (29.6)

RT-PCR= reverse transcription polymerase chain reaction; chest CT= chest computed tomography.

1= SARS-CoV-2 infection diagnosis at first pregnancy trimester (4–13 weeks and 6 days of gestation); 2*= SARS-CoV-2 infection diagnosis at second pregnancy trimester (14 weeks to 27 weeks and 6 days of gestation); 3*= SARS-CoV-2 infection diagnosis at third pregnancy trimester (28–41 weeks and 6 days of gestation). The results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) or frequency (%).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0327174.t001>

Current and previous gestational diseases

The analysis of adverse clinical conditions during current pregnancy demonstrated a total of 167 cases (64.2%), including: SAH (18.1%), gestational diabetes mellitus (35.8%), preeclampsia (6.2%) and intrauterine fetal growth restriction (10.4%). Of note was that patients with GDM comprised 30% of pregnant women with gestational diabetes diagnosed exclusively during the current pregnancy while 5.8% reported previous history of GDM (Table 2).

During prenatal follow-up, the participants were asked about their previous history of gestational diseases. Data demonstrated a total of 57 cases (21.9%), which included: SAH (6.2%) GDM (5.8%), preeclampsia (1.2%), pulmonary disease (5.8%), heart disease (2.3%) and intrauterine fetal growth restriction (0.8%) (Table 2).

COVID-19 symptoms during pregnancy

The analysis of COVID-19 symptoms was carried out according to the pregnancy trimester of SARS-CoV-2 infection diagnosis and COVID-19 severity. The data are presented in the S1 Table. Anosmia (n = 168, 64.6%), nasal congestion/discharge (n = 160, 61.5%), headache (n = 158, 60.7%), ageusia (n = 152, 58.4%) and myalgia (n = 152, 58.4%) were the most common symptoms, followed by cough (n = 122, 46.9%), fever (n = 116, 44.6%) and dyspnea (n = 95, 36.5%). The less

Table 2. Clinical features of women infected with SARS-CoV-2 during pregnancy.

Parameter	Frequency n (%)
COVID-19 severity*	
Non-Severe	224 (86.2)
Severe	28 (10.7)
Critical	8 (3.1)
Phase of COVID-19 at delivery**	
Convalescent	240 (92.3)
Acute	20 (7.7)
Chest tomography**	
Convalescent	240 (92.3)
Acute	20 (7.7)
Non-obstetric hospitalization	42 (16.2)
Oxygen supplementation	15 (5.8)
Mechanical ventilation	3 (1.1)
Delivery	
Vaginal	102 (39.2)
Cesarean	158 (60.8)
Labor complications	40 (1.5)
Maternal mortality	2 (0.8)
Gestational diseases***	
Current	167 (64.2)
Previous	57 (21.9)

*COVID-19 severity was considered according to the World Health Organization classification [12].

**Acute phase = up to 14 days of symptoms onset at delivery; Convalescent phase = SARS-CoV-2 infection diagnosis at 1st, 2nd and 3rd pregnancy trimester.

***Gestational diseases included: systemic arterial hypertension, gestational diabetes mellitus, preeclampsia, pulmonary disease, heart disease and intrauterine fetal growth restriction.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0327174.t002>

common symptoms reported in the pregnant women studied were skin diseases ($n=9$, 3.5%), joint pain ($n=11$, 4.2%) and dizziness ($n=15$, 5.8%), followed by nausea and vomiting ($n=17$, 6.5%), diarrhea ($n=57$, 21.9%), asthenia ($n=68$, 26.1%) and sore throat ($n=74$, 28.5%). Other symptoms (11, 4.2%) included periorbital pain, lumbar pain, hyporexia, abdominal pain, epigastric pain, otalgia, and chest pain (S1 Table).

The analysis of symptoms according to the pregnancy trimester of SARS-CoV-2 infection diagnosis demonstrated that women infected in the 2nd trimester experienced more myalgia ($p<0.0001$), asthenia ($p=0.0003$), ageusia ($p=0.0117$), anosmia ($p<0.0001$), headache ($p<0.0001$) and joint pain ($p=0.0015$) than those infected in the 1st and 3rd trimesters. Moreover, women infected in the 1st and 2nd trimesters presented more episodes of nasal congestion/discharge ($p=0.0025$) and nausea ($p<0.0001$) than those infected in the 3rd trimester. The other symptoms were not significantly associated with pregnancy trimester and SARS-CoV-2 infection (S1 Table).

In addition, pregnant women with critical COVID-19 had fever ($p=0.0046$) as compared to those with non-severe or severe COVID-19. Dyspnea ($p<0.0001$) was more common in pregnant women with severe or critical COVID-19 phases than in those with non-severe. Ageusia and headache were significantly more common in patients with non-severe disease than in patients with severe or critical disease ($p=0.0303$ and $p=0.0053$, respectively). The other symptoms showed no significant association with COVID-19 severity (S1 Table).

Maternal outcomes according to the pregnancy trimester of SARS-CoV-2 infection, COVID-19 severity and phase of COVID-19 at delivery

The demographic/clinical parameters (age, ethnicity, education level and obesity) as well as the maternal outcomes (respiratory diseases, SAH, GDM, preeclampsia, gestational age at delivery and delivery routes) were evaluated according to the pregnancy trimester of SARS-CoV-2 infection, COVID-19 severity and phase of COVID-19 at delivery and the results presented in the [Table 3](#).

No significant differences were observed for demographic/clinical parameters and maternal outcomes analyzed according to the pregnancy trimester of SARS-CoV-2 infection diagnosis. However, additional analysis demonstrated that while no women infected in the 1st trimester presented the critical form of COVID-19, three of them showed severe COVID-19 (3.9%) and the majority (96.1%) exhibited non-severe clinical form. Conversely, 7 (9.1%) and 15 (19.5%) pregnant women infected in the 3rd trimester had critical and severe forms of COVID-19, respectively ([Table 4](#)). Therefore, there is a significant association between the pregnancy trimester of SARS-CoV-2 infection occurs and the severity of COVID-19, as women infected in the 3rd trimester are more likely to have severe and critical disease, whereas those infected in the 1st or 2nd trimester are more likely to have non-severe disease ($p < 0.0001$) ([Table 4](#)).

The analysis of maternal outcomes according to COVID-19 severity demonstrated that while most women with non-severe COVID-19 experienced full-term birth, higher proportion of women with severe or critical COVID-19 faced pre-term delivery ($p = 0.05$) ([Table 3](#)).

The data regarding pregnancy outcomes according to phase of COVID-19 at delivery demonstrated that there was a significant association between the acute phase of COVID-19 at delivery and the occurrence of GDM ($p = 0.04$) and premature birth ($p = 0.01$) ([Table 3](#)). Additionally, the results demonstrated that pregnant women presenting acute phase of COVID-19 at delivery showed significantly higher disease severity ($p < 0.0001$) than those who were in the convalescent phase at delivery (Non-severe = 3.1% vs. 96.9%; Critical = 75.0% vs. 25.0%, respectively) ([Table 5](#)).

Multivariate analysis, without adjusting for the control variables, the phase of COVID-19 at delivery and COVID-19 severity were shown to be significant factors for the occurrence of preterm birth (OR = 3.14; 95% CI 1.18; 8.35; $p = 0.0217$) ([Table 6](#)). After adjusting the multivariate model according to age, education level, GDM status, arterial hypertension status, preeclampsia status, respiratory diseases status, and obesity status, there was an increase in the odds ratios, indicating that newborns to mothers with severe or critical COVID-19 at the time of delivery were 3.64 times more likely to be born preterm than those born to mothers without serious or critical COVID-19 (OR = 3.64; 95% CI 1.26; 10.53; $p = 0.017$) ([Table 6](#)).

Newborn clinical findings

As part of this study, the newborns born to mother infected with SARS-CoV-2 at distinct pregnancy trimester were clinically monitored in the postpartum period ([Fig 1](#)).

Fetal growth restriction was observed in 0.8% of the cases. A total of 28 newborns were diagnosed with acute fetal distress (10.8%). The mean birth weight was $3,127 \text{ g} \pm 567$ (ranging from 620 to 4,568 g). Most newborns ($n = 187$) were classified as adequate for gestational age (AGA = 71.9%), 36 were classified as small for gestational age (SGA = 13.8%) and 37 were classified as large for gestational age (LGA = 14.2%). The mean Apgar 1st minute score was 8 ± 1.2 (ranging from 2 to 10) and the 5th minute score was 9 ± 0.7 (ranging from 5 to 10). A total of 53 newborns (20.4%) has an Apgar 1st minute score ≤ 7 and 10 (3.8%) have an Apgar 5th minute score ≤ 7 ([Table 7](#)).

The newborn mortality rate includes two infants (0.8%), one stillbirth and a neonatal death ([Table 7](#)). First, the stillbirth occurred during week 31 of pregnancy in a 41-year-old woman with severe COVID-19 who was pregnant for the 4th time. The mother was diagnosed with chronic arterial hypertension and A1 GDM. The labor was induced at 38 weeks of gestation and the fetus was delivered with adequate weight for gestational age (AGA), albeit without any vital signs. Second,

Table 3. Demographic and clinical features of SARS-CoV-2 infection according to pregnancy trimester of SARS-CoV-2 infection diagnosis, COVID-19 severity and phase of COVID-19 at delivery.

Parameters	Pregnancy trimester of SARS-CoV-2 infection diagnosis* n (%)				COVID-19 severity** n (%)				Phase of COVID-19 at delivery*** n (%)		
	1* n=78 (30.0%)	2* n=105 (40.4%)	3* n=77 (29.6%)	p	Non-severe n=224 (86.2%)	Severe n=28 (10.7%)	Critical n=8 (3.1%)	p	Conva- lescent n=240 (92.3%)	Acute n=20 (7.7%)	p
Age (years, mean $\pm$ SD)	30.7 $\pm$ 6.1	32.1 $\pm$ 5.8	30.8 $\pm$ 6.0	0.22	31.2 $\pm$ 5.8	31.8 $\pm$ 7.4	31.4 $\pm$ 6.1	0.89	31.3 $\pm$ 6.0	30.4 $\pm$ 6.1	0.51
Ethnicity				0.23				0.55			0.75
White	25 (32.1)	32 (30.5)	16 (20.8)		65 (29.0)	7 (25.0)	1 (12.5)		68 (28.3)	5 (25.0)	
Brown	43 (55.1)	62 (59.0)	53 (68.8)		134 (59.8)	20 (71.4)	5 (62.5)		144 (60.0)	14 (70.0)	
Black	10 (12.8)	11 (10.5)	7 (9.1)		24 (10.7)	1 (3.6)	2 (25.0)		27 (11.3)	1 (5.0)	
Indigenous	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.3)		1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)		1 (0.4)	0 (0.0)	
Education level				0.78				0.92			0.15
Elementary school	11 (14.1)	10 (9.5)	10 (13.0)		26 (11.6)	4 (14.3)	1 (12.5)		29 (12.1)	2 (10.0)	
High school	35 (44.9)	54 (51.4)	40 (51.9)		110 (49.1)	14 (50.0)	5 (62.5)		115 (47.9)	14 (70.0)	
College	32 (41.0)	41 (39.1)	27 (35.1)		88 (39.3)	10 (35.7)	2 (25.0)		96 (40.0)	4 (20.0)	
Obesity				0.78				0.63			1.00
No	69 (88.5)	96 (91.4)	70 (90.9)		201 (89.7)	26 (92.9)	8 (100)		217 (90.4)	18 (90.0)	
Yes	9 (11.5)	9 (8.6)	7 (9.1)		23 (10.3)	2 (7.1)	0 (0.0)		23 (9.6)	2 (10.0)	
Respiratory diseases				0.16				0.23			0.30
No	71 (92.3)	97 (92.4)	76 (98.7)		202 (93.3)	28 (100)	8 (100)		225 (93.7)	20 (100)	
Yes	6 (7.7)	8 (7.6)	1 (1.3)		15 (6.7)	0 (0.0)	0 (0.0)		15 (6.2)	0 (0.0)	
SAH*				0.42				0.37			1.00
No	62 (79.5)	90 (85.7)	61 (79.2)		183 (81.7)	22 (78.6)	8 (100)		197 (82.1)	16 (80.0)	
Yes	16 (20.5)	15 (14.3)	16 (20.8)		41 (18.3)	6 (21.4)	0 (0.0)		43 (17.9)	4 (20.0)	
CDM*				0.77				0.09			0.04
No	49 (62.8)	66 (62.9)	52 (67.5)		140 (62.5)	19 (67.9)	8 (100)		150 (62.5)	17 (85.0)	
Yes	29 (37.2)	39 (37.1)	25 (32.5)		84 (37.5)	9 (32.1)	0 (0.0)		90 (37.5)	3 (15.0)	
Preeclampsia				0.47				0.44			0.62
No	72 (92.3)	101 (96.2)	71 (92.2)		211 (94.2)	25 (89.3)	8 (100)		226 (94.2)	18 (90.0)	
Yes	6 (7.7)	4 (3.8)	6 (7.8)		13 (5.8)	3 (10.7)	0 (0.0)		14 (5.8)	2 (10.0)	
Gestational age at delivery				0.54				0.05			0.01
Pre-term	9 (11.5)	9 (8.6)	12 (15.6)		21 (9.4)	6 (21.4)	3 (37.5)		23 (9.6)	7 (35.0)	
Term	66 (84.6)	89 (84.8)	60 (77.9)		189 (84.4)	21 (75.0)	5 (62.5)		202 (84.2)	13 (65.0)	
Post-term	3 (3.9)	7 (6.6)	5 (6.5)		14 (6.2)	1 (3.6)	0 (0.0)		15 (6.2)	0 (0.0)	
Delivery				0.78				0.37			0.38
Vaginal	33 (42.3)	39 (37.1)	30 (39.0)		86 (38.4)	14 (50.0)	2 (25.0)		96 (40.0)	6 (30.0)	
Cesarean	45 (57.7)	66 (62.9)	47 (61.0)		138 (61.6)	14 (50.0)	6 (75.0)		144 (60.0)	14 (70.0)	

*CDM= Gestational diabetes mellitus; SAH= Systemic arterial hypertension;

1= SARS-CoV-2 infection diagnosis at first pregnancy trimester (4–13 weeks and 6 days of gestation); 2*= SARS-CoV-2 infection diagnosis at second pregnancy trimester (14 weeks to 27 weeks and 6 days of gestation); 3*= SARS-CoV-2 infection diagnosis at third pregnancy trimester (28–41 weeks and 6 days of gestation).

**COVID-19 severity was considered according to the World Health Organization classification [12].

***Acute phase = up to 14 days of symptoms onset at delivery; Convalescent phase= SARS-CoV-2 infection diagnosis at 1*, 2* and 3* pregnancy trimester. The results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) or frequency (%). Comparative analyses were carried out by ANOVA or Chi-square/Fisher tests. Significance was considered at p-values < 0.05.<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0327174.t003>

Table 4. COVID-19 severity according to the pregnancy trimester of SARS-CoV-2 infection diagnosis.

COVID-19 severity	Total n (%)	Pregnancy trimester of SARS-CoV-2 infection diagnosis*			p
		1 st n (%)	2 nd n (%)	3 rd n (%)	
Non-severe	224 (86.2)	75 (96.1)	94 (89.5)	55 (71.4)	< 0.0001
Severe	28 (10.7)	3 (3.9)	10 (9.5)	15 (19.5)	
Critical	8 (3.1)	0 (0.0)	1 (1.0)	7 (9.1)	

*1st = SARS-CoV-2 infection diagnosis at first pregnancy trimester (4–13 weeks and 6 days of gestation); 2nd = SARS-CoV-2 infection diagnosis at second pregnancy trimester (14 weeks to 27 weeks and 6 days of gestation); 3rd = SARS-CoV-2 infection diagnosis at third pregnancy trimester (28–41 weeks and 6 days of gestation). COVID-19 severity according to the World Health Organization classification [12]. Comparative analysis was carried out by Chi-square test. Significance was considered at p-values < 0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0327174.t004>

Table 5. COVID-19 severity according to the phase of COVID-19 at delivery.

COVID-19 severity	Total n (%)	Phase of COVID-19 at delivery*		p
		Convalescent n (%)	Acute n (%)	
Non-severe	224 (86.2)	217 (96.9)	7 (3.1)	< 0.0001
Severe	28 (10.7)	21 (75.0)	7 (25.0)	
Critical	8 (3.1)	2 (25.0)	6 (75.0)	

*Acute phase = up to 14 days of symptoms onset at delivery; Convalescent phase = SARS-CoV-2 infection diagnosis at 1st, 2nd and 3rd pregnancy trimester. COVID-19 severity according to the World Health Organization classification [12]. Comparative analysis was carried out by Cochran-Armitage trend test. Significance was considered at p-values < 0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0327174.t005>

Table 6. Odds ratio modeling of gestational age at delivery according to COVID-19 severity.

Outcome	Comparisons	Factors	OR not adjusted* (95% CI)	p	OR adjusted** (95% CI)	p
Gestational age at delivery	Preterm vs. Term	Severe & Critical vs. Non-severe	3.14 (1.18 - 8.35)	0.0217	3.64 (1.26 - 10.53)	0.017

OR = Odds Ratio. COVID-19 severity was considered according to the World Health Organization classification [12].

*Generalized logit model.

**The 95% confidence intervals (95% CI) adjusted for age, education level, gestational diabetes mellitus, systemic arterial hypertension, pre-eclampsia, respiratory disease and obesity.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0327174.t006>

the neonatal death occurred at 11 days of life due to extreme prematurity (26 weeks and 1 day of gestation), respiratory failure, and neonatal sepsis. The baby was born to a 26-year-old primiparous woman diagnosed with mild COVID-19 and isthmus-cervical incompetence. The cause of the newborn death, determined after necropsy and placental analysis, was hypoxia and hemorrhage of multiple organs.

Fetal growth restriction, acute fetal distress, birth weight classification (SGA, AGA or LGA) and Apgar 1st minute score ≤ 7 did not differ according to pregnancy trimester of SARS-CoV-2 infection diagnosis (Table 8).

Data analysis demonstrated a significant association between the presence of acute fetal distress with disease severity (p = 0.01) (Table 8). Moreover, there was a significant relationship between COVID-19 severity and newborn weight classification (p = 0.01) with non-severe COVID-19 associated with AGA and critical disease associated with LGA (Table 8).

Table 7. Clinical features of newborns born to mothers infected with SARS-CoV-2 during pregnancy.

Parameter	Frequency n (%)
Fetal growth restriction	
No	258 (99.2)
Yes	2 (0.8)
Acute fetal distress	
No	232 (89.2)
Yes	28 (10.8)
Birth weight*	
Weight (g, mean $\pm$ SD)	3,127 $\pm$ 567
Small (SGA)	36 (13.8)
Adequate (AGA)	187 (71.9)
Large (LGA)	37 (14.2)
Apgar 1st minute score	
Score (mean $\pm$ SD)	8 $\pm$ 1.2
≤ 7	53 (20.4)
> 7	207 (79.6)
Apgar 5th minute score	
Score (mean $\pm$ SD)	9 $\pm$ 0.7
≤ 7	10 (3.8)
> 7	250 (96.2)
Newborn mortality	2 (0.8)

*Birth Weight were classified as small (SGA), adequate (AGA) and large (LGA) for gestational age. The results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) or its frequency (%). The newborn mortality includes stillbirth and neonatal death.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0327174.t007>

Acute fetal distress was more common ($p = 0.04$) in pregnant women who were in the acute phase of COVID-19 (25.0%) as compared to women in the convalescent phase (9.6%) (Table 8). These findings indicate that pregnant women with severe and critical disease and those with acute COVID-19 were more likely to have newborns diagnosed with fetal distress at the time of delivery.

Modeling counts of acute fetal distress adjusted by age, education level, GDM status, arterial hypertension status, preeclampsia status, respiratory disease status and obesity status, showed that newborns born to mothers with severe or critical COVID-19 were more prone to acute fetal distress, with a 2.4 times higher risk than those born to mothers with non-severe COVID-19 ($p = 0.036$) (Table 9).

Regardless of no differences were observed for Apgar 1st minute score according to pregnancy trimester of SARS-CoV-2 infection diagnosis, COVID-19 severity and phase of COVID-19 at delivery (Table 8), the prevalence ratio analysis demonstrated an association between the phase of COVID-19 with the Apgar 1st minute score ≤ 7 (Table 9). Modeling counts adjusted for age, education level, GDM status, arterial hypertension status, preeclampsia status, respiratory disease status, and obesity status, showed that newborns born to mothers with acute phase of COVID-19 at delivery were 2.56 times more likely to have an Apgar 1st minute score ≤ 7 than newborns born to mothers with convalescent phase of COVID-19 at delivery ($p = 0.018$) (Table 9).

Discussion

Different symptoms of COVID-19 were observed in the patients studied, varying according to the trimester of SARS-CoV-2 infection occurred and disease severity. Anosmia, runny nose and/or nasal congestion, headache, ageusia and myalgia

Table 8. Clinical features of newborns born to mothers with SARS-CoV-2 infection according to pregnancy trimester of SARS-CoV-2 infection diagnosis, COVID-19 severity and phase of COVID-19 at delivery.

Parameters	Pregnancy trimester of SARS-CoV-2 infection diagnosis* n (%)				COVID-19 severity** n (%)				Phase of COVID-19 at delivery*** n (%)		
	1 st n=78 (30.6%)	2 nd n=105 (40.4%)	3 rd n=77 (29.6%)	p	Non-severe n=224 (86.2%)	Severe n=28 (10.7%)	Critical n=8 (3.1%)	p	Convalescent n=240 (92.3%)	Acute n=20 (7.7%)	p
Fetal growth restriction				0.52				1.00			0.15
No	77 (98.7)	105 (100)	76 (98.7)		222 (99.1)	28 (100)	8 (100)		239 (99.6)	19 (95.0)	
Yes	1 (1.2)	0 (0.0)	1 (1.3)		2 (0.9)	0 (0.0)	0 (0.0)		1 (0.4)	1 (5.0)	
Acute fetal distress				0.41				0.01			0.04
No	72 (92.3)	94 (89.5)	66 (85.7)		204 (91.1)	23 (82.1)	5 (62.5)		217 (90.4)	15 (75.0)	
Yes	6 (7.7)	11 (10.5)	11 (14.3)		20 (8.9)	5 (17.9)	3 (37.5)		23 (9.6)	5 (25.0)	
Birth weight *				0.86				0.01			0.29
Small (SGA)	12 (15.4)	14 (13.3)	10 (13.0)		28 (12.5)	7 (25)	1 (12.5)		32 (13.3)	4 (20.0)	
Adequate (AGA)	53 (67.9)	78 (74.3)	56 (72.7)		166 (74.1)	18 (64.3)	3 (37.5)		176 (73.4)	11 (55.0)	
Large (LGA)	13 (16.7)	13 (12.4)	11 (14.3)		30 (13.4)	3 (10.7)	4 (50.0)		32 (13.3)	5 (25.0)	
Apgar 1st minute score				0.54				0.32			0.25
≤7	19 (24.4)	19 (18.1)	15 (19.5)		42 (18.8)	9 (32.1)	2 (25.0)		47 (19.6)	6 (30.0)	
>7	59 (75.6)	86 (81.9)	62 (80.5)		182 (81.2)	19 (67.9)	6 (75.0)		193 (80.4)	14 (70.0)	

*Birth Weight were classified as small (SGA), adequate (AGA) and large (LGA) for gestational age.

*1st = SARS-CoV-2 infection diagnosis at first pregnancy trimester (4–13 weeks and 6 days of gestation); 2nd = SARS-CoV-2 infection diagnosis at second pregnancy trimester (14 weeks to 27 weeks and 6 days of gestation); 3rd = SARS-CoV-2 infection diagnosis at third pregnancy trimester (28–41 weeks and 6 days of gestation).

**COVID-19 severity was considered according to the World Health Organization classification [12].

***Acute phase = up to 14 days of symptoms onset at delivery; Convalescent phase = SARS-CoV-2 infection diagnosis at 1st, 2nd and 3rd pregnancy trimester. The results are expressed as the mean ± standard deviation (SD) or frequency (%). Comparative analyses were carried out by ANOVA or Chi-square/Fisher tests. Significance was considered at p-values < 0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0327174.t008>

Table 9. Modeling counts of acute fetal distress and Apgar 1st minute score ≤7 according to the COVID-19 severity and phase of infection.

Outcome	Factors	PR not adjusted* (95% CI)	p	PR adjusted** (95% CI)	p
Acute fetal distress	Severe & Critical vs. Non-severe	2.87 (1.32 - 6.21)	0.007	2.40 (1.06 - 5.46)	0.036
Apgar 1 st minute score ≤7	Acute phase vs. Convalescent phase	2.32 (1.07 - 5.05)	0.032	2.56 (1.17 - 5.56)	0.018

PR = Prevalence Ratio. COVID-19 severity was considered according to the World Health Organization classification [12]. Acute phase = up to 14 days of symptoms onset at delivery; Convalescent phase = SARS-CoV-2 infection diagnosis at 1st, 2nd and 3rd pregnancy trimester.

*Poisson regression model.

**Prevalence ratio adjusted by setting the 95% confidence interval (95% CI), adjusted for age, education level, gestational diabetes mellitus, systemic arterial hypertension, pre-eclampsia, respiratory disease and obesity.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0327174.t009>

were the most common symptoms reported during the acute phase of COVID-19 and, in general, were associated with non-severe disease. Moreover, fever and dyspnea were not common but were associated with disease severity. In the PregCOVID-19 systematic review, cough and fever were the most common COVID-19 symptoms in pregnant women,

whereas dyspnea, myalgia, ageusia, and diarrhea were less common [16]. Additionally, the PRIORITY study revealed that cough, sore throat, myalgia and fever were the most prevalent initial symptoms in infected women [17].

Since pregnancy causes mechanical, physiological, and immunological changes in women's bodies, pregnancy potentially increases susceptibility to infectious diseases, associated complications, and adverse outcomes, including an altered response to COVID-19 infection [18–20]. Reports of maternal mortality related to COVID-19 in low- and middle-income countries exceeded global figures; possible reasons include the aggravation of SARS-CoV-2 infection related to the changes caused by pregnancy or due to interruptions in access to maternity services leading to delayed healthcare. Brazil, especially, was hit hard by the COVID-19 pandemic, with a high number of daily reported cases and maternal deaths, especially in postpartum women [21–26]. The mortality rate among pregnant Brazilian women was approximately 5% in 2020 and 10% in 2021, showing a progressive decrease after the vaccination campaign started in April 2021 [4].

In the present study, which included only pregnant women who had not been vaccinated, the mortality rate was 0.8% (2 out of 260 women); deaths exclusively occurred during puerperium. If we consider only participants with severe and critical disease (36 of the 260 pregnant women), the mortality rate was 5.6% (2 of 36 women). A retrospective cohort study including 1,386 pregnant Brazilian women with a confirmed diagnosis of COVID-19 also revealed that women infected with COVID-19 during pregnancy had a greater risk of maternal death (relative risk = 18.7; 95% CI = 11.1–31.7) [21].

According to data from the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and the GISAID platform, the Alpha variant predominated from December 2020 to April 2021, being succeeded by Delta between June and December 2021, and later by Omicron, which became dominant from January 2022 [27,28]. Specifically, our study recruited patients between May 2020 and May 2021 – a period during which multiple SARS-CoV-2 lineages were circulating in Brazil. Early in this period, B.1.1.28 and B.1.1.33 lineages predominated; by late 2020, the VOC Zeta (P.2) emerged, followed by the VOC Gamma (P.1), first detected in Manaus, Brazil in November 2020 and becoming the dominant variant during the severe second wave in early 2021. In May 2021, the VOC Alpha (B.1.1.7) was also present, although with more limited circulation. These variants were characterized by distinct mutations, particularly in the spike protein, associated with increased transmissibility, immune escape, and, in some cases, higher clinical severity [29–31].

Variant epidemiology analyses highlight how genomic surveillance has been instrumental in tracking variant emergence, understanding transmission patterns, and informing public health interventions. For clinicians, particularly those caring for pregnant women in their third trimester, awareness of the predominant circulating variants is critical, as certain VOCs have been linked to increased risk of reinfection, and more severe disease presentations [29–31]. There is evidence that both maternal and neonatal outcomes were worse during the Delta wave of the SARS-CoV-2 pandemic than in preceding periods, but our study included mostly pregnant women with the Alpha or pre-Delta variant [32]. Regarding disease severity, more critical and severe cases of COVID-19 were detected in women who were infected in the 3rd trimester of pregnancy or in the acute phase of COVID-19 during delivery. Previous studies have demonstrated that COVID-19 disease severity is higher in late pregnancy as compared to early pregnancy. However, the complete immunopathological mechanisms of this condition are not completely defined [19,33].

According to our findings, SARS-CoV-2 infection during pregnancy is associated with adverse maternal and neonatal outcomes, especially among pregnant women infected by SARS-CoV-2 in the 3rd trimester, severe and critical disease and acute phase of SARS-CoV-2 infection at delivery, ultimately linked with preterm labor, cesarean delivery, acute fetal distress and Apgar 1st minute score ≤ 7 .

Previous studies also suggested that SARS-CoV-2 infection during pregnancy is associated with several adverse pregnancy outcomes including preeclampsia, preterm birth, cesarean delivery, stillbirth and small birth weight (SGA), especially among pregnant women with severe COVID-19 or with COVID-19 at the time of delivery [34–39]. The INTERCOVID Multinational Cohort Study, comprising 43 centers in 18 countries, revealed that COVID-19 was associated with increased risks for preeclampsia/eclampsia (1.7-fold), preterm birth (1.6-fold), small birth weight (1.5-fold) and severe neonatal morbidity (2.6-fold) [9]. The COVI-PREG registry revealed increased risks of adverse and maternal outcomes, including

oxygen requirements, hospitalization, intensive care unit (ICU) admission and premature delivery in pregnant women infected with SARS-CoV-2 [8].

Premature labor, acute fetal distress and Apgar 1st minute score ≤ 7 were associated with the acute phase of COVID-19 at delivery. COVID-19 severity may be explained by multiple mechanisms underlying the adverse effects of SARS-CoV-2 infection on the placenta and developing fetus, including hypoxia-related issues, an excessive immune response, altered inflammation and thrombosis.

Placental damage, evidenced by histological abnormalities linked to SARS-CoV-2 transplacental transmission, could compromise fetal blood flow and lead to placental insufficiency. These abnormalities, primarily characterized by significant perivillous fibrin deposition and chronic histiocytic intervillitis, are referred to as SARS-CoV-2 placentitis and can occur even without placental infection [40,41]. Changes at the maternal-fetal interface during systemic infection linked to an inflammatory condition in the placenta may serve to protect the placenta and fetus from infection; however, these changes also have the potential to drive pathological changes with adverse consequences for offspring, such as hypoxia and fetal distress [42].

Another explanation is that SARS-CoV-2 infection during pregnancy can induce changes in the maternal immune response, with effects on pregnancy outcomes. A paper published by our group demonstrated that, in general, serum soluble mediators have different trajectories during a healthy pregnancy and are disturbed in pregnant women with convalescent SARS-CoV-2 infection. Higher levels of most soluble mediators were observed in the COVID-19 group than in the healthy control group, with major increases in the levels of proinflammatory cytokines, including IL-6, TNF- α and IFN- γ . These findings may also contribute to explaining the clinical course of pregnancy complications [20].

One specific adverse maternal outcome observed in pregnant women affected by COVID-19 in this cohort study attracted our attention: gestational diabetes mellitus. Our data demonstrated that high number of pregnant women infected with SARS-CoV-2 presented with GDM (93 out of 260, 35.8%). In a meta-analysis of women before the COVID-19 pandemic that used the IADPSG's diagnostic criteria for GDM, the global prevalence of GDM was 14.2% (95% CI = 14.2–14.3%). In low-income countries, middle-income countries and high-income countries, the prevalence rates were 14.7% (95% CI = 12.9–16.7%), 9.9% (95% CI = 9.0–10.1%) and 14.4% (95% CI = 14.3–14.4%), respectively, and these rates were much lower than those observed in the present study [13]. Other studies also reported a significantly increased prevalence of GDM in pregnant women during the COVID-19 pandemic [36,43]. Previous studies suggested that SARS-CoV-2 may trigger hyperglycemia and diabetes mellitus through virus interaction with angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptors, resulting damage to the pancreatic islet cells [44]. This outcome can increase the risk of short-term adverse maternal and perinatal outcomes, including shoulder dystocia, fetal macrosomia, cesarean section, hypertensive disorders, neonatal hypoglycemia, and admission of neonates to the intensive care unit [44].

According to our results, the prevalence of preeclampsia in pregnant women infected with SARS-CoV-2 was similar to that previously reported in women not infected with SARS-CoV-2 [45,46]. Moreover, studies have demonstrated an increased risk of preeclampsia in pregnant women infected with SARS-CoV-2, suggesting that COVID-19, characterized by virus-induced effects on endothelial cells via the ACE2 receptor and TMPRSS2 coreceptor, can cause endothelial dysfunction and disrupt vascular integrity, leading to hyperinflammation and hypercoagulability, with immunopathological mechanisms overlapping between COVID-19 and preeclampsia [47].

Strategies to reduce the risk of poor obstetric outcomes related to COVID-19 should be developed. Multiple factors associated with poor obstetric outcomes must be considered, such as limited access to care, inadequate standardization of care, racial and ethnic discrimination, social and economic disparities, and misinformation regarding with vaccination [41,48,49].

Strengths and limitations

The main strength of the present study was the design comprising a prospective cohort follow-up of a representative number of pregnant women at the beginning of the pandemic, during which data collection was scarce. Our study followed

a strict protocol, excluding other infectious diseases or vaccination against SARS-CoV-2 that could result in selection bias. Epidemiological and clinical data from the pregnancy, childbirth, and postpartum periods were collected regularly despite all the challenges associated with combating the COVID-19 pandemic.

The present study has some limitations. The sample did not include asymptomatic pregnant women because tests were performed exclusively on symptomatic patients at the beginning of the pandemic due to a lack of public resources. This study was conducted during the predominant circulation of the SARS-CoV-2 Alpha variant; therefore, the impact of other variants on obstetric outcomes may be different from those reported in this study.

However, the overall interpretation of the results obtained in this study should be performed cautiously. Since the data obtained in this research may not be obtained in populations in other sociodemographic contexts, further studies should be carried out with the aim of evaluating the clinical and obstetric outcomes of women infected with SARS-CoV-2 during any trimester of pregnancy and with any SARS-CoV-2 strains and of establishing the pathophysiological mechanisms of COVID-19 severity during pregnancy.

Furthermore, unanswered questions about the direct viral effect and the effects of the placental inflammatory response and maternal cytokine storm caused by maternal SARS-CoV-2 infection on the fetus and newborns need to be evaluated through long-term studies. Understanding these phenomena should contribute to the proper management of newborns born to SARS-CoV-2-infected mothers.

Conclusions

According to our study, SARS-CoV-2 infection during pregnancy is associated with numerous adverse maternal and neonatal outcomes, including preterm labor, acute fetal distress and aApgar 1st minute score ≤ 7 , especially among pregnant women infected in the 3rd trimester, those in the acute phase of COVID-19 at childbirth, and those with severe and critical COVID-19.

Considering that SARS-CoV-2 is constantly mutating, and several countries worldwide have not yet established complete vaccination for all pregnant women, there is a need to maintain data collection regarding the effects of SARS-CoV-2 infection during pregnancy in order to decrease maternal and neonatal risks. The identification of pregnant women as a particularly affected group can serve as an alert not only to monitor the evolution of SARS-CoV-2, but also to monitor new emerging pathogens.

Understanding the clinical symptoms, severity, and possible adverse obstetric outcomes of COVID-19 during pregnancy can help establish the most suitable approach for decreasing maternal and neonatal risk in this population.

Supporting Information

S1 Table. COVID-19 symptoms according to the pregnancy trimester of SARS-CoV-2 infection diagnosis and COVID-19 severity.
(DOCX)

Acknowledgments

We express our gratitude to all the pregnant women and their families as well as all the students, residents, and health-care professionals whose support was essential to conduct this study. We are also grateful to the Nucleus of Support on Research from the Sabin Institute for performing laboratory tests. This research was performed by students and professors enrolled in the Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília (UnB), supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). JGACR, OTN and OAMF received PQ fellowships from CNPq. OAMF participated in the fellow program supported by the Universidade do Estado do Amazonas (PROVISIT N° 005/2023-PROPESP/UEA).

Author contributions

Conceptualization: Lizandra Paravidine Sasaki, Geraldo Magela Fernandes, Maria Eduarda Canellas de Castro, Patrícia Shu Kurizky, Cleandro Pires de Albuquerque, Alberto Moreno Zaconeta, Licia Maria Henrique da Mota.

Data curation: Lizandra Paravidine Sasaki, Geraldo Magela Fernandes, Angelo Pereira da Silva, Yacara Ribeiro Pereira, Aleida Oliveira de Carvalho, Felipe Motta, David Alves de Araújo Junior, Gabriela Profrino Jardim-Santos, Heidi Luise Schulte, Clara Correia de Siracusa, Isadora Pastrana Rabelo, Pedro Sadi Monteiro.

Formal analysis: Lizandra Paravidine Sasaki, Ismael Artur Costa-Rocha, Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis, Olindo Assis Martins-Filho, Licia Maria Henrique da Mota.

Funding acquisition: Lizandra Paravidine Sasaki, Dayde Lane Mendonça Da Silva, Laila Salmen Espindola, Licia Maria Henrique da Mota.

Investigation: Lizandra Paravidine Sasaki, Geraldo Magela Fernandes, Angelo Pereira da Silva, Yacara Ribeiro Pereira, Aleida Oliveira de Carvalho, Felipe Motta, David Alves de Araújo Junior, Maria Eduarda Canellas de Castro, Clara Correia de Siracusa, Isadora Pastrana Rabelo, Pedro Sadi Monteiro.

Methodology: Lizandra Paravidine Sasaki, Geraldo Magela Fernandes, Angelo Pereira da Silva, Yacara Ribeiro Pereira, Aleida Oliveira de Carvalho, Felipe Motta, David Alves de Araújo Junior, Maria Eduarda Canellas de Castro, Cleandro Pires de Albuquerque, Alberto Moreno Zaconeta, Licia Maria Henrique da Mota.

Project administration: Lizandra Paravidine Sasaki, Geraldo Magela Fernandes, Cleandro Pires de Albuquerque, Alberto Moreno Zaconeta, Licia Maria Henrique da Mota.

Resources: Lizandra Paravidine Sasaki, Geraldo Magela Fernandes, Felipe Motta, David Alves de Araújo Junior, Maria Eduarda Canellas de Castro, Agenor de Castro Moreira dos Santos Junior.

Supervision: Cleandro Pires de Albuquerque, Laila Salmen Espindola, Olindo Assis Martins-Filho, Alberto Moreno Zaconeta, Licia Maria Henrique da Mota.

Validation: Geraldo Magela Fernandes, Fabiola Cristina Ribeiro Zucchi, Rosana Tristão, Dayde Lane Mendonça Da Silva, Otávio de Toledo Nobrega, Alexandre Anderson de Sousa Munhoz Soares, Ciro Martins Gomes.

Visualization: Lizandra Paravidine Sasaki, Maria Eduarda Canellas de Castro, Ismael Artur Costa-Rocha, Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis, Cleandro Pires de Albuquerque, Olindo Assis Martins-Filho, Alberto Moreno Zaconeta, Licia Maria Henrique da Mota.

Writing – original draft: Lizandra Paravidine Sasaki, Geraldo Magela Fernandes, Angelo Pereira da Silva, Yacara Ribeiro Pereira, Aleida Oliveira de Carvalho, Felipe Motta, David Alves de Araújo Junior, Maria Eduarda Canellas de Castro, Gabriela Profrino Jardim-Santos, Heidi Luise Schulte, Ismael Artur Costa-Rocha, Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis, Olindo Assis Martins-Filho.

Writing – review & editing: Lizandra Paravidine Sasaki, Geraldo Magela Fernandes, Maria Eduarda Canellas de Castro, Ismael Artur Costa-Rocha, Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis, Cleandro Pires de Albuquerque, Olindo Assis Martins-Filho, Alberto Moreno Zaconeta, Licia Maria Henrique da Mota.

References

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. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017> PMID: 31978945
2. Shultz JM, Perlman A, Saltzman RQ, Espinoza Z, Galea S. Pandemic March: 2019 coronavirus disease's first wave circumnavigates the globe. *Disaster Med Public Health Prep*. 2020;14:e28–32.
3. World Health Organization. WHO coronavirus (COVID-19) dashboard. Geneva, Switzerland: WHO; 2020 [cited 2025 Feb 21]. Available from: <https://covid19.who.int>

4. SRAC. Síndrome respiratória aguda grave em gestantes e puérperas. Observatório Obstétrico Brasileiro; 2021 [cited 2025 Feb 20]. Available from: https://observatorioobstetrico.shinyapps.io/covid_gpsta_puarp_br/
5. Masolo DD, 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*. 2020;2:100107.
6. Chmielewska B, Barratt I, Townsend R, Kalafat E, van der Meulen J, Guroi-Urgand I, et al. Effects of the COVID-19 pandemic on maternal and perinatal outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2021;9(6):e759–72. [https://doi.org/10.1016/S2214-1093\(21\)00079-6](https://doi.org/10.1016/S2214-1093(21)00079-6) PMID: 33811827
7. Souza RT, Cecatti JC, Pacagnella RC, Ribeiro-Do-Valle CC, Luz AG, Lajos GJ, et al. The COVID-19 pandemic in Brazilian pregnant and postpartum women: results from the REBRACO prospective cohort study. *Sci Rep*. 2022;12(1):11758. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15547-z> PMID: 35817818
8. Favre G, Malsmeu E, Ponsat L, Daire C, Ponsat C, Quibel T, et al. Maternal and perinatal outcomes following pre-Delta, Delta, and Omicron SARS-CoV-2 variants infection among unvaccinated pregnant women in France and Switzerland: a prospective cohort study using the COVI-PREG registry. *Lancet Reg Health Eur*. 2023;26:100560.
9. Villar J, Arif S, Guner RB, Thiruvengadam R, Rauch S, Kholin A, et al. Maternal and neonatal morbidity and mortality among pregnant women with and without COVID-19 infection: the INTERCOVID multinational cohort study. *JAMA Pediatr*. 2021;175(8):817–26. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2021.1050> PMID: 33885740
10. Fernandes CM, Motta F, Sasaki LMP, Silva APD, Miranda AM, Carvalho AOD, et al. Pregnancy outcomes and child development effects of SARS-CoV-2 infection (PRODEST trial): protocol for a multicenter, prospective cohort study. *JMIR Res Protoc*. 2021;10(4):e26477. <https://doi.org/10.2196/26477> PMID: 33793409
11. Conselho Nacional de Secretarias Municipais de Saúde. Guia Orientador Para o Enfrentamento da Pandemia Covid-19 na Rede de Atenção à Saúde. Brasília: Conselho Nacional de Secretarias de Saúde; 2020 [cited 2024 May 29]. Available from: <https://www.conass.org.br/handle/conass/covid-19-guia-orientador-para-o-enfrentamento-da-pandemia-na-rede-de-atencao-a-saude/>
12. World Health Organization. COVID-19 clinical management: living guidance. Geneva, Switzerland: WHO; 2021 [cited 2024 May 29]. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/338882>
13. Wang H, Li N, Chivese T, Werfalli M, Sun H, Yuan L, et al. IDF diabetes atlas: estimation of global and regional gestational diabetes mellitus prevalence for 2021 by International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group's Criteria. *Diabetes Res Clin Pract*. 2022;183:109050. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109050> PMID: 34883186
14. Silveira MF, Barros FC, Solowitz IK, Domingues MR, Mota DM, Fonseca SS, et al. Implementation of the INTERGROWTH-21st project in Brazil. *BJOG*. 2013;120(Suppl 2):81–6.
15. Agresti A. An introduction to categorical data analysis. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2006.
16. Allotey J, Stallings E, Bonet M, Yap M, Chatterjee S, 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. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3320> PMID: 32873575
17. Afshar Y, Gao SL, Fisherman VJ, Chambers BD, Krakow D, Barghella V, et al. Clinical presentation of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in pregnant and recently pregnant people. *Obstet Gynecol*. 2020;136(6):1117–25. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000004178> PMID: 33027186
18. Tanna R, Dugarte HJN, Kurakula S, Muralidharan V, Des A, Kanigalpula SPR. Review of impact of COVID-19 on maternal, neonatal outcomes, and placental changes. *Cureus*. 2022;14:e28631.
19. de Medeiros KS, Samartino ACA, Costa APF, Macêdo LT de A, da Silva LAS, de Freitas CL, et al. Consequences and implications of the coronavirus disease (COVID-19) on pregnancy and newborns: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Int J Gynaecol Obstet*. 2022;156(3):394–405. <https://doi.org/10.1002/ijgo.14015> PMID: 34762735
20. Fernandes CM, Sasaki LMP, Jardim-Santos CP, Schulte HL, Motta F, da Silva AP, et al. Panoramic snapshot of serum soluble mediator interplay in pregnant women with convalescent COVID-19: an exploratory study. *Front Immunol*. 2023;14:1176808. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1176808> PMID: 37122732
21. Brioschi Dos Santos AP, Vicente CR, Cola JP, Tanaka LF, Carlini JRT, Dell'Antonio LS, et al. The impact of COVID-19 on maternal death and fetal death: a cohort study in Brazil. *PLoS One*. 2023;18(8):e0290343. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0290343> PMID: 37500217
22. Maza-Arnedo F, Palomina-Calcado A, Sosa CG, de Mucio B, Rojas-Suarez J, Say L, et al. Maternal mortality linked to COVID-19 in Latin America: Results from a multi-country collaborative database of 447 deaths. *Lancet Reg Health Am*. 2022;12:100260. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2022.100260> PMID: 35530820
23. Costa ML, Souza RT, Pacagnella RC, Barilo SF, Ribeiro-do-Valle CC, Luz AG, et al. Brazilian network of COVID-19 during pregnancy (REBRACO): a multicentre study protocol. *BMJ Open*. 2021;11:e051284.
24. Takamoto M, Meneses MO, Andreucci CB, Knobel R, Sousa L, Katz L, et al. Clinical characteristics and risk factors for mortality in obstetric patients with severe COVID-19 in Brazil: a surveillance database analysis. *BJOG*. 2020;127(13):1618–26. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.16470> PMID: 32709381
25. Takamoto MLS, Meneses MO, Andreucci CB, Knobel R, Sousa LAR, Katz L. Maternal mortality and COVID-19. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2022;35:2355–61.

26. Takemoto M, S. Meneses M, de O, Andreucci CB, Nakamura-Pereira M, Amorim MMR, Katz L, et al. The tragedy of COVID-19 in Brazil: 124 maternal deaths and counting. *Int J Gynaecol Obstet*. 2020;151(1):154–6. <https://doi.org/10.1002/igo.13300> PMID: 32644220
27. European Centre for Disease Prevention and Control. SARS-CoV-2 variants of concern as of [data]. [cited 2025 Apr 21]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>
28. GISAID Initiative. Tracking of SARS-CoV-2 variants. [cited 2025 Apr 21]. Available from: <https://www.gisaid.org/hcov19-variants/>
29. Vieira DFB, Bandeira DM, da Silva MAN, de Almeida ALT, Araújo M, Machado AB, et al. Comparative analysis of SARS-CoV-2 variants Alpha (B.1.1.7), Gamma (P.1), Delta (P.2) and Delta (B.1.617.2) in Vero E6 cells: ultrastructural characterization of cytopathology and replication kinetics. *Braz J Infect Dis*. 2024;28(1):103706. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2023.103706> PMID: 38081327
30. Giovanetti M, Slavov SN, Fonseca V, Wilkinson E, Tagally H, Patané JSL, et al. Genomic epidemiology of the SARS-CoV-2 epidemic in Brazil. *Nat Microbiol*. 2022;7(9):1490–500. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01191-z> PMID: 35982313
31. Silva T de S, Salgado RS, Caglianini TS, Gomes JA, Pereira EC, de Oliveira E, et al. Molecular characterization of a new SARS-CoV-2 recombinant cluster XAG identified in Brazil. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:1008600. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1008600> PMID: 36250091
32. Maib V. SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccination in pregnancy. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(5):277–82. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00703-6> PMID: 35304596
33. Lekken EM, Huebner EM, Taylor GC, Hendrickson S, Vanderhoeven J, Kachikis A, et al. Disease severity, pregnancy outcomes, and maternal deaths among pregnant patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection in Washington State. *Am J Obstet Gynecol*. 2021;225(1):77.e1–e14. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.12.1221> PMID: 33515516
34. Grunebaum A, Dudenhausen J, Charvenak FA. Covid and pregnancy in the United States—an update as of August 2022. *J Perinat Med*. 2023;51:34–8.
35. Jamison DJ, Rasmussen SA. An update on COVID-19 and pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2022;226(2):177–86. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.08.054> PMID: 34534497
36. Wei SQ, Blouin-Bartrand M, Liu S, Auger N. The impact of COVID-19 on pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis. *CMAJ*. 2021;193(16):E540–8. <https://doi.org/10.1503/cmaj.202604> PMID: 33741725
37. Jafari M, Pormohammadi 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*. 2021;31(5):1–16. <https://doi.org/10.1002/rmv.2208> PMID: 33874448
38. Curoi 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*. 2021;225(5):522.e1–e11. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.05.016> PMID: 34023315
39. Ferrara A, Haddad MM, Zhu Y, Avalos LA, Kuzniawitz MW, Myers LC, et al. Perinatal complications in individuals in California with or without SARS-CoV-2 infection during pregnancy. *JAMA Intern Med*. 2022;182(5):503–12. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2022.0330> PMID: 35311909
40. Alkover N, Ragot G, Barachi A, Vauloup-Fellous C, Vivanti AJ, De Luca D. Systematic review and synthesis of stillbirths and late miscarriages following SARS-CoV-2 infections. *Am J Obstet Gynecol*. 2023;229(2):118–28. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2023.01.019> PMID: 36706855
41. Maib V. SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccination in pregnancy. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(5):277–82. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00703-6> PMID: 35304596
42. Lu Culligan A, Chavan AR, Vijayakumar P, Inshaid L, Courchaine EM, Milano KM, et al. Maternal respiratory SARS-CoV-2 infection in pregnancy is associated with a robust inflammatory response at the maternal-fetal interface. *Med*. 2021;2(5):591–610.e10. <https://doi.org/10.1016/j.med.2021.04.016> PMID: 33969332
43. Zanardo V, Tortora D, Sandri A, Severino L, Mesirca P, Straface G. COVID-19 pandemic: Impact on gestational diabetes mellitus prevalence. *Diabetes Res Clin Pract*. 2022;183:109149.
44. Ramirez Zegarra R, Dall'Asta A, Ravella A, Chi T. COVID-19 and gestational diabetes: the role of nutrition and pharmacological intervention in preventing adverse outcomes. *Nutrients*. 2022;14(17):3582. <https://doi.org/10.3390/nu14173582> PMID: 36079820
45. Guida JP de S, Andrade BC de, Pissinatti LCF, Rodrigues BF, Hartman CA, Costa ML. Prevalence of preeclampsia in Brazil: an integrative review. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2022;44(7):686–91. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1742680> PMID: 35130578
46. Gestational hypertension and preeclampsia: ACOG practice bulletin, number 222. *Obstet Gynecol*. 2020;135(6):e237–60. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000003891> PMID: 32443079
47. Agostinis C, Mangogna A, Balduta A, Aghamajidi A, Ricci G, Kishore U, et al. COVID-19, pre-eclampsia, and complement system. *Front Immunol*. 2021;12:775168. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.775168> PMID: 34888042
48. Sallam M. COVID-19 vaccine hesitancy worldwide: a concise systematic review of vaccine acceptance rates. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(2):160. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020160> PMID: 33660441
49. Moore D, Nahab MF, Camacho KG, Reis AT, Junqueira-Marinho MF, Abramov DM. Low COVID-19 vaccine hesitancy in Brazil. *Vaccine*. 2021;39:8262–8.

13.2 APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL Cerebrospinal fluid analysis of pregnant women at early stages of COVID-19. Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology.

Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology 61 (2022) 672–674



Contents lists available at ScienceDirect

Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology

journal homepage: www.tjog-online.com



Short Communication

Cerebrospinal fluid analysis of pregnant women at early stages of COVID-19



Lizandra Paravidine Sasaki^{a,b,*}, Geraldo Magela Fernandes^{b,c}, Angelo Pereira da Silva^a, Felipe Motta^{b,c}, Clara Siracusa^a, Isadora Pastrana Rabelo^d, Agenor dos Santos Junior^e, Paulo Sergio França^{a,b}, Patricia Kurisky^b, Rosana Maria Tristao^b, Cleandro de Albuquerque^b, Ciro Gomes^b, Licia Maria da Mota^b, Alberto Zaconeta^a

^a Department of Obstetrics and Gynecology, University of Brasília, Brasília, Brazil

^b Postgraduate Program in Medical Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil

^c Department of Pediatrics, University of Brasília, Brasília, Brazil

^d Regional Hospital of Asa Norte, Health Department, Brasília, Brazil

^e Central Laboratory of Public Health of the Federal District, Brasília, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 30 March 2022

Keywords:

COVID-19
Inflammation
Neurology
Pregnancy
SARS-CoV-2

ABSTRACT

Objective: To determine the presence or absence of SARS-CoV-2 in the cerebrospinal fluid of pregnant women at early stages of COVID-19.

Materials and methods: We conducted a prospective observational study with pregnant women undergoing cesarean section and real-time polymerase chain reaction to SARS-CoV-2 was performed in the cerebrospinal fluid in the early stages of COVID-19.

Results: Fourteen pregnant women, whose COVID-19 symptoms started between four to 18 days prior to delivery, were included. Eleven of the women reported anosmia, dysgeusia, and headaches and there were two fatal cases. SARS-CoV-2 was not present in the cerebrospinal fluid of these COVID-19 patients with early neurological symptoms, even in severe cases.

Conclusion: Our study suggests that peripheral cell damage and parainfectious phenomena may predominate over direct central nervous system injury in the pathophysiology of COVID-19 related early neurological symptoms on pregnant women.

© 2022 Taiwan Association of Obstetrics & Gynecology. Publishing services by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Several neurological signs and symptoms have been described in patients with coronavirus disease (COVID-19), but it is unknown whether they are due to direct nervous system invasion by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) or are secondary to inflammatory and immunological processes. Typically, headaches, anosmia, and dysgeusia occur in the initial disease stages, while more severe neurological conditions such as encephalitis, stroke, and seizures may appear later [1].

As most studies have not detected SARS-CoV-2 in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with severe neurological disorders [2,3], Pandani et al. proposed the interesting hypothesis that early

symptoms are caused by direct neurological injury when the viruses are present in the CSF, whereas later symptoms are due to immune-mediated damage upon SARS-CoV-2 clearance from the CSF [4]. However, as CSF analysis is usually reserved for patients with more severe neurological symptoms, it is currently unknown whether SARS-CoV-2 is actually present or not in the CSF in the early stages of COVID-19.

In pregnant women, hospitalizations due to COVID-19 occur mainly in the third trimester [5]; therefore, spinal anesthesia for those undergoing cesarean section is a great opportunity to assess the presence of SARS-CoV-2 in the CSF. We performed a study to determine the presence or absence of SARS-CoV-2 in the CSF of pregnant women at early stages of COVID-19.

* Corresponding author. Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF, CEP 70297-400, Brazil.

E-mail address: lizandra.sasaki@ebserh.gov.br (L.P. Sasaki).

<https://doi.org/10.1016/j.tjog.2022.03.043>

1028-4559/© 2022 Taiwan Association of Obstetrics & Gynecology. Publishing services by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Materials and methods

This study is part of a larger project - PRODEST: Effects of COVID-19 on pregnancy, childbirth, puerperium, neonatal period and child development; prospective, multicenter cohort study registered on the Brazilian Register of Clinical Trials (REBEC), RBR65QXS2, <https://ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-65qxs2/> and approved by the Research Ethics Committee of the University of Brasília School of Medicine (<http://www.fm.unb.br/cep-fm-CAAE-32359620.0.0000.5558>) [6]. All participants provided written, informed consent.

In this segment, we conducted a prospective observational study in women undergoing cesarean section at a COVID-19 referral hospital in Brasília, Brazil, from June 20 to August 18, 2020. COVID-19 was diagnosed based on the following criteria: (a) positive SARS-CoV-2 real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) on a nasopharyngeal swab specimen, (b) identification of serum antibodies to SARS-CoV-2 concomitantly with a chest computed tomography (CT) compatible with COVID-19, or (c) clinical symptoms suggestive of COVID-19 and a chest CT compatible with COVID-19.

We reserved a CSF sample from each woman when a lumbar puncture for spinal anesthesia was performed during the cesarean section. RT-PCR was performed with Molecular Research Institute of Paraná (Paraná, Brazil) or VIASURE SARS-CoV-2 (CerTest Biotech, Zaragoza, Spain) kits, whose detection limit is 4 copies per reaction.

Results

Fourteen pregnant women, whose COVID-19 symptoms started 4–18 days prior to delivery, were included. Among them, ten, three, and one had mild, severe, and critical diseases, respectively. Eleven reported anosmia, dysgeusia or headaches (Table 1).

There were two fatal cases, a critical disease patient who died 18 days postpartum due to respiratory failure and a severe disease patient whose respiratory condition was improving when she suddenly developed recurrent generalized tonic-clonic seizures and died 13 days postpartum. Angiotomography findings indicated posterior reversible encephalopathy syndrome, with no signs of thrombosis or hemorrhage. The CSF was SARS-CoV-2 RNA negative in all patients.

Discussion

Brain invasion by SARS-CoV-2 has been reported on humans and animal models but remains unclear whether and how the virus crosses the blood–brain barrier (BBB) [7–9]. Since severe neurological manifestations of COVID-19 typically occur after the acute phase, microbiological examination of the CSF was rarely performed in the early stages of the disease [10]. However, during the first wave of the COVID-19 we had the opportunity to analyze the CSF of pregnant women whose symptoms had started between four and eighteen days.

Our results indicate that SARS-CoV-2 is not present in the CSF of COVID-19 patients with early neurological symptoms and therefore these symptoms may be not attributable to direct viral injury to the central nervous system.

As headache is a ubiquitous, non-specific symptom frequently seen in other infectious diseases, it can be a systemic effect of the SARS-CoV-2 infection. On the other hand, anosmia and dysgeusia are recognized as cardinal symptoms of early stages of the disease and have been used as diagnostic markers. They are most often transient, with a regaining of smell and taste after several days to weeks. This sudden onset, followed by a rapid recovery, is a strong argument against neuronal damage as a cause, given the time course of neuronal regeneration. Additionally, there is currently no evidence that the SARS-CoV-2 virus itself can reach the brain in the acute phase of anosmia [11]. Therefore, since SARS-CoV-2 enters human cells via the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE 2) receptor that is expressed in the sustentacular cells of the olfactory epithelium but not in the olfactory sensory neurons, it has been proposed that anosmia and dysgeusia are secondary to olfactory epithelium damage [11].

Our data are in line with the growing evidence suggesting that parainfectious immune-mediated mechanism predominate over direct neurological injury in the pathophysiology of COVID-19 related neurological symptoms [1,12,13]. However, more studies are needed to determine the real entry routes of SARS-CoV-2 into the central nervous system, which pathogenic responses are triggered in infected cells and whether these mechanisms are influenced by pregnancy.

Table 1
Clinical features of pregnant women with COVID-19 and results of SARS-CoV-2 RNA testing of the cerebrospinal fluid.

N°	Diagnostic criteria	Severity	Neurological symptoms (at any time)	Days from first symptoms to delivery and CSF analysis	Interval between the nasopharyngeal and CSF PCR tests	CSF PCR results
1	PCR ^b	Severe	None	4	Same day	Negative
2	PCR ^b	Mild	Anosmia, dysgeusia	5	Same day	Negative
3	PCR ^b	Mild	Headaches	6	3 days	Negative
4	PCR ^b	Mild	Headaches, anosmia, dysgeusia	6	3 days	Negative
5	PCR ^b	Mild	Headaches	7	1 day	Negative
6	PCR ^b	Severe	Headaches, anosmia, dysgeusia	7	Same day	Negative
7	Ab ^c and CT ^d	Critical ^e	None	7	NA ^f	Negative
8	CT ^d	Mild	Headaches, anosmia, dysgeusia	8	NA ^f	Negative
9	CT ^d	Mild	None	9	NA ^f	Negative
10	PCR ^b	Severe ^f	Anosmia, Generalized tonic-clonic seizures, Brain CT: Posterior reversible encephalopathy syndrome	12	Same day	Negative
11	CT ^d	Mild	Anosmia, dysgeusia	13	NA ^f	Negative
12	PCR ^b	Mild	Headaches	13	11 days	Negative
13	Ab ^c and CT ^d	Mild	Headaches, anosmia, dysgeusia	14	NA ^f	Negative
14	PCR ^b	Mild	Anosmia, dysgeusia	18	18 days	Negative

Abbreviations: ^a CSF, cerebrospinal fluid; ^b PCR, polymerase chain reaction; ^c Ab, antibodies; ^d CT, computed tomography; ^e Death on the 18th day postpartum due to respiratory failure; ^f Death on the 13th day postpartum due to multiple organ failure; NA, not applicable.

Funding

This research did not receive any funding.

Declaration of competing interest

The authors have no conflicts of interest relevant to this article.

References

- [1] Pezzini A, Padovani A. Lifting the mask on neurological manifestations of COVID-19. *Nat Rev Neurol* 2020;16:336–44. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0398-3>.
- [2] Espindola OM, Siqueira M, Soares CN, Lima M, Leite A, Araujo A, et al. Patients with COVID-19 and neurological manifestations show undetectable SARS-CoV-2 RNA levels in the cerebrospinal fluid. *Int J Infect Dis* 2020;96:567–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.05.123>.
- [3] Helms J, Kremer S, Merdji H, Clere-Hughes R, Schenck M, Kummerlen C, et al. Neurologic features in severe SARS-CoV-2 infection. *N Engl J Med* 2020;382:2268–70. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2008597>.
- [4] Pandiani PP, Saraceno G, Zanin I, Renisi G, Signorini L, Battaglia L, et al. SARS-CoV-2: “Three-steps” infection model and CSF diagnostic implication. *Brain Behav Immun* 2020;87:128–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.05.002>.
- [5] Knight M, Bunch K, Voursden N, Morris E, Simpson N, Gale C, et al. Characteristics and outcomes of pregnant women admitted to hospital with confirmed SARS-CoV-2 infection in UK: national population based cohort study. *BMJ* 2020;369:m2107. <https://doi.org/10.1136/bmj.m2107>.
- [6] Fernandes GM, Motta F, Sasaki LMP, Silva APD, Miranda AM, Carvalho AO, et al. Pregnancy outcomes and child development effects of SARS-CoV-2 infection (PROUDTEST trial): protocol for a multicenter, prospective cohort study. *JMIR Res Protoc* 2021;20(4):e26477. <https://doi.org/10.2196/26477>.
- [7] Zhang L, Zhou L, Bao L, Liu J, Zhu H, Lv Q, et al. SARS-CoV-2 crosses the blood–brain barrier accompanied with basement membrane disruption without tight junctions alteration. *Signal Transduct Targeted Ther* 2021;6:337. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00719-9>.
- [8] Moriguchi T, Harui N, Goto J, Harada D, Sugawara H, Takamino J, et al. A first case of meningoencephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. *Int J Infect Dis* 2020;94:55–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.062>.
- [9] Puelles VG, Lütgehetmann M, Lindenmeyer MT, Sperhake JP, Wong MN, Allweiss L, et al. Multiorgan and renal tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* 2020;383(6):590–2. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2011400>.
- [10] Neumann R, Schmäbauer ML, Dimitriadis K, Otto S, Knier R, Niesen WD, et al. PANDEMIC and the IGNITE study groups. Cerebrospinal fluid findings in COVID-19 patients with neurological symptoms. *J Neurol Sci* 2020;418:117090. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.117090>.
- [11] Butowt R, von Bartheld CS. Anosmia in COVID-19: underlying mechanisms and assessment of an olfactory route to brain infection. *Neuroscientist* 2021 Dec;27(6):582–603. <https://doi.org/10.1177/1073858420956905>.
- [12] Baig AM, Khaleeq A, Ali U, Syeda H. Evidence of the COVID-19 virus targeting the CNS: tissue distribution, host–virus interaction, and proposed neurotropic mechanisms. *ACS Chem Neurosci* 2020;11(7):995–8. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c01222>.
- [13] Karnik M, Beeraka NM, Uthappa CA, Nataraj SM, Bettadapura AD, Aliev G, et al. A review on SARS-CoV-2-induced neuroinflammation, neurodevelopmental complications, and recent updates on the vaccine development. *Mol Neurobiol* 2021;58(9):4535–63. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02399-6>.

13.3 APÊNDICE C – ARTIGO ORIGINAL Pregnancy Outcomes and Child Development Effects of SARS-CoV-2 Infection Study (PROUDEST): a multicenter prospective cohort study protocol. JMIR Research Protocols.

JMIR RESEARCH PROTOCOLS

Fernandes et al

Protocol

Pregnancy Outcomes and Child Development Effects of SARS-CoV-2 Infection (PROUDEST Trial): Protocol for a Multicenter, Prospective Cohort Study

Geraldo Magela Fernandes^{1*}, MSc, MD; Felipe Motta^{1*}, MD; Lizandra Moura Paravidine Sasaki^{1*}, MSc, MD; Ângelo Pereira Da Silva², MD; Andreza Monforte Miranda³, MSc; Aleida Oliveira De Carvalho², BSc; Ana Paula Monteiro Gómes⁴, MD, PhD; Alexandre Anderson De Sousa Munhoz Soares¹, MD, PhD; Agenor De Castro Moreira Dos Santos Jr⁵, BSc; Caroline De Oliveira Alves¹, MSc, PhD; Ciro Martins Gomes¹, MD, PhD; Clara Correia De Siracusa¹, MD; David Alves De Araújo Jr², MD; Dayde Lane Mendonça-Silva², MSc, PhD; José Alfredo Lacerda De Jesus¹, MSc, MD, PhD; Karina Nascimento Costa¹, MSc, MD, PhD; Maria Eduarda Canellas De Castro², MD; Patricia Shu Kurizky², MD, PhD; Paulo Sérgio França¹, MSc, MD, PhD; Rosana Tristão¹, MSc, PhD; Yacara Ribeiro Pereira², BSc; Luiz Claudio Gonçalves De Castro¹, MSc, MD, PhD; Alberto Moreno Zaconeta¹, MSc, MD, PhD; Cleandro Pires De Albuquerque², MD; Licia Maria Henrique Da Mota¹, MD, PhD

¹Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília - DF, Brazil

²Department of Rheumatology, University Hospital of Brasília, Brasília, Brazil

³State Health Department of the Federal District, Brasília, Brazil

⁴Faculty of Medicine, University Center of Brasília, Brasília, Brazil

⁵Central Laboratory of Public Health of the Federal District, Brasília, Brazil

*these authors contributed equally

Corresponding Author:

Geraldo Magela Fernandes, MSc, MD

Faculty of Medicine

University of Brasília

Campus Universitário Darcy Ribeiro, UNB Área 1 - Asa Norte

Brasília - DF, 70910-900

Brazil

Phone: 55 61981070071

Email: geraldomaf@unb.br

Abstract

Background: A growing body of evidence suggests that SARS-CoV-2 infection during pregnancy may affect maternal-fetal outcomes and possibly result in implications for the long-term development of SARS-CoV-2-exposed children.

Objective: The PROUDEST (Pregnancy Outcomes and Child Development Effects of SARS-CoV-2 Infection Study) is a multicenter, prospective cohort study designed to elucidate the repercussions of COVID-19 for the global health of mothers and their children.

Methods: The PROUDEST trial comprises 2 prospective, sequential substudies. The *PREGNANT* substudy will clinically assess the effects of SARS-CoV-2 infection on pregnancy, childbirth, and puerperium from a mechanistic standpoint to elucidate the pregnancy-related inflammatory and immunological phenomena underlying COVID-19. Pregnant women aged 18–40 years who have been exposed (proven with laboratory tests) to SARS-CoV-2 (group A; n=300) will be compared to control subjects with no laboratory evidence of in-pregnancy exposure to the virus (group B; n=300). Subjects exposed to other infections during pregnancy will be excluded. The *BORN* substudy is a long-term follow-up study that will assess the offspring of women who enrolled in the prior substudy. It will describe the effects of SARS-CoV-2 exposure during pregnancy on children's growth, neurodevelopment, and metabolism from birth up to 5 years of age. It includes two comparison groups; group A (exposed; n=300) comprises children born from SARS-CoV-2-exposed pregnancies, and group B (controls; n=300) comprises children born from nonexposed mothers.

Results: Recruitment began in July 2020, and as of January 2021, 260 pregnant women who were infected with SARS-CoV-2 during pregnancy and 160 newborns have been included in the study. Data analysis is scheduled to start after all data are collected.

Conclusions: Upon completion of the study, we expect to have comprehensive data that will provide a better understanding of the effects of SARS-CoV-2 infection and related inflammatory and immunological processes on pregnancy, puerperium, and infancy. Our findings will inform clinical decisions regarding the care of SARS-CoV-2-exposed mothers and children and support the development of evidence-based public health policies.

Trial Registration: Brazilian Register of Clinical Trials RBR65QXS2; <https://ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-65qxs2>

International Registered Report Identifier (IRRID): DERR1-10.2196/26477

(JMIR Res Protoc 2021;10(4):e26477) doi: [10.2196/26477](https://doi.org/10.2196/26477)

KEYWORDS

SARS-CoV-2; COVID-19; pregnancy; neonate; children; outcome; development; prospective; cohort; women; fetus; baby; implication

Introduction

Background

The natural history of COVID-19, a disease caused by SARS-CoV-2, is still being written. Individuals infected with SARS-CoV-2 may present with a broad spectrum of clinical manifestations, from no symptoms to dramatically progressive disease symptoms that eventually result in death [1,2]. Some individuals develop intense inflammatory and procoagulant responses that can result in severe pulmonary damage, which is the main cause of COVID-19 morbidity and mortality.

The pathophysiological phenomena that take place in other human tissues that are potentially targeted by SARS-CoV-2 need further investigation. A central nervous system viral tropism has been postulated based on reports of neurological events such as stroke, acute hemorrhagic encephalopathy, seizures, and the loss of smell and taste [3,4].

To date, little is known about the effects of COVID-19 on women during pregnancy and puerperium [5,6] and its consequences for women's offspring (from the neonatal period through the first years of life) [7-9]. Thus, there is still a lack of a robust evidence base for the proper management of these mothers and children.

Data from previous epidemics of viral-induced respiratory distress syndrome have shown that pregnant and puerperal women have a high risk of developing life-threatening clinical outcomes [10]. These generally worse outcomes have been attributed to physiological changes in the immune and cardiopulmonary systems that occur during pregnancy [11]. Examples of epidemics include the H1N1 influenza, SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome coronavirus), and MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome coronavirus) epidemics, during which pregnancy mortality rates reached 27% [10,12,13].

Despite the structural similarities between coronaviruses, the initial reports for pregnant women with COVID-19 showed lower rates of intensive care unit admission, orotracheal intubation, and death during the SARS-CoV-2 outbreak than those during the SARS-CoV and MERS-CoV outbreaks [9,13]. However, more recent papers have shown higher morbidity and mortality rates among pregnant women than those among

nonpregnant women. Several aspects of embryo implantation [14], placental development [15], and delivery dynamics [16] seem to be impaired by the inflammatory response driven by immune cell subtypes at the maternal-fetal interface [17]. Such phenomena may precipitate preeclampsia, spontaneous abortion, intrauterine growth restriction, and premature birth [18-21].

Most of the available data on pregnant women exposed to SARS-CoV-2 were obtained during the second half of pregnancy. Thus, SARS-CoV-2 infection during all stages of pregnancy, including the early stages of gestation, has not been fully investigated. Nevertheless, as the disease spreads worldwide, more women are being exposed to the virus during early gestation and midgestation, and new data have been accruing [22].

Studies evaluating the vertical transmission of SARS-CoV-2 are still inconclusive [6,23-25]. Investigations of placentas from women infected with SARS-CoV-2 have suggested that there is a low likelihood of viral transplacental transmission. However, the potentially hazardous effects of inflammatory and prothrombotic environments on placental function and, consequently, fetal growth could not be ruled out [26-28].

To date, the few reports on postnatally infected neonates have shown that they exhibit either no symptoms or mild clinical forms of COVID-19 with favorable outcomes. However, the younger the infant is, the higher the risk of critical outcomes [22,29].

Maternal SARS-CoV-2 infection would potentially expose a fetus not only to direct viral effects but also to the placental inflammatory response and the maternal cytokine storm [5,7,22]. Such processes and their consequences have not been extensively studied. The understanding of these phenomena should contribute to the proper management of children born to mothers infected with SARS-CoV-2.

A case series on the clinical aspects of newborns of COVID-19-exposed mothers reported a low risk of adverse outcomes for late pregnancy exposure and stated that there is a paramount need for close follow-ups [30]. Other reports have presented data showing no adverse effects on neonates born to mothers who tested positive for COVID-19. Furthermore, Liu et al [31] described 19 completely asymptomatic neonates from Wuhan, China.

A few studies however have reported that SARS-CoV-2 test-negative neonates born to mothers who tested positive and developed critical illnesses might present ominous clinical profiles. This is suggestive of the potential impact of inflammatory processes on fetal physiology. Romagano et al [32] reported a prevalence rate of 6.9% for symptomatic pregnant women infected with SARS-CoV-2 among 1053 deliveries at a large hospital network in New Jersey, United States. They reported that 8 pregnant women were critically ill and 7 neonates tested negative (via reverse transcriptase-polymerase chain reaction [RT-PCR]); 1 neonate was not yet delivered at the time of testing. All neonates were preterm and appropriately sized for their gestational age except for one (small for their gestational age). They were all separated from their mothers after delivery, and all of them developed respiratory distress and required neonatal intensive care unit admission. Anemia and hyperbilirubinemia of prematurity, temperature instability, and feeding problems were reported in some of the neonates.

Several other studies have reported symptoms among SARS-CoV-2 test-negative neonates born to mothers with COVID-19, such as rashes [33], facial ulceration [33], the need for noninvasive oxygen support [33], transient lymphocytopenia [34], impaired liver function [34], disseminated intravascular coagulation, and even multiple organ failure leading to death [35]. There are many critical questions regarding the standards of care for SARS-CoV-2-exposed pregnant women and their offspring that have yet to be answered, and guidelines are still being developed around the world [8,36,37]. Therefore, the overall purpose of this study is to describe the effects of in-pregnancy SARS-CoV-2 infection and related inflammatory and immunological phenomena on the health of SARS-CoV-2-exposed women and their offspring.

Objective

Our specific aims are (1) to study the effects of COVID-19 on maternal and obstetric morbidity and mortality, including those of indicators such as preeclampsia, abortion, fetal malformation,

fetal growth, and premature birth; (2) to investigate the presence of SARS-CoV-2 and anti-SARS-CoV-2 antibodies in the cerebrospinal fluid (CSF) of women with symptomatic COVID-19 undergoing spinal anesthesia for a cesarean section; (3) to determine the serum proinflammatory and regulatory cytokine profiles of pregnant women with symptomatic COVID-19; (4) to determine the CSF proinflammatory and regulatory cytokine profiles of pregnant women with symptomatic COVID-19 undergoing spinal anesthesia for a cesarean section; (5) to study the histopathological markers of inflammatory and thrombotic phenomena in the placenta; (6) to study the correlations between the aforementioned serum and histologic biomarkers of COVID-19 and the outcomes of pregnancy, delivery, puerperium, and childbirth as well as the correlations between biomarkers and short- and long-term health outcomes during infancy; (7) to study the association between the use of maternal pharmacological therapy for treating COVID-19 and offspring's health outcomes; (8) to evaluate the effects of COVID-19 exposure during different stages of pregnancy on fetal, neonatal, and infantile morbidity and mortality; and (9) to evaluate the effects of in-pregnancy COVID-19 exposure on children's somatic and neurological development and energy metabolism from birth up to 5 years of age.

Methods

Study Design

The PRODEST (Pregnancy Outcomes and Child Development Effects of SARS-CoV-2 Infection Study) is a multicenter, longitudinal, prospective observational study that will be conducted in two sequential stages—the *PREGNANT* and *BORN* branches (or substudies). Each stage will have two parallel groups (exposed and nonexposed) for comparisons. The PRODEST is designed to address the multifaceted questions surrounding the impact of COVID-19 exposure during pregnancy on the global health of mother-child dyads (Figure 1).

Figure 1. Pregnancy Outcomes and Child Development Effects of SARS-CoV-2 Infection Study follow-up flowchart.



The *PREGNANT* substudy will follow—until day 21 postpartum—pregnant women who are exposed to SARS-CoV-2 at any phase of gestation and compare them to a control group consisting of nonexposed pregnant women. The *BORN* substudy will follow the children of the women included in the preceding (*PREGNANT*) branch. These children will be allocated into two comparison groups (exposed and nonexposed) according to their mothers' in-pregnancy exposure status and will be followed up by a multidisciplinary team of health professionals

from birth up to the age of 5 years. This team will conduct regular consultations every month up until the children reach 6 months of age, every 3 months up until the children reach 2 years of age, and every 6 months up until the children reach 5 years of age. Mothers and children may attend nonscheduled visits, as needed, for clinical reasons as well as specific appointments for conducting the procedures and tests described in this protocol.

The PRODEST will be conducted from July 2020 to December 2026 in Brasília, Brazil. The recruitment of pregnant and newborn dyads will be carried out by using data from the Epidemiological Surveillance Center of the Federal District. These mother-fetus dyads will be followed up to childbirth (and puerperium in the case of mothers) until December 2021, which is when the last included dyads are expected to undergo childbirth in two different hospitals—the University Hospital of Brasília and Asa Norte Regional Hospital (the reference public medical center for COVID-19 in the Federal District in Brazil). Both hospitals are located in central urban areas and are included in the Brazilian public health system (Sistema Único de Saúde), which primarily serves the low-income population. Thus, the results of the PREGNANT substudy will be published as soon as the analyses are completed. The children will be followed from childbirth up to December 2026, which is when the last admitted neonate will turn 5 years old. As the BORN substudy is lengthy, partial results may be disclosed during the course of the study, but the final data set will be made available in the second half of 2026.

Pregnant women included in the study must be aged >18 years. COVID-19 exposure will be defined as a first-time RT-PCR test, serology test, or rapid test that returns positive results during pregnancy and is confirmed by a second test. Nonexposure to COVID-19 will be defined as asymptomatic pregnant women with negative serology tests (immunoglobulin G [IgG] and immunoglobulin M [IgM] tests), which will be conducted at 14–21 days postpartum.

Pregnant women with preexisting chronic diseases (except diabetes and hypertension); those taking continuous medications; those who consume tobacco, alcohol, or other drugs; and those with other suspected or confirmed congenital infections will be excluded.

Neonates whose mothers qualified for inclusion in the PREGNANT substudy (had these women been screened) may also be admitted to the BORN substudy, even if their mothers did not participate in the preceding branch.

Children initially assigned to the control (nonexposed) group who later become infected with SARS-CoV-2 (as confirmed via laboratory tests) during follow-up will be excluded from all analyses (from the time of SARS-CoV-2 infection diagnosis onward). However, they will continue to receive assistance under the same standards until the end of the study.

Sample Size Calculation

No precise data are available on the prevalence of SARS-CoV-2 infection among pregnant women in Brazil, but international reports have estimated that up to 15.3% of all pregnancies have been exposed to the virus [38]. Recent data have indicated a birth rate of 44,195 newborns per year in the Federal District [39]. Thus, after considering an “infinite” population (>20,000 pregnant women), assuming a 15% prevalence of SARS-CoV-2-exposed pregnancies, and accounting for a confidence level of 95% and a margin of error of 5%, the minimum sample size for a random sample of SARS-CoV-2-exposed women would be 195. This calculation expectedly yielded a similar number for a random sample of SARS-CoV-2-exposed children. If we set the expected dropout rate for the BORN substudy to 20%, the required number of SARS-CoV-2-exposed mothers (those giving birth to the BORN participants) would increase to 234.

Our sampling approach however is not truly random; it is based on convenience, as eligible subjects will present to the recruitment centers. The aforementioned calculations only serve as a reference for avoiding the overestimation of the inclusion of participants. Given the limited amount of available knowledge regarding the effects of SARS-CoV-2 infection on pregnancy and child development, which resulted in the eminently exploratory character of our study, we adopted an “as much as feasible, but no more than reasonable” approach for defining the sample size.

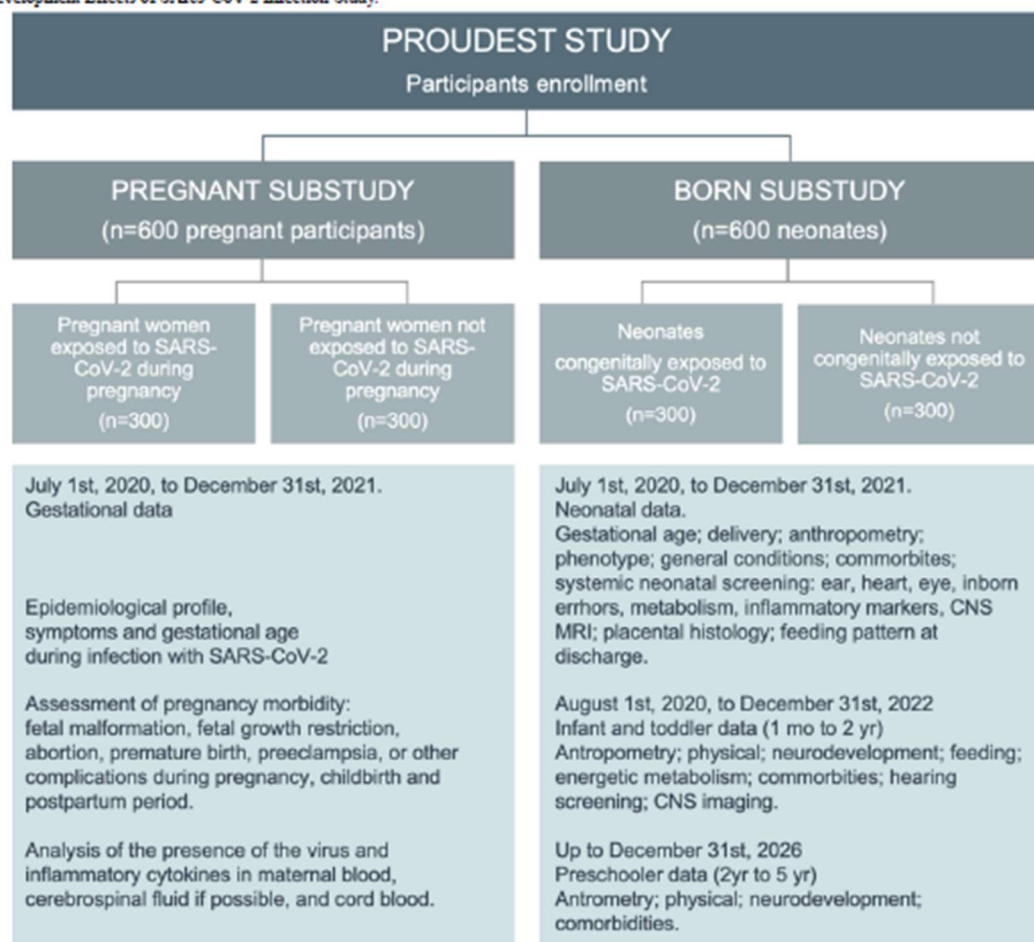
We set an a priori number of 300 SARS-CoV-2-exposed women for the PREGNANT phase. This will result in the inclusion of the expected 300 SARS-CoV-2-exposed children in the BORN phase. The subject allocation rate between the exposed and control groups was 1:1. This indicated the need for an additional 300 mothers and 300 children to constitute the nonexposed control groups. Hence, the overall sample size of the PRODEST was set to 1200 participants (600 mother-child dyads consisting of 300 SARS-CoV-2-exposed mother-child dyads and 300 control dyads).

To promote participant retention and completed follow-ups at pregnancy and pediatric outpatient clinics, we will actively search for patients via phone and email.

Procedures

A host of clinical, psychological, neurodevelopmental, biochemical, histological, and imaging assessments will be conducted in accordance with the PRODEST protocol (Figure 2).

Figure 2. PROUDEST study design. CNS: central nervous system; MRI: magnetic resonance imaging; PROUDEST: Pregnancy Outcomes and Child Development Effects of SARS-CoV-2 Infection Study.



Prenatal data from both the pregnant women and their fetuses will be gathered during the follow-up at the Pregnancy Outpatient Clinic of the University Hospital of Brasília. These data will consist of the medical and sociodemographic data of the mothers; gestational age; symptoms, interventions, and outcomes related to COVID-19 (for SARS-CoV-2-exposed participants); congenital infection screening results; hypertensive disorders and other pregnancy-specific morbidities; general health assessments; general physical examinations; routine clinical biochemistry tests; and ultrasound scans. These scans will be performed between gestational weeks 11-13 and gestational day 6, from gestational week 22 to gestational week 24, and on a monthly basis in the third trimester of pregnancy to assess fetal growth and morphology, placental morphology, amniotic fluid volume, and dopplerflowmetry results. Maternal blood will be collected at the first prenatal consultation, regardless of gestational age. Antenatal consultations will occur monthly up to week 34, every 2 weeks between weeks 34 and 36, and then weekly up to delivery. During pregnancy, psychological risk assessments and mental health screens will

be performed with the Beck Depression Inventory during the first prenatal consultation. [40]. Individual psychological care will be provided to pregnant women who have a Beck Depression Inventory score of ≥ 12 . Mothers will also be physically and psychologically evaluated between days 7 and 21 postpartum during the PREGNANT substudy and after the BORN substudy.

At childbirth, assessments will be conducted to identify the occurrence of dysfunctional labor and the premature rupture of membranes, the type of birth, and delivery outcomes. We will also conduct physical examinations and classifications of the newborns and anthropometry. The early initiation of breastfeeding, the need for neonatal intensive care, and the type of interventions will also be identified. Maternal blood, CSF from women undergoing spinal anesthesia for a cesarean section, and umbilical cord blood samples will be collected.

CSF will be collected immediately before the infusion of the medicine for spinal anesthesia, which will be injected via a sterile syringe at an average dosage of 0.5 ml. CSF will be

collected in a 4-mL cryotube. Blood samples from mothers and the umbilical cord will be collected in a heparinized tube and centrifuged immediately, and the plasma will be stored in 4-mL sealed cryotubes. CSF and blood samples will be subsequently stored at -80°C for later analysis. The assessment of blood cell counts, inflammation markers (C-reactive protein and procalcitonin), biochemistry (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, ferritin, alkaline phosphatase, and lactic dehydrogenase) and SARS-CoV-2 tests (RT-PCR and IgM and IgG antibody tests) will be carried out.

Circulating cytokine levels will be evaluated with the Luminex Bio-Plex Pro Human Cytokine 27 platform (Bio-Rad Laboratories). The cytokine profile assessment will analyze chemokines (CXC motif chemokine ligand [CXCL] 8, CC motif chemokine ligand [CCL] 11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, and CXCL10), proinflammatory cytokines (interleukin [IL]-1 β , IL-6, tumor necrosis factor, IL-12p70, interferon γ , IL-17A, and IL-15), regulatory cytokines (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, and IL-13), and cell growth factors (IL-2, IL-7, basic fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor, vascular endothelial growth factor, granulocyte colony-stimulating factor, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). All procedures will be performed according to the manufacturer's recommendations.

Analyses will be performed at the clinical biochemistry laboratories of the hospitals where delivery occurred (blood cell count, C-reactive protein, procalcitonin, and routine biochemistry assessments), the Central Laboratory of the Federal District Department of Health (Laboratório Central de Saúde Pública; SARS-CoV-2 tests), and the University of Brasília laboratory (cytokine profile assessments).

The placenta will be subjected to fresh histopathological analyses for assessing possible morphological and histological changes that may be associated with SARS-CoV2 infection. Histopathological analysis will be conducted according to the Amsterdam protocol [41].

Peripheral blood and CSF samples from the newborns will only be collected if there is clinical need; this will not be done per the routine research protocol. If such specimens are made available, they will also be subjected to the aforementioned analyses.

All newborns will undergo neonatal screening tests in accordance with the recommendations of the Ministry of Health of Brazil. Five drops of blood will be collected on filter paper for the national neonatal screening program. This blood sample will be collected after 48 hours of life and will be used to screen for the following diseases: phenylketonuria, congenital hypothyroidism, biotinidase deficiency, cystic fibrosis, and congenital adrenal hyperplasia. After 24 hours of life and before discharge, a pulse oximetry test will be performed. Oxygen saturation in the right upper limb and one of the lower limbs will be measured. The pulse oximetry test will be considered normal if oxygen saturation is $\geq 95\%$ and the difference between the limbs is not $\geq 3\%$. Hearing screening will be performed between 36 and 48 hours of life by analyzing otoacoustic emissions.

After hospital discharge, all neonates will be followed up at the Pediatric Outpatient Clinic of the University Hospital of Brasília. Child growth and neurodevelopment will be assessed at all visits. The first visit will be scheduled to occur on day 15 postpartum. Afterward, visits will be conducted monthly during the first 6 months of life. Thereafter, visits will be scheduled every 3 months until the children reach 12 months of age and every 6 months until the children reach 5 years of age. Nonscheduled visits may occur due to urgent clinical needs. The outpatient clinic staff (a multidisciplinary team) will be composed of pediatricians, psychologists, occupational therapists, speech therapists, physiotherapists, and nurses. The psychological effects of SARS-CoV-2 infection on mothers will be assessed with the Edinburgh Postnatal Depression Scale [42]. This assessment will occur more than once until their children reach 6 months of age. Breastfeeding and weaning patterns, dietary habits, nutritional status, and vaccinal status will be assessed throughout the study.

The assessment of children's neurodevelopment will be carried out until they reach the 60th month of life. This assessment will analyze cognitive, motor, socioemotional, and language-related aspects and adaptive behavior. The evaluation will be conducted by using the Bayley III Child Development Scale (ie, the version validated for Brazilian infants) [43]. From the age of 2.5 years onward, aspects related to intellectual performance will also be assessed by using the Wechsler Preschool and Primary Intelligence Scale, third edition at 6-month intervals [44].

Central nervous system imaging assessments will be carried out via transcranial ultrasound doppler scans, which will be performed between the 15th and 90th day of the child's life. A brain magnetic resonance imaging scan will be performed if altered cephalic perimeter measures, neurological development delays, or abnormal ultrasound doppler scan findings are identified.

Blood will be collected from SARS-CoV-2-exposed children aged 12 and 24 months to assess their metabolic profiles, which will be used to identify the long-term effects of SARS-CoV-2 infection on systemic metabolism that are potentially driven by past viral exposure and associated inflammatory responses. The examination will consist of assessments for energy metabolism markers (serum lipids, glucose, and insulin), thyroid function markers (thyroid-stimulating hormone and free thyroxine), bone metabolism markers (parathyroid hormone, calcium, phosphate, alkaline phosphatase, and 25-hydroxyvitamin D), adrenal tumor indicators (adrenocorticotrophic hormone and basal cortisol), and renal function markers (blood urea nitrogen, creatinine, and urine analysis results).

All newborns will undergo extended hearing screening. Evoked otoacoustic emission and brainstem auditory-evoked potential tests will be performed during the child's first year of life.

Statistical Analysis

All data will be stored in REDCap (Research Electronic Data Capture; Vanderbilt University), which is a tool for building and managing web-based surveys and databases. All variables will be summarized via standard descriptive techniques according to their type and distribution. For the bivariate

analysis, differences in categorical variables between the exposed and unexposed groups will be verified with the Chi-square test or Fisher exact test, whereas differences in continuous variables between the groups will be assessed with the Student *t* test or the Mann-Whitney U test.

For dichotomous outcomes, binomial regression models, which will be adjusted based on the unbalanced and relevant background features of the comparison groups, will be used to estimate the relative risks between the exposed and nonexposed groups. Partial correlation and general linear models will be used to assess the associations between continuous outcome variables and covariates; adjustments for imbalances will be made as appropriate. A *P* value of <0.05 will be considered significant. The control group will be composed of nonexposed mother-child dyads that meet the inclusion criteria. However, those with positive serology tests (IgG and IgM tests conducted at 14–21 days postpartum) will not be included in the control group. The groups will not be matched or paired based on age or other variables. However, any differences between the groups will be adjusted later via statistical means.

Ethics Approval and Consent to Participate

The PRODEST was approved by the Research Ethics Committee of the University of Brasília School of Medicine (Certificado de Apresentação de Apreciação Ética 32359620.0.0000.5558) [45]. It was also registered in the Brazilian Register of Clinical Trials [46]. All pregnant women participating in the PRODEST are required to sign an informed consent form to join the PREGNANT branch. Likewise, the participation of the children in the BORN branch will require signed, informed consent from their mothers. The 6-month reports on the study's status and its partial results will be made available to the institutional Research Ethics Committee and may be publicly consulted upon request.

Availability of Data and Materials

At the time of the publication of this protocol, study enrollment and data collection have already started, but we have not completed the participant recruitment and data analysis phases. Therefore, data sharing is not yet feasible, as no data sets have been generated or analyzed at this stage of the study. As partial data become available, they will be displayed in the Brazilian Register of Clinical Trials [46].

Results

The PRODEST is in the data collection phase. Study recruitment started in July 2020. As of January 2021, a total of 260 pregnant women who were infected with SARS-CoV-2 during pregnancy and 180 newborns from hospitals in the Federal District in Brazil have been included in the study. Data analysis is scheduled to start after all data are collected.

Discussion

Study Implications

The PRODEST offers comprehensive insight (from both the obstetric and pediatric perspectives) into the effects of SARS-CoV-2 infection on the global health of pregnant women

and their offspring. Specifically, the study will fill the deep gap in knowledge about the consequences of SARS-CoV-2 infection during early gestation (ie, the period when the critical stages of embryogenesis take place), as women in all stages of pregnancy will be followed. The virus-induced inflammatory and immunological phenomena that occur in SARS-CoV-2-exposed mothers during this early period of life may have a particular impact on placental and fetal physiology or may even be associated with epigenetic signals. Therefore, these phenomena could conceivably affect the long-term outcomes of a child's growth, development, and metabolism.

A better understanding of these potential long-term consequences requires lengthy, prospective observational studies, such as the PRODEST. This study will not only address the clinical outcomes associated with in-pregnancy exposure to COVID-19 but also evaluate a host of soluble tissue biomarkers (as described in this protocol) with the aim of comprehensively understanding the mechanisms underlying related clinical phenomena.

Our data will add to the overall clinical and basic knowledge base for COVID-19, and our ultimate goal is to provide grounds for better managing SARS-CoV-2-exposed pregnant women and their children through direct means or by setting the stage for additional studies. In fact, the PRODEST opens up a broad spectrum of possibilities for further, multidisciplinary research on the effects of SARS-CoV-2 infection on maternal, fetal, and pediatric health. Furthermore, our results might prove to be relevant from a social perspective, as they may provide data that support the tailored development and implementation of health policies that are specifically oriented to this particular demographic group.

The study does have several limitations. Its observational nature limits inferences for causal associations to some extent. However, the cohort study design is the closest observational equivalent to a clinical trial in terms of analytical power, and the objective of the PRODEST does not ethically allow for interventional experiments because such experiments would imply that pregnant women will be randomized based on SARS-CoV-2 infection. Moreover, the purpose of the study is to characterize the clinical and pathophysiological phenomena associated with SARS-CoV-2 infection during pregnancy and infancy, not to test the efficacy of any intervention. Thus, we believe that a cohort study is the best possible study design for addressing our objectives. The lack of random allocation for comparison groups will be partially compensated by statistically adjusting for the observed imbalances. Vaccination for SARS-CoV-2 will not be an exclusion criterion because due to the vaccine's limited accessibility and availability, there are no feasible methods for estimating the proportion of pregnant women that will receive the vaccine. However, the effects of SARS-CoV-2 vaccination can be adjusted and analyzed in small control groups that have either received or not received the vaccine.

The protracted follow-up in the BORN substudy is expected to result in the dropout of several participants. We set a sample size for the study after taking into consideration a 20% loss to follow-up rate. This might ensure that a sizable number of

children are available for the final assessment when they reach age of 5 years. However, we cannot avoid survival bias in the long-term data. Nevertheless, given that the continuity of multidisciplinary assistance will be guaranteed for all children in the BORN branch throughout the study period regardless of their withdrawal from the analysis or (temporary) losses to follow-up, we expect that children experiencing health problems associated with in-pregnancy COVID-19 exposure will be less likely to drop out than those who are in perfect health. Therefore, we do expect to have a sufficient number of children in the long run for identifying developmental abnormalities (should they exist), even after some amount of dropout.

Several routine pediatric consultations will be emphasized in the study, such as checking the kind of alimentation that a child

is receiving (human milk or formula milk) and promoting the practice of breastfeeding.

Conclusions

The PRODEST is a long-term, prospective cohort study designed to provide a comprehensive analysis of the effects of in-pregnancy exposure to COVID-19 on women and their offspring from a clinical and pathophysiological standpoint. Our results might contribute to the improvement of the management of SARS-CoV-2-exposed mother-child dyads—through direct means or by setting the stage for future related studies—by providing knowledge on the clinical-pathophysiological phenomena associated with COVID-19 exposure among this particular population.

Acknowledgments

We are immensely grateful for the contributions of all participants among the mother-child dyads, medical students, residents, and health professional staff from the participating hospitals; their support is essential for conducting our study. The resources used in outpatients' follow-ups, ambulatorial consultations, and complementary exams (diagnostic imaging and laboratorial studies) are provided by the University Hospital of Brasília, Asa Norte Hospital of Brasília, and the Central Laboratory of Public Health of the Federal District. All public institutes are funded by the Brazilian health care system (Sistema Único de Saúde).

Authors' Contributions

GF, LS, and FM are cofirst authors. GMF, LS, FM, ACZ, and LMHM drafted and finalized the manuscript. CPA, GM, LS, ACZ, and MECC provided input. AASS, COA, DAAJ, JALJ, RMT, LCGC, and CPA critically reviewed the manuscript. All authors made insightful contributions. All authors have read and approved the manuscript.

Conflicts of Interest

None declared.

References

- Harapan H, Itoh N, Yufika A, Winardi W, Kean S, Te H, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review. *J Infect Public Health* 2020 May;13(5):667-673 [FREE Full text] [doi: [10.1016/j.jiph.2020.03.019](https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.03.019)] [Medline: [32340833](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32340833/)]
- Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J Autoimmun* 2020 May;109:102433 [FREE Full text] [doi: [10.1016/j.jaut.2020.102433](https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102433)] [Medline: [32113704](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32113704/)]
- Whittaker A, Anson M, Harky A. Neurological manifestations of COVID-19: A systematic review and current update. *Acta Neurol Scand* 2020 Jul;142(1):14-22 [FREE Full text] [doi: [10.1111/ane.13266](https://doi.org/10.1111/ane.13266)] [Medline: [32412088](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32412088/)]
- Acharya A, Kevadiya BD, Gendelman HE, Byrareddy SN. SARS-CoV-2 infection leads to neurological dysfunction. *J Neuroimmune Pharmacol* 2020 Jun;15(2):167-173 [FREE Full text] [doi: [10.1007/s11481-020-09924-9](https://doi.org/10.1007/s11481-020-09924-9)] [Medline: [32447746](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32447746/)]
- Dashraath P, Wong JJJ, Lim MXK, Lim LM, Li S, Biswas A, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic and pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2020 Jun;222(6):521-531 [FREE Full text] [doi: [10.1016/j.ajog.2020.03.021](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.03.021)] [Medline: [32217113](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32217113/)]
- Li Y, Zhao R, Zheng S, Chen X, Wang J, Sheng X, et al. Lack of vertical transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, China. *Emerg Infect Dis* 2020 Jun;26(6):1335-1336 [FREE Full text] [doi: [10.3201/eid2606.200287](https://doi.org/10.3201/eid2606.200287)] [Medline: [32134381](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32134381/)]
- Chen D, Yang H, Cao Y, Cheng W, Duan T, Fan C, et al. Expert consensus for managing pregnant women and neonates born to mothers with suspected or confirmed novel coronavirus (COVID-19) infection. *Int J Gynaecol Obstet* 2020 May;149(2):130-136 [doi: [10.1002/ijgo.13146](https://doi.org/10.1002/ijgo.13146)] [Medline: [32196655](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32196655/)]
- Amatya S, Corr TE, Gandhi CK, Glass KM, Kresch MJ, Mujica DJ, et al. Management of newborns exposed to mothers with confirmed or suspected COVID-19. *J Perinatol* 2020 Jul;40(7):987-996 [FREE Full text] [doi: [10.1038/s41372-020-0695-0](https://doi.org/10.1038/s41372-020-0695-0)] [Medline: [32439956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32439956/)]
- Juan J, Gil MM, Rong Z, Zhang Y, Yang H, Poon LC. Effect of coronavirus disease 2019 (COVID-19) on maternal, perinatal and neonatal outcome: systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2020 Jul;56(1):15-27 [FREE Full text] [doi: [10.1002/uog.22088](https://doi.org/10.1002/uog.22088)] [Medline: [32430957](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32430957/)]
- Xie M, Chen Q. Insight into 2019 novel coronavirus - An updated interim review and lessons from SARS-CoV and MERS-CoV. *Int J Infect Dis* 2020 May;94:119-124 [FREE Full text] [doi: [10.1016/j.ijid.2020.03.071](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.071)] [Medline: [32247050](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32247050/)]

11. Naccasha N, Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Berman S, Yoon BH, Maymon E, et al. Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in normal pregnancy and maternal infection. *Am J Obstet Gynecol* 2001 Nov;185(5):1118-1123. [doi: [10.1067/mob.2001.117682](https://doi.org/10.1067/mob.2001.117682)] [Medline: [11717644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11717644/)]
12. Jamieson DJ, Honein MA, Rasmussen SA, Williams JL, Swardlow DL, Biggerstaff MS, Novel Influenza A (H1N1) Pregnancy Working Group. H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA. *Lancet* 2009 Aug 8;374(9688):451-458. [doi: [10.1016/S0140-6736\(09\)61304-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61304-0)] [Medline: [19643469](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19643469/)]
13. Favre G, Pomar L, Musso D, Baud D. 2019-nCoV epidemic: what about pregnancies? *Lancet* 2020 Feb 22;395(10224):e40 [FREE Full text] [doi: [10.1016/S0140-6736\(20\)30311-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30311-1)] [Medline: [32035511](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32035511/)]
14. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci* 2011 Mar;1221(1):80-87 [FREE Full text] [doi: [10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x)] [Medline: [21401634](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21401634/)]
15. Robson A, Harris LK, Innes BA, Lash GE, Aljunaidy MM, Aplin JD, et al. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *FASEB J* 2012 Dec;26(12):4876-4885. [doi: [10.1096/fj.12-210310](https://doi.org/10.1096/fj.12-210310)] [Medline: [22919072](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22919072/)]
16. Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006 Oct;11(5):317-326. [doi: [10.1016/j.siny.2006.05.001](https://doi.org/10.1016/j.siny.2006.05.001)] [Medline: [16839830](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16839830/)]
17. Sacks GP, Studena K, Sargent K, Redman CW. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol* 1998 Jul;179(1):80-86. [doi: [10.1016/S0002-9378\(98\)70254-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(98)70254-6)] [Medline: [9704769](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9704769/)]
18. Kalagiri RR, Carder T, Choudhury S, Vora N, Ballard AR, Govande V, et al. Inflammation in complicated pregnancy and its outcome. *Am J Perinatol* 2016 Dec;33(14):1337-1356. [doi: [10.1055/s-0036-1582397](https://doi.org/10.1055/s-0036-1582397)] [Medline: [27159203](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27159203/)]
19. Yang X, Yang Y, Yuan Y, Liu L, Meng T. The roles of uterine natural killer (NK) cells and KIR/HLA-C combination in the development of preeclampsia: A systematic review. *Biomed Res Int* 2020 Mar 28;2020:4808072 [FREE Full text] [doi: [10.1155/2020/4808072](https://doi.org/10.1155/2020/4808072)] [Medline: [32309433](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32309433/)]
20. Tomimatsu T, Mimura K, Matsuzaki S, Endo M, Kumasawa K, Kimura T. Preeclampsia: Maternal systemic vascular disorder caused by generalized endothelial dysfunction due to placental antiangiogenic factors. *Int J Mol Sci* 2019 Aug 30;20(17):4246 [FREE Full text] [doi: [10.3390/ijms20174246](https://doi.org/10.3390/ijms20174246)] [Medline: [31480243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31480243/)]
21. Gierman LM, Silva GB, Pervaiz Z, Rakner JJ, Mundal SB, Thaning AJ, et al. TLR3 expression by maternal and fetal cells at the maternal-fetal interface in normal and preeclamptic pregnancies. *J Leukoc Biol* 2021 Jan;109(1):173-183. [doi: [10.1002/JLB.3MA0620-728RR](https://doi.org/10.1002/JLB.3MA0620-728RR)] [Medline: [32573856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32573856/)]
22. De Rose DU, Piersigilli F, Ronchetti MP, Santisi A, Bersani I, Dotta A, Study Group of Neonatal Infectious Diseases of The Italian Society of Neonatology (SIN). Novel coronavirus disease (COVID-19) in newborns and infants: what we know so far. *Ital J Pediatr* 2020 Apr 29;46(1):56 [FREE Full text] [doi: [10.1186/s13052-020-0820-x](https://doi.org/10.1186/s13052-020-0820-x)] [Medline: [32349772](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32349772/)]
23. Zeng L, Xia S, Yuan Y, Yan K, Xiao F, Shao J, et al. Neonatal early-onset infection with SARS-CoV-2 in 33 neonates born to mothers with COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Pediatr* 2020 Jul 01;174(7):722-725 [FREE Full text] [doi: [10.1001/jamapediatrics.2020.0878](https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2020.0878)] [Medline: [32215598](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32215598/)]
24. Dong L, Tian J, He S, Zhu C, Wang J, Liu C, et al. Possible vertical transmission of SARS-CoV-2 from an infected mother to her newborn. *JAMA* 2020 May 12;323(18):1846-1848 [FREE Full text] [doi: [10.1001/jama.2020.4621](https://doi.org/10.1001/jama.2020.4621)] [Medline: [32215581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32215581/)]
25. Alzamora MC, Paredes T, Caceres D, Webb CM, Valdez LM, La Rosa M. Severe COVID-19 during pregnancy and possible vertical transmission. *Am J Perinatol* 2020 Jun;37(8):861-865 [FREE Full text] [doi: [10.1055/s-0040-1710050](https://doi.org/10.1055/s-0040-1710050)] [Medline: [32305046](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32305046/)]
26. Shanes ED, Mithal LB, Otero S, Azad HA, Miller ES, Goldstein JA. Placental pathology in COVID-19. *Am J Clin Pathol* 2020 Jun 08;154(1):23-32 [FREE Full text] [doi: [10.1093/ajcp/aqaa089](https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa089)] [Medline: [32441303](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32441303/)]
27. Baergen RN, Heller DS. Placental pathology in Covid-19 positive mothers: Preliminary findings. *Pediatr Dev Pathol* 2020;23(3):177-180 [FREE Full text] [doi: [10.1177/1093526620925569](https://doi.org/10.1177/1093526620925569)] [Medline: [32397896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32397896/)]
28. Baud D, Greub G, Favre G, Gengler C, Jaton K, Dubruc E, et al. Second-trimester miscarriage in a pregnant woman with SARS-CoV-2 infection. *JAMA* 2020 Jun 02;323(21):2198-2200 [FREE Full text] [doi: [10.1001/jama.2020.7233](https://doi.org/10.1001/jama.2020.7233)] [Medline: [32352491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32352491/)]
29. Dong Y, Mo X, Hu Y, Qi X, Jiang F, Jiang Z, et al. Epidemiology of COVID-19 among children in China. *Pediatrics* 2020 Jun;145(6):e20200702. [doi: [10.1542/peds.2020-0702](https://doi.org/10.1542/peds.2020-0702)] [Medline: [32179660](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32179660/)]
30. Yang P, Wang X, Liu P, Wei C, He B, Zheng J, et al. Clinical characteristics and risk assessment of newborns born to mothers with COVID-19. *J Clin Virol* 2020 Jun;127:104356 [FREE Full text] [doi: [10.1016/j.jcv.2020.104356](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104356)] [Medline: [32302955](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32302955/)]
31. Liu W, Wang J, Li W, Zhou Z, Liu S, Rong Z. Clinical characteristics of 19 neonates born to mothers with COVID-19. *Front Med* 2020 Apr;14(2):193-198 [FREE Full text] [doi: [10.1007/s11684-020-0772-y](https://doi.org/10.1007/s11684-020-0772-y)] [Medline: [32285380](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32285380/)]
32. Romagosa MP, Guerrero K, Spillane N, Kayaalp E, Smilen SW, Alvarez M, et al. Perinatal outcomes in critically ill pregnant women with coronavirus disease 2019. *Am J Obstet Gynecol MFM* 2020 Aug 01;2(3):100151 [FREE Full text] [doi: [10.1016/j.ajogmf.2020.100151](https://doi.org/10.1016/j.ajogmf.2020.100151)]

33. 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* 2020 Mar 16;8:104 [FREE Full text] [doi: [10.3389/fped.2020.00104](https://doi.org/10.3389/fped.2020.00104)] [Medline: [32266184](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32266184/)]
34. Wang S, Guo L, Chen L, Liu W, Cao Y, Zhang J, et al. A case report of neonatal 2019 coronavirus Disease in China. *Clin Infect Dis* 2020 Jul 28;71(15):853-857 [FREE Full text] [doi: [10.1093/cid/ciaa225](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa225)] [Medline: [32161941](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32161941/)]
35. Zhu H, Wang L, Fang C, Peng S, Zhang L, Chang G, et al. Clinical analysis of 10 neonates born to mothers with 2019-nCoV pneumonia. *Transl Pediatr* 2020 Feb;9(1):51-60 [FREE Full text] [doi: [10.21037/tp.2020.02.06](https://doi.org/10.21037/tp.2020.02.06)] [Medline: [32154135](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32154135/)]
36. de Carvalho WB, Gibelli MABC, Krebs VLJ, Calil VMLT, Johnston C. Expert recommendations for the care of newborns of mothers with COVID-19. *Clinics (Sao Paulo)* 2020;75:e1932 [FREE Full text] [doi: [10.6061/clinics/2020/e1932](https://doi.org/10.6061/clinics/2020/e1932)] [Medline: [32428112](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32428112/)]
37. Amaez J, Montes MT, Herranz-Rubia N, Garcia-Alix A. The impact of the current SARS-CoV-2 pandemic on neonatal care. *Front Pediatr* 2020 Apr 30;8:247 [FREE Full text] [doi: [10.3389/fped.2020.00247](https://doi.org/10.3389/fped.2020.00247)] [Medline: [32426312](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32426312/)]
38. 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 May 28;382(22):2163-2164 [FREE Full text] [doi: [10.1056/NEJMc2009316](https://doi.org/10.1056/NEJMc2009316)] [Medline: [32283004](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32283004/)]
39. Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (Sinasc). Governo Do Estado, Secretaria Da Saúde. URL: <http://www.saude.ba.gov.br/sinisa/vigilancia-epidemiologica/sistema-de-informacoes-sobre-nascidos-vivos-sinasc/> [accessed 2020-10-25]
40. Beck AT, Steer RA, Brown GK. Manual for the Beck Depression Inventory-II. San Antonio, TX: American Psychological Corporation; 1996.
41. Khong TY, Mooney EE, Ariel I, Balmus NCM, Boyd TK, Brundler MA, et al. Sampling and definitions of placental lesions: Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement. *Arch Pathol Lab Med* 2016 Jul;140(7):698-713 [FREE Full text] [doi: [10.5858/arpa.2015-0225-CC](https://doi.org/10.5858/arpa.2015-0225-CC)] [Medline: [27223167](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27223167/)]
42. Cox JL, Holden JM, Sagovsky R. Detection of postnatal depression. Development of the 10-item Edinburgh Postnatal Depression Scale. *Br J Psychiatry* 1987 Jun;150:782-786. [doi: [10.1192/bjp.150.6.782](https://doi.org/10.1192/bjp.150.6.782)] [Medline: [3651732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3651732/)]
43. Madaschi V, Mecca TP, Macedo EC, Paula CS. Bayley-III scales of infant and toddler development: Transcultural adaptation and psychometric properties. *Paidéia (Ribeirão Preto)* 2016 Aug;26(64):189-197 [FREE Full text] [doi: [10.1590/1982-43272664201606](https://doi.org/10.1590/1982-43272664201606)]
44. Karino CA, Laros JA, de Jesus GR. Evidências de validade convergente do SON-R 2½-7[a] com o WPPSI-III e WISC-III. *Psicol Reflex Crit* 2011;24(4):621-629 [FREE Full text] [doi: [10.1590/s0102-79722011000400001](https://doi.org/10.1590/s0102-79722011000400001)]
45. Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina. Universidade de Brasília. URL: <http://www.fm.umb.br/cap-fm> [accessed 2021-04-09]
46. RBR-65qxs2 Effects of COVID-19 on pregnancy, childbirth, puerperium, neonatal period and child development: prospective, multicenter cohort study. Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos. URL: <https://ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-65qxs2/> [accessed 2021-04-09]

Abbreviations

- CCL: CC motif chemokine ligand
 CNS: central nervous system
 CSF: cerebrospinal fluid
 CXCL: CXC motif chemokine ligand
 IgG: immunoglobulin G
 IgM: immunoglobulin M
 IL: interleukin
 MERS-CoV: Middle East respiratory syndrome coronavirus
 PRODEST: Pregnancy Outcomes and Child Development Effects of SARS-CoV-2 Infection Study
 REDCap: Research Electronic Data Capture
 RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction
 SARS-CoV: severe acute respiratory syndrome coronavirus

Edited by G Eysenbach; submitted 13.12.20; peer-reviewed by JM Kerver, C Kaliaperumal; comments to author 27.01.21; revised version received 02.02.21; accepted 25.02.21; published 20.04.21

Please cite as:

Fernandes GM, Motta F, Sasaki LMP, Silva APD, Miranda AM, Carvalho AOD, Gomides APM, Soares AADSM, Santos Jr ADCMD, Alves CDO, Gomes CM, Siracusa CCD, Araújo Jr DAD, Mendonça-Silva DL, Jesus JALD, Costa EN, Castro MECD, Kurizky PS, França PS, Tristão R, Pereira YR, Castro LCGD, Zaconeta AM, Albuquerque CPD, 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;10(4):e26477

URL: <https://www.researchprotocols.org/2021/4/e26477>

doi: [10.2196/26477](https://doi.org/10.2196/26477)

PMID: [33792409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33792409/)

©Geraldo Magela Fernandes, Felipe Motta, Lizandra Moura Paravidine Sasaki, Ângelo Pereira Da Silva, Andreza Monforte Miranda, Aleida Oliveira De Carvalho, Ana Paula Monteiro Gomides, Alexandre Anderson De Sousa Munhoz Soares, Agenor De Castro Moreira Dos Santos Jr, Caroline De Oliveira Alves, Ciro Martins Gomes, Clara Correia De Siracusa, David Alves De Araújo Jr, Dayde Lane Mendonça-Silva, José Alfredo Lacerda De Jesus, Karina Nascimento Costa, Maria Eduarda Canellas De Castro, Patricia Shu Kurizky, Paulo Sérgio França, Rosana Tristão, Yacara Ribeiro Pereira, Luiz Claudio Gonçalves De Castro, Alberto Moreno Zaconeta, Cleandro Pires De Albuquerque, Licia Maria Henrique Da Mota. Originally published in JMIR Research Protocols (<https://www.researchprotocols.org>), 20.04.2021. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work, first published in JMIR Research Protocols, is properly cited. The complete bibliographic information, a link to the original publication on <http://www.researchprotocols.org>, as well as this copyright and license information must be included.

13.4 APÊNDICE D – ARTIGO ORIGINAL Panoramic snapshot of serum soluble mediator interplay in pregnant women with convalescent COVID-19: an exploratory study. *Frontiers in Immunology*

**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^{3*†}
✉ geraldofm@igmail.com
Olindo Assis Martins-Filho
✉ olindo.filho@focuz.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 Araújo 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 Ad,
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^{3*†},
Lizandra Moura Paravidine Sasaki^{1,2†},
Gabriela Profírio 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,
Patrícia 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 periconceptional 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 PRODEST (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 PRBXXPNy), 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).

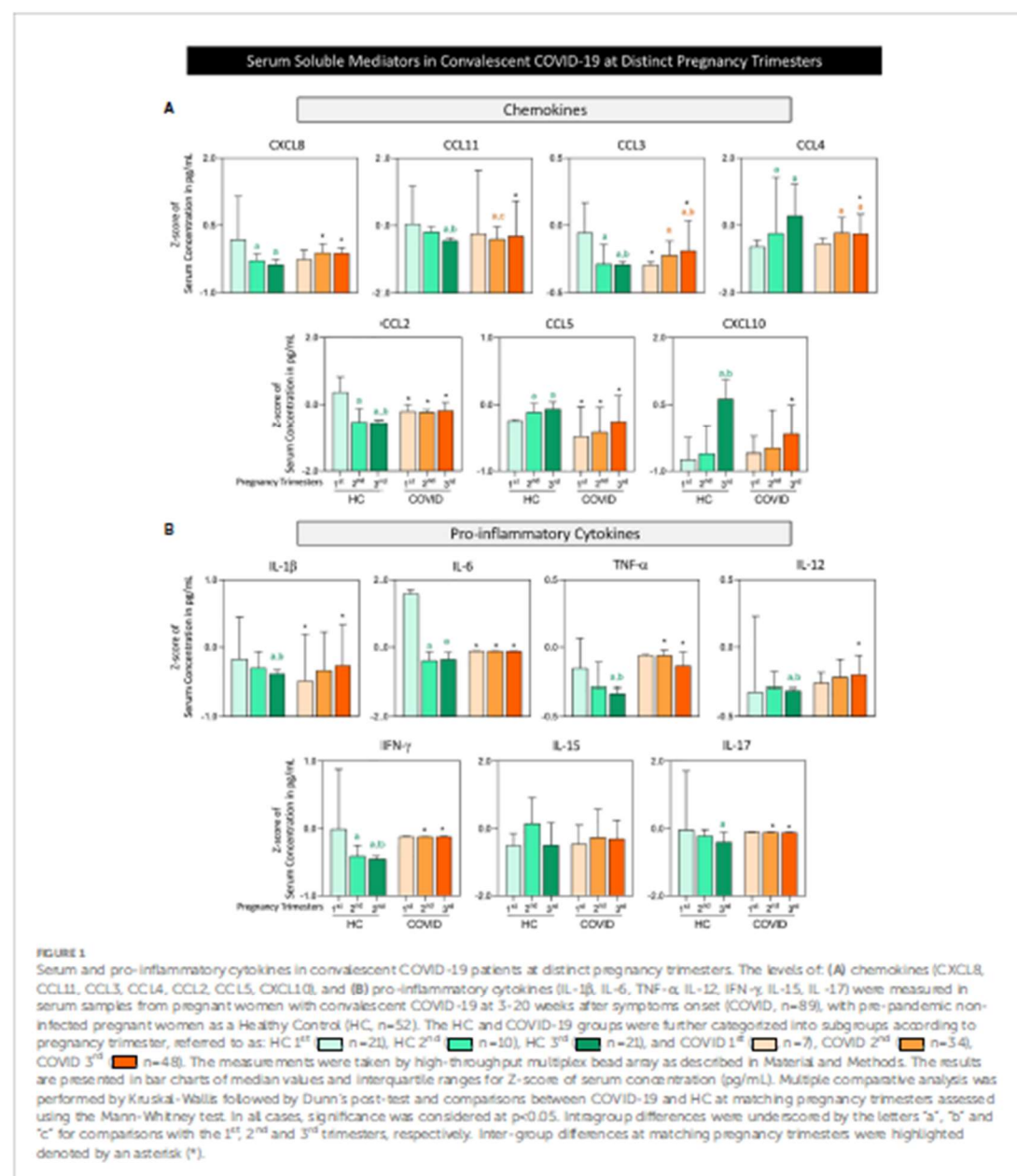
On the other hand, the proportion of pregnant women with convalescent COVID-19 presenting high serum soluble mediator levels progressively increased from the 1st to the 3rd pregnancy trimester (Figure 3A). Heatmap constructs further illustrated that the major increase in serum soluble mediators observed 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

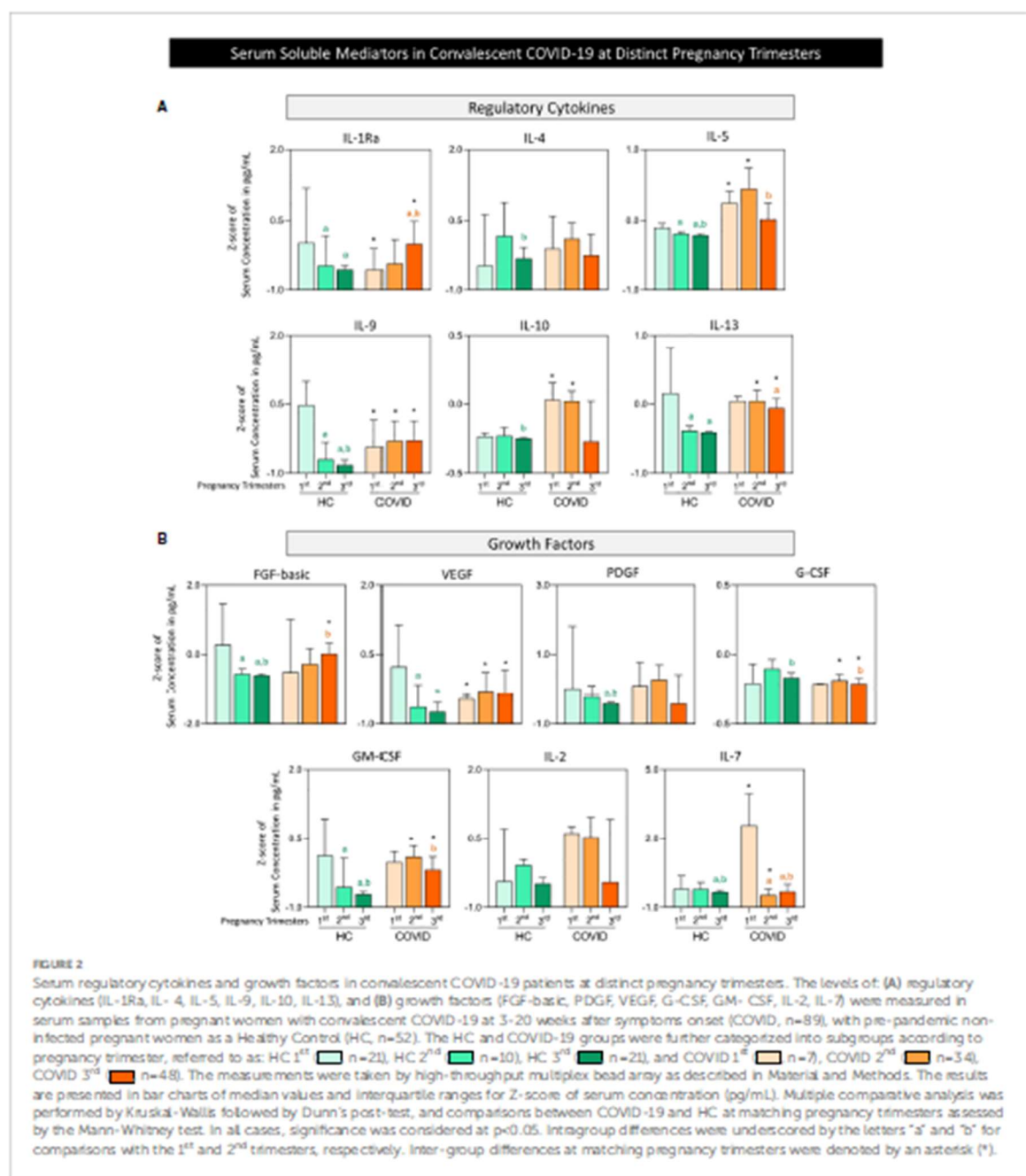


based on the overall correlation between pairs of molecules. The results are presented in Figure 4.

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

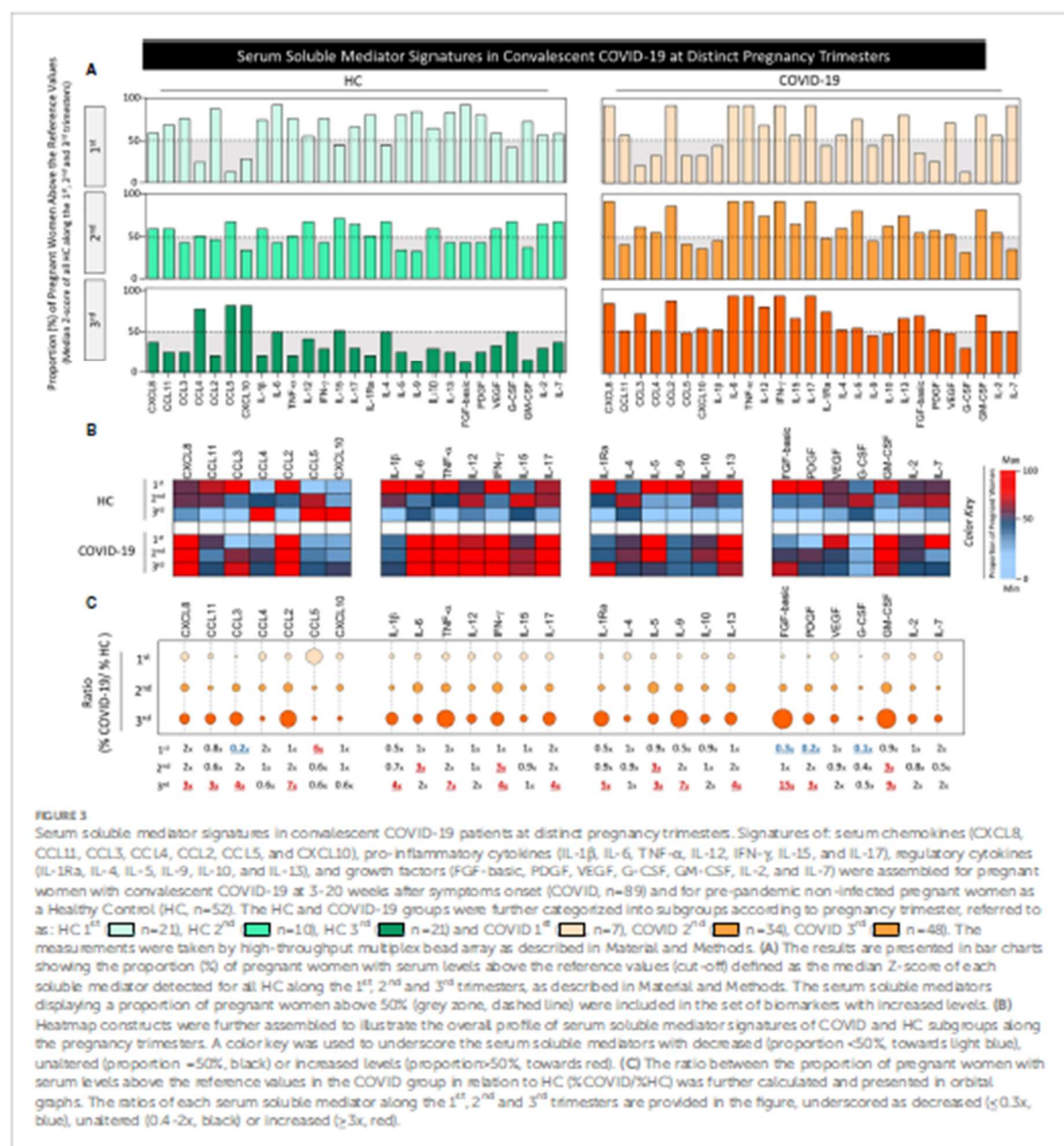


correlations, respectively), with growth factor predominance at the 3rd trimester (42 strong correlations). Conversely, the COVID group displayed a predominance of regulatory cytokines in the 1st trimester (47 strong correlations) with growth factor predominance in the 2nd and 3rd trimesters (24 and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

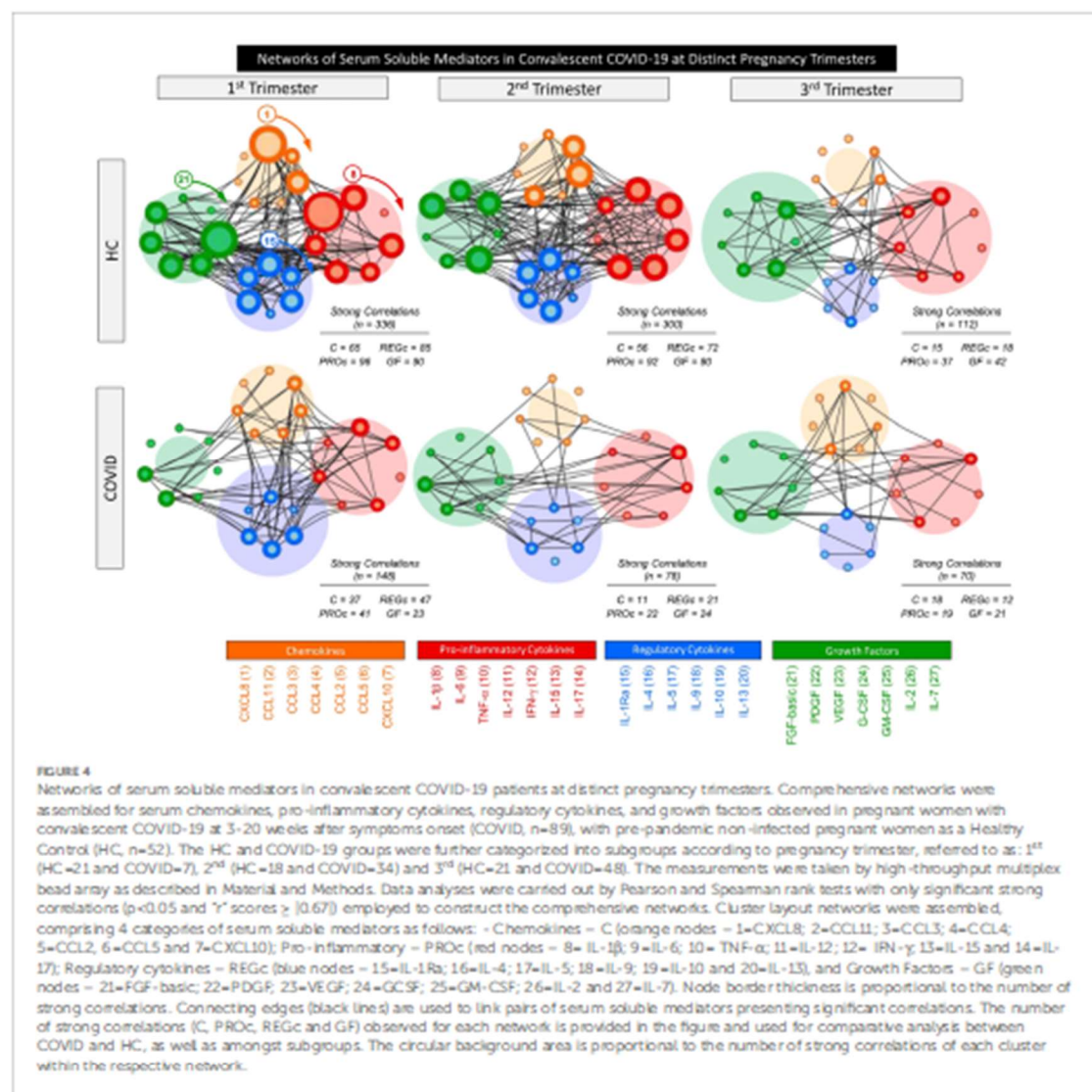


performed to identify the set of biomarkers with preserved (common), lost or acquired (selective) attributes with five or more (≥ 5) strong correlations in COVID subgroups as compared to the trimester-matching HC group. The results are presented in the Figure 5.

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).

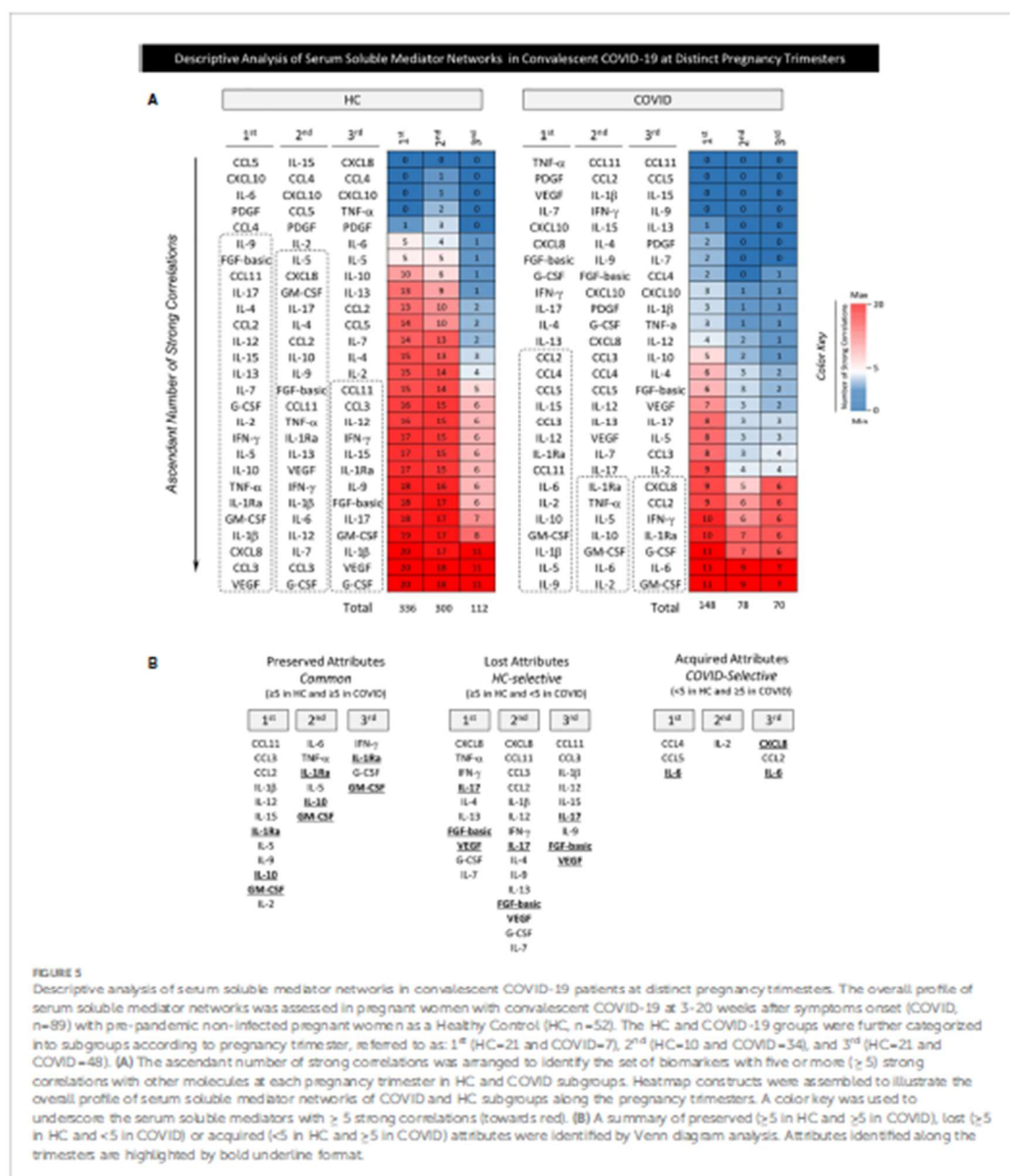
Data analysis demonstrated that the number of preserved attributes referred to as common in HC and COVID (≥ 5 strong correlations in HC and COVID) with five or more correlations progressively decreased from the 1st ($n=12$) to the 2nd ($n=6$) and 3rd trimesters ($n=4$). In detail: 1st: CCL11, CCL3, CCL2, IL-1 β , IL-12, IL-15, IL-1Ra, IL-5, IL-9, IL-10, 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-1β, IL-12, IFN-γ, IL-17, IL-4, IL-9, IL-13, FGF-basic, VEGF, G-CSF, and IL-7; 3rd: CCL11, CCL3, IL-1β, 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

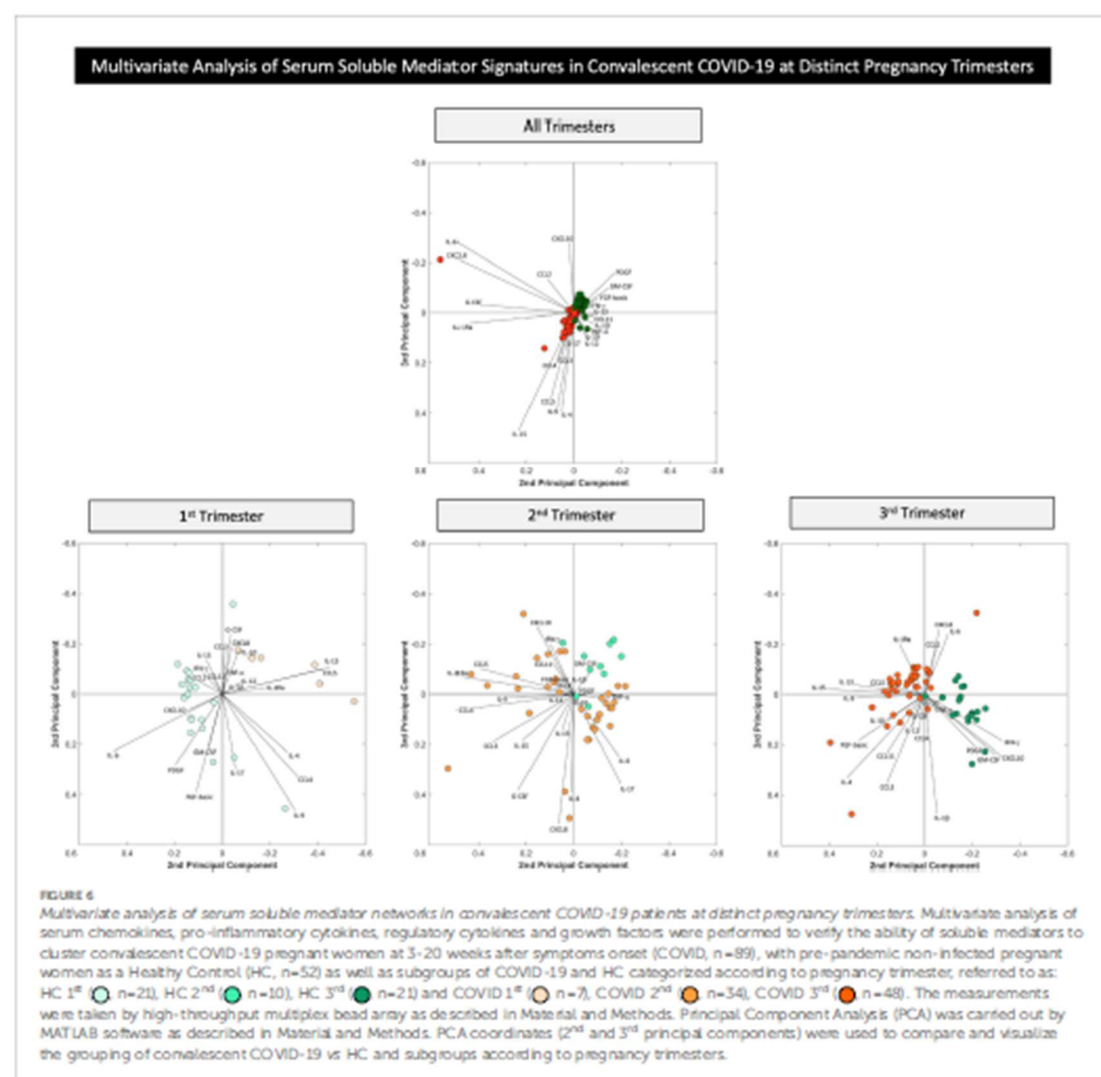


attributes, named COVID-selective (≥5 strong correlations in COVID and <5 in HC) (Figure 5B, bold underline attributes).

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, RGF-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 32359620.0.000.5558). 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: AS, 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, Idriouli Saik I, Guissou 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
- Akura 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
- Alotey 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, Atili S, Gunier RB, Thiruvengadam R, Rauch S, Khodin 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 BF, Huntley ES, di Mascio D, Chen T, Berghella V, Chaulhan 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
- Sawa VM, Parisi F, Patané L, Ferruzzi 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 CTMR, Somo 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, Somo 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, Suaki LMP, da Silva AP, Miranda AM, de Carvalho AO, et al. Pregnancy outcomes and child development effects of SARS-CoV-2 infection (PROUDTEST trial): Protocol for a multicenter, prospective cohort study. *JMIR Res Protoc* (2021) 10(4):e26477. doi: 10.2196/26477
- Spence T, Allsopp PL, Yates AJ, Mallhorn MS, Strain JL, 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, Gao 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. *Fertil Steril* (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 I, Townson J, Groves D, Milton R, et al. Pregnancy and neonatal outcomes of COVID-19: The PAN-COVID study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (2022) 276:161–7. doi: 10.1016/j.ejogrb.2022.07.010
22. Jamund AH, Giskendeged GF, Ryndal M, Steinkjer B, Stokkeland LMT, Madsen 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, Raghuvaran 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/ajri.12818
24. Tartaglia E, Bordon V, Oliva A, Vengari 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, Habeshallah 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: 10.1080/10641963.2016.1205596
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.0b013e318226277
27. Simavi S, Derbent AU, Uyal 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, Bævre K, Persson JO, van Vollenhoven RF, Sverremark-Ekström E, Holmström U. Pregnancy-associated inflammatory markers are elevated in pregnant women with systemic lupus erythematosus. *Cytokine* (2012) 59(2):392–9. doi: 10.1016/j.cyto.2012.04.046
29. Lindsay K, Bus C, Wadliwa P, Entinger 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, Ekbieta 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, Giskendeged GF, Stridsklev S, Ryan L, Steinkjer B, Tangen L, et al. Serum cytokine patterns in first half of pregnancy. *Cytokine* (2019) 119:188–96. doi: 10.1016/j.cyto.2019.03.013
32. Doris A, Gato M, Ghinadello 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, Ghinadello 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, Wadliwa P. Interferon and proinflammatory cytokines in pregnancy and fetal development. *Immunol* (2018) 49(3):397–412. doi: 10.1016/j.immuni.2018.07.017
35. Vitić A, Naka-Aleković M, Pirković A, Bojić-Tabojević Ž, Dekanović D, Jovanović K, et al. 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.cyto.2016.08.031
37. Ross KM, Miller G, Cullane J, Grobman W, Simhan HN, Wadliwa 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/ajri.12563
38. Wildin SS, Gerber S, Ledger WJ. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Gin Infect Dis* (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. Kimura Y, Akdij C, Cengiz C, Ocan H, Tatlakazan S, Ucu 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/S0303-2115(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. Numaishi M, Lotze MT, Suzuki 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. Numaishi M, Takahashi H, Tomioka Y, Suzuki 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. Numaishi M. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* (2003) 101(7):2620–7. doi: 10.1182/blood-2002-05-1461
46. Takahashi H, Numaishi M, Lotze MT, Suzuki 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. Numaishi 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. Cornelijs DC, Lamacz 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.cyto.2013.02.027
50. Liu H, Liu A, Kamings 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, Kutzky, Nobrega, Espindola, de Castro, Alpoim, Godoi, Dusse, Coelho-dos-Reis, Amaral, Gomes, Bertolini, Brito-de-Souza, 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). 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.

13.5 APÊNDICE E – ARTIGO ORIGINAL Neuroimaging assessment of pediatric cerebral changes associated with SARS-CoV-2 infection during pregnancy. *Frontiers in Pediatrics*.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Bilal J. Govindaswami,
Valley Medical Center Foundation, United States

REVIEWED BY
Joseph Schulman,
California Department of Health Care Services,
United States
Sonya Misra,
Santa Clara Valley Medical Center, United States

*CORRESPONDENCE
David Alves de Araujo Junior
✉ david.junior@bsbrh.gov.br

*These authors have contributed equally to this work and share first authorship

*These authors share senior authorship

RECEIVED 26 March 2023

ACCEPTED 26 April 2023

PUBLISHED 24 May 2023

CITATION

Alves de Araujo Junior D, Motta F,
Fernandes GM, Castro MECD, Sasaki LMP,
Luna LP, Rodrigues TS, Kurizky PS,
Soares AADSM, Nobrega Odf, Espindola LS,
Zaconeta AM, Gomes CM, Martins-Filho OA,
Albuquerque CPd and Mota LMHd (2023)
Neuroimaging assessment of pediatric cerebral
changes associated with SARS-CoV-2 infection
during pregnancy.
Front. Pediatr. 11:1194114.
doi: 10.3389/fped.2023.1194114

COPYRIGHT

© 2023 Alves de Araujo Junior, Motta,
Fernandes, Castro, Sasaki, Luna, Rodrigues,
Kurizky, Soares, Nobrega, Espindola, Zaconeta,
Gomes, Martins-Filho, Albuquerque and Mota.
This is an open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](#). 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.

Neuroimaging assessment of pediatric cerebral changes associated with SARS-CoV-2 infection during pregnancy

David Alves de Araujo Junior^{1,2,3,4*}, Felipe Motta^{1,2,3†},
Geraldo Magela Fernandes^{1,2,3}, Maria Eduarda Canellas
De Castro^{1,2,3}, Lizandra Moura Paravidine Sasaki^{1,2,3},
Licia Pacheco Luna³, Thalys Sampaio Rodrigues⁴,
Patricia Shu Kurizky^{1,2,3}, Alexandre Anderson De Sousa
Munhoz Soares³, Otavio de Toledo Nobrega³,
Laila Salmen Espindola³, Alberto Moreno Zaconeta³,
Ciro Martins Gomes^{1,2,3}, Olindo Assis Martins-Filho⁶,
Cleandro Pires de Albuquerque^{1,2,3†} and
Licia Maria Henrique da Mota^{1,2,3†}

¹Department of Medicine, University of Brasilia (UnB), Brasilia, Brazil, ²Hospital Universitario de Brasilia (HU B), Brasilia, Brazil, ³Medical Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil, ⁴Department of Medicine, Austin Health, University of Melbourne, Melbourne, VIC, Australia, ⁵Russell H. Morgan Department of Radiology and Radiological Science, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, United States, ⁶Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Minas), Belo Horizonte, Brazil

Background: SARS-CoV-2 infection and perinatal neurologic outcomes are still not fully understood. However, there is recent evidence of white matter disease and impaired neurodevelopment in newborns following maternal SARS-CoV-2 infection. These appear to occur as a consequence of both direct viral effects and a systemic inflammatory response, with glial cell/myelin involvement and regional hypoxia/microvascular dysfunction. We sought to characterize the consequences of maternal and fetal inflammatory states in the central nervous system of newborns following maternal SARS-CoV-2 infection.

Methods: We conducted a longitudinal prospective cohort study from June 2020 to December 2021, with follow-up of newborns born to mothers exposed or not exposed to SARS-CoV-2 infection during pregnancy. Brain analysis included data from cranial ultrasound scans (CUS) with grayscale, Doppler studies (color and spectral), and ultrasound-based brain elastography (shear-wave mode) in specific regions of interest (ROIs): deep white matter, superficial white matter, corpus callosum, basal ganglia, and cortical gray matter. Brain elastography was used to estimate brain parenchymal stiffness, which is an indirect quantifier of cerebral myelin tissue content.

Results: A total of 219 single-pregnancy children were enrolled, including 201 born to mothers exposed to SARS-CoV-2 infection and 18 from unexposed controls. A neuroimaging evaluation was performed at 6 months of adjusted chronological age and revealed 18 grayscale and 21 Doppler abnormalities. Predominant findings were hyperechogenicity of deep brain white matter and basal ganglia (caudate nuclei/thalamus) and a reduction in the resistance and pulsatility indices of intracranial arterial flow. The anterior brain circulation (middle cerebral and pericallosal arteries) displayed a wider range of flow variation than the posterior circulation (basilar artery). Shear-wave US elastography analysis showed a reduction in stiffness values in the SARS-CoV-2

exposed group in all analyzed regions of interest, especially in the deep white matter elasticity coefficients (3.98 ± 0.62) compared to the control group (7.76 ± 0.77); p -value < 0.001.

Conclusion: This study further characterizes pediatric structural encephalic changes associated with SARS-CoV-2 infection during pregnancy. The maternal infection has been shown to be related to cerebral deep white matter predominant involvement, with regional hyperechogenicity and reduction of elasticity coefficients, suggesting zonal impairment of myelin content. Morphologic findings may be subtle, and functional studies such as Doppler and elastography may be valuable tools to more accurately identify infants at risk of neurologic damage.

KEYWORDS

COVID, SARS-CoV-2, pregnancy, neonatology, ultrasound, elastography, neuroimaging

1. Introduction

Maternal infection with SARS-CoV-2 during pregnancy may expose the fetus to both direct and indirect systemic effects triggered by the virus (1). The consequences of the maternal and fetal inflammatory response with the production of potentially cytotoxic cytokines, in addition to the effect of the use of antiviral medications, have not been adequately studied to date (1, 2).

There is evidence that vascular complications may result from the potential hyperactivation of inflammatory factors and coagulation system dysfunction, particularly D-dimer and platelet abnormalities, increasing the risk of cerebrovascular disease, myelination defects, and hypoxic-ischemic encephalopathy following exposure to SARS-CoV-2 (3, 4). The potential consequences of changes in intracranial blood flow dynamics and cerebral hypoxia, mediated by systemic inflammatory response syndrome (SIRS), are still poorly elucidated in the pediatric age group (5). This study aimed to investigate the effects of maternal SARS-CoV-2 infection on the brains of infants exposed to SARS-CoV-2 infection during pregnancy, focusing on brain morphological changes, intracranial blood flow dynamics, and parenchymal composition/stiffness analysis. Additionally, we sought to assess the clinical and neurodevelopmental outcomes of newborns following maternal SARS-CoV-2 infection.

2. Methods

2.1. Study design and population

A prospective, comparative, and analytical cohort study was conducted with the follow-up of newborns born to mothers exposed or not exposed to SARS-CoV-2 infection during pregnancy. The study population consisted of 219 children, of whom 201 were in the group of newborns born to women infected by SARS-CoV-2 at different stages of pregnancy. The control group consisted of 18 newborns born to women who remained serologically negative for SARS-CoV-2 until the end of the neonatal period. Study recruitment was from May 2020 to

June 2022, during the COVID-19 pandemic, with planned clinical, neurological, and psychomotor follow-up until December 2022. Clinical follow-up was performed monthly until 6 months of age and then quarterly until 24 months of age. A global pediatric assessment and a neuro-psychomotor development diagnostic scale (Bayley III scale) were administered quarterly. Neuro-ultrasonography, color/spectral Doppler, and shear-wave elastography studies were performed at 6 months of adjusted chronological age, and follow-up evaluation was completed 4 weeks later for the abnormal cases. Detailed maternal clinical characteristics were also prospectively collected.

The case group included exposed newborns born to mothers infected by SARS-CoV-2 during pregnancy (RT-PCR or positive IgM). The control group included unexposed neonates with no maternal infection with the SARS-CoV-2 virus during pregnancy, no symptoms, and negative IgG and IgM serology at the end of pregnancy. Unexposed control subjects had negative IgG serology at 6 months of adjusted chronological age. Exclusion criteria for the study sample were evidence or confirmation of genetic syndromes; suspected or confirmed other congenital infections, such as toxoplasmosis, syphilis, rubella, herpes, Chagas, and Zika; discontinuation of clinical follow-up before the age of 2 years.

2.2. Neuroimaging data

The study groups were evaluated for morphometric, hemodynamic, and cerebral tissue elasticity parameters using high-frequency ultrasonography. A cranial ultrasound scan (CUS) was performed through the anterior fontanelle at 6 months of adjusted chronological age and repeated 4 weeks later at a follow-up exam in case of abnormal findings at the first CUS. Further examinations were planned thereafter, if indicated, according to an individualized schedule based on the persistence of abnormal findings and their clinical correlation. Only data from the first ultrasound scan of each infant were considered for the purpose of statistical analysis. All CUS were performed or supervised by the same operator (DA). A Philips Affiniti 70 ultrasound system, equipped with a 5–7.5 MHz convex probe

and a 5–18.0 MHz linear probe, was used for CUS studies, divided into the following modalities:

- Cranial ultrasound scan and Doppler of the intracranial arteries—pericallosal artery, middle cerebral artery, and basilar artery; Doppler velocimetry data were analyzed for each individual artery. Absolute values of resistance (RI) and pulsatility index (PI) for blood flow were compared in both groups (exposed vs. control). Images were obtained at the same standard windows over the anterior fontanelle, temporal bone, and suboccipital zone.
- Elastography of the brain parenchyma: scans were performed using ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse) and SWE (Shear-wave Elastography) software, which is directly integrated into the ultrasound system where the shear wave is located, allowing the operator to select the region of interest (ROI) for measurement in B-mode and in real-time. The ROIs were divided as follows: deep white matter (DWM), superficial white matter (SWM), basal ganglia (BG), represented by caudate nuclei and thalamus, corpus callosum (CC), and cortical gray matter (CGM) in the frontal lobe. All measurements were repeated at three different locations in the same type of zone and the same slice of view. The archived data represent the mean value of the measurements.

Tissue elasticity was estimated, and the velocity of the shear wave in the brain parenchyma was calculated from the displacement of transverse waves, where the velocity of the shear wave is directly proportional to the local tissue stiffness. The results were expressed in meters per second (m/s) and automatically converted to kilopascals (KPa), with the shear wave propagation velocity being proportional to the square root of the tissue elasticity [$E = 3\rho c^2$].

2.3. Data storage

Study records were stored using alphanumeric codes in the REDCap (Research Electronic Data Capture) platform, with access restricted to approved research personnel.

2.4. Statistical analysis

Continuous variables were described as mean and standard deviation or median and interquartile range (IQR), as appropriate. Categorical variables were expressed as frequencies and percentages. The prevalence of total abnormalities was evaluated for each category and compared with its prevalence in the control and SARS-CoV-2-exposed groups. A Mann-Whitney *t*-test or ANOVA were used to compare the mean values of imaging parameters.

The neuroimaging parameter means were compared between groups (SARS-CoV-2 exposed vs. controls) using an analysis of covariance (ANCOVA) model. In the ANCOVA model, the neuroimaging parameter measures (RI and PI for Doppler; “E” coefficient/Young’s modulus for elastography ROIs) were

considered dependent variables, the group (SARS-CoV-2 exposed vs. unexposed) was considered the independent variable, and the measures of GA (gestational age) and BW (birth weight) were considered covariates. A significance level of $p < 0.05$ was considered. Study participants were also grouped into two different categories based on their GA (pre-term and term, considering the cut-off at 37 weeks) and BW (low birth weight and adequate birth weight, considering the cut-off at 2,500 g).

A Cochran-Armitage trend test and Pearson correlation were used to evaluate trends or associations of results between Doppler and cranial ultrasound scans. p -value < 0.05 was considered significant. Analyses were performed using SAS v. 9.4 (SAS Institute, Inc., 2016).

2.5. Ethical approval and informed consent

The study was approved by the Research Ethics Committee of the School of Medicine of the University of Brasília (Certificate Number C.A.A.E. 32359620.00000.5558). The protocol was also registered in the Brazilian Registry of Clinical Trials. All pregnant women participating in the study gave informed consent. Likewise, the participation of the children in the pediatric arm required the signed, informed consent of their mothers. The 6-month reports on the status of the study and its partial results are available to the Institutional Research Ethics Committee and can be consulted upon request.

3. Results

3.1. Overview of enrolled subjects

The initial screening included 295 volunteers, sorted by hospital unit, gender, age, and trimester of maternal infection. Two subjects withdrew from the study after the initial phase. Of the 293 subjects evaluated, 74 were excluded due to (a) loss of follow-up ($n = 72$) and (b) diagnosis of congenital infection ($n = 2$). After exclusions, the total sample included 219 participants, consisting of 201 subjects with documented maternal SARS-CoV-2 infection [exposed group; birth age = 39 ± 2.9 weeks (mean $\pm$ SD); 56.6% female] and 18 subjects not exposed to SARS-CoV-2 infection [control group; birth age = 39 ± 2.8 weeks (mean $\pm$ SD); 53.0% female]. Gestational age at birth ranged from 33 to 42 weeks (mean 38.1 ± 1.8 weeks), and birth weight ranged from 1,525 to 4,418 g (mean $3,127 \pm 535$ g).

Concerning maternal diseases prior to pregnancy being affected by COVID-19, 16 patients (7%) had a previous history of systemic arterial hypertension, 3 (1.3%) reported pre-eclampsia, and 15 (6.8%) were affected by pregestational diabetes. A total of 15 patients had a history of pulmonary disease (6.8%), including asthma, and six had heart disease (2.7%).

Considering the clinical characteristics of the control group, the mean age at birth is 38.8 weeks of gestation, with a standard error of ± 0.41 w; mean birth weight for controls is 3,277 g, with a standard error of ± 107 g; mean head circumference is 35 ± 0.1 cm. The median and interquartile range (IQR) values for the

first- and fifth-minute APGAR scores in the control group are 8 (IQR: 7–8) and 9 (IQR: 9–9), respectively. With our cut-offs of 37 weeks for prematurity and 2,500 g for low birth weight, we have 16.6% (3) pre-term and 11.1% (2) low-birth weight individuals in the control group; the case group has similar frequencies with 14.8% (26) pre-term and 16.5% (29) low-birth weight individuals. Among the comorbidities found within the groups, the most frequent were anemia, bronchospasm, malnutrition, obesity, rhinitis, dermatitis, cow's milk protein allergy (CMPA), and gastroesophageal reflux disease (GERD). A supplemental table in **Appendix C** is provided for reference, demonstrating that groups display a similar profile of comorbidities.

3.2. Findings by imaging modality

3.2.1. Grayscale ultrasonography (structural US)

An association was found between maternal SARS-CoV-2 infection and white matter involvement in their children, with increased echogenicity in grayscale studies. Among the 201 examinations performed in the case group, 18 examinations showed abnormalities in B-mode analysis (8.9%), with deep white matter disease in the totality of these 18 abnormal cases (100%). To a lesser extent, we also saw mild alterations in the basal ganglia (caudate nuclei and thalamus), with abnormal caudothalamic echogenicity in 2 (11.1%) of 18 abnormal B-mode cases, concurrent with the deep white matter findings.

Supplementary Figure A1 summarizes the three main planes for cranial image acquisition and ultrasonographic analysis of deep white matter changes. It also shows CUS B-mode and Doppler velocimetry studies, analyzing three major intracranial arteries (the middle cerebral, pericallosal, and basilar arteries).

An equally significant finding of the morphometric US studies was the persistence of increased echogenicity in the affected areas at the routine second-look ultrasound study, performed 4 weeks after the initial study, in all the abnormal cases. On re-evaluation, it was possible to characterize the clear extension of the affected areas, with additional abnormalities in the basal ganglia—in total, the caudate nuclei and thalamus. It is also noteworthy that there were no individuals in the control group (18 out of 219) with grayscale ultrasound alterations.

3.2.2. Hemodynamic abnormalities (Doppler velocimetry)

In the exposed group, 21 out of 201 (10.4%) subjects presented with abnormal hemodynamic patterns, showing a reduction in the resistance (RI) and pulsatility (PI) indices in the blood flow of the major intracranial arteries. We conducted separate analyses of three main intracranial arteries: the middle cerebral artery, the pericallosal artery, and the basilar artery, the former two representing hemodynamic parameters for the anterior intracranial circulation, and the basilar artery velocimetry as an estimate of posterior circulation flow data.

Supplementary Figures A2–A4 demonstrate the Doppler velocimetric scan with spectral curves for the analysis of the flow of three major intracranial arteries (middle cerebral, pericallosal, and basilar arteries).

A significant trend of reduction in both resistance and pulsatility indices of arterial intracranial flow in SARS-CoV-2-exposed children were observed for both anterior and posterior circulation arteries, which was positively correlated with the severity of maternal infection. Significant decreases in RI and PI were found in cases of critical SARS-CoV-2 gestational infection, with mean PI values of 1.09 for the MCA (middle cerebral artery), 0.98 for the PA (pericallosal artery), and 1.04 for the BA (basilar artery).

Table 1 shows the neuroimaging parameters according to the severity of maternal infection (COVID-19 categories according to WHO classification).

When both analyses, mode-B ultrasound, and Doppler scan findings, were integrated and cross-matched with the categories of maternal infection severity, a positive correlation of abnormal neuroimaging results that increased proportionally with the severity of maternal infection, and a peak of abnormal neuroimaging results in children whose mothers had critical SARS-CoV-2 infection during pregnancy could be identified. These data are summarized in **Table 2**.

A second trend in the hemodynamic data was identified in this analysis, related to the duration of SARS-CoV-2 infection during pregnancy. A significant reduction in both the resistance and pulsatility indices of intracranial arterial flow positively correlated with the last trimester of maternal SARS-CoV-2 infection, as shown in **Table 3**.

TABLE 1 Imaging parameters distributed according to the severity of maternal infection (COVID-19 categories according to WHO classification).

Variable*	COVID-19 severity scale—WHO			ANOVA	Multiple comparisons		
	Mild (n=165)	Severe (n=23)	Critical (n=8)		p-value ^b		
MCA RI	0.77 ± 0.09	0.75 ± 0.10	0.64 ± 0.14	0.0011	0.8394	0.0010	0.0260
MCA PI	1.64 ± 0.30	1.47 ± 0.38	1.09 ± 0.45	0.0039	0.3789	0.0064	0.1713
Pericallosal RI	0.70 ± 0.08	0.68 ± 0.10	0.61 ± 0.09	0.0062	0.7004	0.0070	0.1185
Pericallosal PI	1.29 ± 0.31	1.19 ± 0.25	0.98 ± 0.24	0.0113	0.4744	0.0181	0.2833
Basilar RI	0.72 ± 0.07	0.69 ± 0.09	0.64 ± 0.09	0.0032	0.1692	0.0093	0.3330
Basilar PI	1.34 ± 0.29	1.24 ± 0.28	1.04 ± 0.28	0.0121	0.4389	0.0208	0.3229

MCA, middle cerebral artery; RI, resistance index; PI, pulsatility index.

*Values expressed as mean ± standard error.

^bp-values for multiple comparisons adjusted with Bonferroni correction.

TABLE 2 Neuroimaging parameters are distributed according to the COVID-19 severity scale—WHO classification.

Variable*	COVID-19 severity scale—WHO*			Pearson correlation (CI 95%)	p-value*
	Mild (n = 166)	Severe (n = 23)	Critical (n = 8)		
Intracranial Doppler				0.23 (0.06; 0.40)	<0.001
Abnormal	11 (6.63)	5 (21.74)	5 (62.50)		
Normal	155 (93.37)	18 (78.26)	3 (37.50)		
Ultrasonography				0.24 (0.06; 0.42)	<0.001
Abnormal	9 (5.42)	5 (21.74)	4 (50.00)		
Normal	157 (94.58)	18 (78.26)	4 (50.00)		

*Values expressed in frequency (%).

*p-value calculated with the Cochran-Armitage trend test.

TABLE 3 Neuroimaging parameters (ultrasound B-mode and Doppler analysis) distributed according to the trimester of SARS-CoV-2 infection during pregnancy.

Variable*	Gestational trimester of SARS-CoV-2 infection*				Pearson Correlation (CI 95%)	p-value*
	1st (n = 27)	2nd (n = 58)	3rd (n = 95)	Peripartum (n = 21)		
Intracranial arteries Doppler					0.43 (0.32; 0.54)	<0.001
Abnormal	0 (0.00)	1 (1.72)	6 (6.32)	14 (66.67)		
Normal	27 (100.00)	57 (98.28)	89 (93.68)	7 (33.33)		
Ultrasonography B-mode					0.41 (0.30; 0.53)	<0.001
Abnormal	0 (0.00)	1 (1.72)	4 (4.21)	13 (61.90)		
Normal	27 (100.00)	57 (98.28)	91 (95.79)	8 (38.10)		

*Values expressed in frequency (%).

*p-value calculated with the Cochran-Armitage trend test.

The hemodynamic evaluation data show a significant correlation between the resistance/pulsatility indices in the main intracranial arteries and the trimester of maternal infection, with the highest proportional frequency of abnormal results observed in cases of peripartum infection (defined as a period equal to or less than 14 days between infection with SARS-CoV-2 and the date of delivery). Among the pregnant women infected during this period, 66% had abnormal Doppler velocimetry, and nearly 62% had abnormal cranial ultrasound in grayscale.

3.2.3. Elastography abnormalities (shear-wave ultrasound-based)

The functional studies based on shear-wave elastography were performed in five regions of interest (ROIs) and "E" cut-off references were adopted according to previous recent literature (6–8), as there is no definitive normality parameter for elastography studies in the pediatric brain.

A significant relationship was found between maternal exposure to SARS-CoV-2 and elastography changes, mainly in the cerebral deep white matter and basal ganglia, in terms of stiffness alterations, with a decrease of the elastic modulus (E) in the SARS-CoV-2-exposed group when compared to controls. Table 4 shows these findings categorized by ROIs.

The SARS-CoV-2 group had significantly lower "E" coefficients in specific brain areas, including the deep/periventricular white matter and the splenium of the corpus callosum. The basal ganglia (caudate nuclei and thalamus), superficial white matter, and cortical gray matter also showed stiffness variations associated with SARS-CoV-2 exposure, although to a lesser extent.

TABLE 4 Neuroimaging parameters of children distributed between the group exposed to SARS-CoV-2 infection during gestation (cases) and the non-exposed (control) group, according to the specific regions of interest (ROIs) for elastography analysis: deep white matter, frontal white matter, caudate/thalamus, corpus callosum, and frontal cortex.

Variable*	Groups		p-value*
	Cases (n = 201)	Control (n = 18)	
Elastography—DWM	3.98 ± 0.62	7.76 ± 0.77	<0.001
Elastography—PWM	3.31 ± 0.59	4.69 ± 0.85	<0.001
Elastography—caudate/thalamus	5.45 ± 0.64	6.46 ± 0.96	<0.001
Elastography—corpus callosum	4.53 ± 0.39	7.93 ± 0.88	<0.001
Elastography—frontal cortex	5.62 ± 0.57	6.59 ± 0.66	<0.001

DWM, deep white matter; PWM, frontal white matter.

*Values expressed in kilopascal, as mean ± standard error.

*p-value calculated by Mann-Whitney test.

A significant dose-response relationship was found between exposure to SARS-CoV-2 during pregnancy and the presence of neuroimaging abnormalities, including grayscale, Doppler, and elastography modalities.

The neuroimaging parameter means were also compared between groups (SARS-CoV-2 exposure vs. non-exposure) using an analysis of covariance (ANCOVA) model. In this ANCOVA model, the neuroimaging parameter measures (hemodynamic indices and elastic modulus) were considered dependent variables, the group (SARS-CoV-2 exposure vs. non-exposure) was considered the independent variable, and the measures of GA (gestational age) and BW (birth weight) were considered covariates.

TABLE 5 Neuroimaging parameters of infants distributed between the group exposed to SARS-CoV-2 infection during gestation (cases) and the unexposed group (control), controlled by GA (gestational age) and BW (birth weight), according to the specific regions of interest (ROIs) for elastography analysis: deep white matter, frontal white matter, caudate/thalamus, corpus callosum, and frontal cortex; *p*-value calculated by ANCOVA model.

Variable	Groups—mean value* ± standard error		Comparison between groups	
	Cases (n = 201)	Control (n = 18)	Difference [CI 95%]	<i>p</i> -value*
MCA—RI	0.76 ± 0.01	0.79 ± 0.01	−0.03 [−0.07; −0.00]	0.0451
MCA—PI	1.59 ± 0.03	1.65 ± 0.08	−0.04 [−0.08; −0.00]	0.0434
Pericallosal artery—RI	0.70 ± 0.00	0.73 ± 0.01	−0.03 [−0.06; −0.00]	0.0277
Pericallosal artery—PI	1.26 ± 0.02	1.40 ± 0.05	−0.14 [−0.25; −0.03]	0.0123
Basilar artery—RI	0.71 ± 0.00	0.73 ± 0.02	−0.02 [−0.04; 0.01]	0.2324
Basilar artery—PI	1.31 ± 0.02	1.32 ± 0.07	−0.01 [−0.14; 0.14]	0.9585
Elastography—DWM	3.98 ± 0.04	7.77 ± 0.11	−3.80 [−4.03; −3.57]	<0.001
Elastography—FWM	3.31 ± 0.04	4.69 ± 0.11	−1.37 [−1.60; −1.14]	<0.001
Elastography—caudate nucleus/thalamus	5.46 ± 0.05	6.45 ± 0.12	−0.99 [−1.24; −0.74]	<0.001
Elastography—corpus callosum	4.56 ± 0.03	7.92 ± 0.08	−3.38 [−3.56; −3.20]	<0.001
Elastography—frontal cortex	5.61 ± 0.04	6.60 ± 0.10	−0.99 [−1.20; −0.78]	<0.001

Mean values adjusted by ANCOVA model. MCA, middle cerebral artery; RI, resistance index; PI, pulsatility index; DWM, deep white matter; FWM, frontal white matter.

*Results are expressed in kilopascals, as mean ± standard error.

**p*-values for comparison between groups were calculated using ANCOVA model, with GA and BW as covariates.

As shown in Table 5, the neuroimaging parameters of the patients present significant differences between the two groups, even after controlling for GA and BW. According to the data, the mean value of deep white matter elasticity in the group exposed to SARS-CoV-2 is 3.98 ± 0.04 , while in the group without SARS-CoV-2, it is 7.77 ± 0.11 . The difference between the two groups is -3.80 with a 95% confidence interval of $[-4.03, -3.57]$ and a *p*-value of less than 0.001. This means that there is a statistically significant difference between the two groups for this parameter, indicating that patients exposed to SARS-CoV-2 during pregnancy have lower values for deep white matter elasticity compared to those not exposed to SARS-CoV-2. In contrast, the parameters for a single vessel (basilar artery) interestingly did not show a significant difference between the two groups, when adjusted for GA and BW. Considering the basilar artery RI, the difference between the two groups is -0.02 with a 95% confidence interval of $[-0.04, 0.01]$ and a *p*-value of 0.2324.

4. Discussion

4.1. General evidence

A systemic inflammatory response to the SARS-CoV-2 virus and consequent endothelial damage has been implicated in COVID-19 pathogenesis, with replicated evidence in many studies in both biochemical and clinical settings (9–11). Although there is extensive epidemiologic evidence of systemic COVID-19 effects (12, 13), the neurologic consequences of SARS-CoV-2 exposure in the pediatric group are still uncertain, and current evidence is mostly based on case reports (14, 15). It is not clear whether and to what extent the blood-brain barrier functions as a protective factor in blocking inflammatory cytokines (16–19).

Our study provides evidence that SARS-CoV-2 infection during pregnancy may be associated with both structural and functional brain damage in infants. The most recurrent findings were characterized in the cerebral deep white matter, although all other ROIs demonstrated some degree of change. These changes were manifested by increased regional echogenicity on B-mode studies, a reduction in the corresponding resistance/pulsatility of intracranial arterial flow, and a decrease in the cerebral elastic modulus. The reduced stiffness in the cerebral tissue, especially in the deep white matter, may represent a decreased amount of tussular myelin in the central nervous system, a crucial element for adequate neurodevelopment in children. Few neuroimaging studies have been conducted in this area with pediatric subjects, so our results provide unprecedented evidence based on structural and functional abnormalities.

4.2. Ultrasonographic findings (gray scale)

Structural neuroimaging scans in our study have repeatedly demonstrated white matter involvement in abnormal cases in SARS-CoV-2-exposed subjects. To date, there are published case series (20, 21) reporting a similar pattern of involvement in COVID-19, but no longitudinally designed studies with SARS-CoV-2-exposed and unexposed control groups correlating neuroimaging findings and clinical follow-up.

Because there is exceptional collateral circulation in the brain vasculature in the neonatal period and early childhood, the pattern of parenchymal involvement in these subjects tends to be less severe in the cortical gray matter (unlike in adults). In response to vascular and/or hypoxic encephalic injury, the deep white matter is one of the first areas of the brain affected during this early period of life (22–24).

This evidence was replicated in our results, as both deep white matter and basal ganglia areas presented as regions of higher echogenicity in abnormal B-mode scans when compared to

controls (the unexposed group). In our sample, 18 individuals whose mothers were infected by SARS-CoV-2 during pregnancy manifested some degree of white matter disease, of which 16 (88.8%) had exclusive white matter involvement and two (11.2%) subjects had concomitant involvement of deep white matter and cerebral basal ganglia (thalamus and caudate nuclei). Another significant finding of the morphometric US studies was the persistence of increased echogenicity in the affected areas at the routine follow-up ultrasound study, performed 4 weeks after the initial scan, in all the abnormal cases. At re-evaluation, it was possible to characterize an increase in the extent of the affected areas in three individuals (16.6%) who evolved from initial exclusive deep white matter lesions to additional abnormalities in the basal ganglia, in total, the caudate nuclei and thalamus.

Although the correlation of basal ganglia changes with the clinical COVID-19 syndrome is still unclear, it is thought to play a role in the long-lasting damage that some infants have shown, manifesting as late-onset post-COVID-19 symptoms, with delayed neurological development and failure to achieve neuropsychomotor milestones at specific ages (25, 26).

4.3. Hemodynamics findings (Doppler evaluation)

Our data regarding intracranial blood flow analysis in both groups suggest a relevant trend of decrease in RI (resistance) and PI (pulsatility) indices in the SARS-CoV-2-exposed group when maternal infections occur in the last 14 days of gestation and critical cases. This fact is thought to be a consequence of systemic adaptation to the persistent inflammatory condition that may be present even after the first 14 days of acute viral symptoms (27, 28). Cases of early maternal infection with SARS-CoV-2 during pregnancy, especially in the first and second trimesters, would allow sufficient time for arterial flow autoregulation to settle and the systemic inflammatory response to subside.

Such hemodynamic adaptation findings have been widely reported in the literature for other conditions predisposing to brain injury, such as hypoxic-ischemic injury, metabolic damage, and systemic inflammatory conditions (SIRS—systemic inflammatory response syndrome) (29, 30), generally indicating situations in which the brain has increased metabolic demands and a significant increase in intracranial blood flow is required. In fetal life, an analogous situation is classically demonstrated in cases of fetal intrauterine growth-restriction (IUGR), when the fetal arterial flow is redirected to the intracranial circulation to the detriment of visceral and peripheral flow (31–33).

Unlike other viral infections with the well-known transplacental transmission, such as human cytomegalovirus (CMV), rubella virus, parvovirus B19, and Zika virus (ZIKV), the worst pregnancy outcomes in SARS-CoV-2 infection were observed in late-stage pregnancies. This finding is consistent with the current literature, as current evidence does not demonstrate that SARS-CoV-2 represents efficient transplacental virus transmission or direct fetal neuronal damage (34, 35).

4.4. Elastography findings (shear-wave elastography assessment)

To our knowledge, no previous study has assessed elastography parameters of the brain parenchyma in infants exposed to SARS-CoV-2 during pregnancy. The few publications in the pediatric literature include small case series of healthy individuals aimed at suggesting standard elastography values for normal brain parenchyma in neonates (36, 37). Other similar studies have been conducted in mice with anatomopathological correlations (38, 39). Experiments in mice achieved a significant level of agreement with human brain values, presumably related to the very similar elasticity coefficients/energy densities (p) of mouse and human brains.

When the elastography data of our study groups were analyzed, significant differences were found between SARS-CoV-2-exposed newborns and the unexposed group in terms of the elastic modulus of the brain parenchyma. All regions of interest (ROIs) showed a reduction in the elasticity coefficient/Young's modulus (E) in the SARS-CoV-2-exposed group.

The elastography pattern differences between both groups were more pronounced in the DWM deep white matter zone (ROI number 1) when compared to other regions of analysis such as subcortical white matter and the frontal cortex. A plausible hypothesis is related to differences in the tissular composition of these regions, with a predominance of myelin in the deep white matter (40). Considering also the age of the subjects (6 months of adjusted chronological age), our ROI at the DWM was expected to be myelinated at this stage, different from the subcortex or frontal cortical zones (41–43). These elements suggest that brain findings related to SARS-CoV-2 exposure during pregnancy may be due, to some extent, to changes in the amount of myelin in the cerebral tissue, knowing that those with less myelin present a decrease in their elasticity coefficients, corresponding to a reduction in stiffness. Another possible mechanism could be mild intra-myelinic edema, in which the inflammation causes an increased water content in the cerebral tissue, thus leading to a decrease in tissue stiffness.

Our findings are consistent with recent studies investigating the impact of SARS-CoV-2 infection during pregnancy on pediatric neurodevelopment. Regarding neuroimaging, a study published in October 2021 aimed to assess the association between maternal SARS-CoV-2 infection during pregnancy and offspring brain development using MRI scans (44). The study followed 55 infants born to mothers with SARS-CoV-2 infection during pregnancy. The researchers found that infants born to mothers with SARS-CoV-2 infection during pregnancy had reduced cortical thickness in the left superior temporal gyrus, which is an important brain region for language and social communication. Abnormal cortical thickness in this region has been associated with neurodevelopmental conditions such as autism spectrum disorders. The study suggests that maternal SARS-CoV-2 infection during pregnancy may affect offspring brain development, particularly in brain regions important for language and social communication.

Protocols with a more clinical focus included a study published in January 2022 (45) that followed 205 children born to mothers with SARS-CoV-2 infection during pregnancy and found that children born to mothers with SARS-CoV-2 infection during pregnancy had an increased risk of developmental delay at 12 months of age compared to children born to mothers without SARS-CoV-2 infection. Another study published in August 2021 (46) found that children born to mothers with severe or critical COVID-19 during pregnancy had a higher risk of cognitive, motor, and language developmental delays at 6 months of age compared to children born to mothers without COVID-19. The study followed 150 infants born to mothers with COVID-19 and 150 infants born to mothers without COVID-19.

It is worth noting that these studies have limitations, and more research is needed to fully understand the potential effects of SARS-CoV-2 infection during pregnancy on pediatric neurodevelopment. However, the findings suggest that healthcare providers should closely monitor children born to mothers with SARS-CoV-2 infection during pregnancy for any signs of developmental delays or neurodevelopmental disorders.

4.5. Limitations

Causal associations between SARS-CoV-2 infection and adverse perinatal outcomes have been suggested in clinical studies but have not been definitely established, as there are many potential confounding factors involved. Among these, we should emphasize that mothers infected by SARS-CoV-2 during pregnancy are often prone to gestational complications, including adverse birth conditions, preterm labor, and maternal and neonatal hypoxia—factors that may themselves lead to CNS damage. Controlling all of these factors can be challenging. Our study attempted to control for some of these possible biases with covariance analysis techniques. However, many characteristics related to clinical maternal status, such as gestational hypertension, diabetes, previous lung disease, and obesity, persisted in our sample for both groups and may affect neurodevelopmental outcomes in infants. It is also relevant to consider that most of our sample was composed of outpatients, so the severity of maternal infection was predominantly mild to moderate, and there was a quantitative disproportion between case and control groups, given the context of multiple lockdowns and subsequent SARS-CoV-2 vaccination—the latter being one of the exclusion criteria for the control group. We acknowledge the substantial difference in the sample size between the cases and controls, and the possibility of introducing bias as a result. Because infant outcomes of maternal SARS-CoV-2 exposure during pregnancy are poorly defined to date, an accurate prospective sample size estimation for cases and controls was not feasible. However, a *post hoc* analysis was performed to estimate the number of controls needed to maintain a probability of error (α) of 0.05 with a power of 0.8 using the relative frequency of abnormal imaging findings in the cases. We used a likelihood

ratio test to estimate the sample size needed for controls and found that $N=9$. Thus, we believe that the control group in our study is sufficient for our research questions. Furthermore, the prospective recruitment of our controls involved randomly selecting individuals from a large representative population in our universal public health system.

5. Conclusion

SARS-CoV-2 infection during pregnancy is associated with encephalic changes in a relevant proportion of cases, predominantly affecting the cerebral deep white matter (DWM). The characteristic SARS-CoV-2-related pediatric leukopathy is manifested in neuroimaging with increased echogenicity and decreased elasticity coefficients in the DWM, i.e., reduced stiffness. These findings open up a spectrum of research possibilities regarding their effects on fetal, neonatal, and childhood health. The description of the consequences of infection in long-term follow-up may provide a better understanding of the disease and its impact on the central nervous system.

Future research using correlated axial methods, such as magnetic resonance imaging and tractography, may contribute to predicting brain areas more vulnerable to SARS-CoV-2-related encephalopathy and delineating regions with a propensity for decreased myelination. By understanding the neuroimaging correlates of SARS-CoV-2 infection in the perinatal period, this study could provide a more complete picture of the presentation pattern in the brain of SARS-CoV-2-exposed individuals during early childhood. The characterization of pediatric brain areas with a higher risk of neurological damage following maternal SARS-CoV-2 infection will allow the evaluation of clinical correlates and the early prevention of neurodevelopmental sequelae.

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 author.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Research Ethics Committee of the University of Brasília School of Medicine (Certificate Number 32359620.0.0000.5558). Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

Author contributions

Study design: DA, FM, GF, MC, LS, CA, and LM. Advisory committee: LL, TR, PK, LE, AZ, AS, and ON. Funding

acquisition: LE, AZ, CG, OM-F, and LM. Sample collection, clinical appointments, and data collection: DA, FM, GF, MC, and LS. Data analysis: DA, FM, LL, TR, CA, and LM. Writing and revision of the manuscript: DA, FM, LL, TR, CA, and LM. All authors have participated sufficiently in the work to take responsibility for its content. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

The study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the University of Brasília (UnB) (Grant # 7155, "Fundo COVID-19 UnB em Ação: Ações emergenciais para combate à COVID-19 e mitigação das consequências da pandemia"). This study was funded by Cnpq/CAPES.

Acknowledgments

The research project involves doctoral students and professors affiliated with the Medical Sciences Post-Graduation Program of the University of Brasília (UnB), supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors express their gratitude University Hospital of Brasília (HUB) for the use of its facilities. The authors also thank the University of Melbourne and the Austin Health Library for

technical support with literature searches and statistical analysis. ON and OM-F received a research fellowship from the Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Brazil).

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/fped.2023.1194114/full#supplementary-material>.

References

- Voise F, Battisti C, Crudo M. The inflammatory cytokine imbalance for micropart, pregnancy loss and COVID-19 pneumonia. *Front Immunol.* (2022) 13:861245. doi: 10.3389/fimmu.2022.861245
- Carvajal J, Casanillo P, Toso A, Farias M, Carnio-Negre K, Araújo K, et al. Functional consequences of SARS-CoV-2 infection in pregnant women, fetoplacental unit, and neonate. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* (2023) 1869 (1):166582. doi: 10.1016/j.bbadis.2022.166582
- Wong AM, Toh CH. Spectrum of neuroimaging mimics in children with COVID-19 infection. *Biomed J.* (2022) 45(1):50–62. doi: 10.1016/j.bj.2021.11.005
- Abdel-Mannan O, Eyre M, Löbel U, Bamford A, Elze C, Hamed R, et al. Neurologic and radiographic findings associated with COVID-19 infection in children. *JAMA Neurol.* (2020) 77(11):1440–5. doi: 10.1001/jamaneurol.2020.2687
- Patel PR, Bearden D. Neuropathogenesis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Curr Opin Pediatr.* (2021) 33(6):597–602. doi: 10.1097/MOP.000000000000068
- Yang H, Li H, Liao J, Yan X, Shi C, Liang W. Compression elastography and shear wave ultrasound elastography for measurement of brain elasticity in full-term and premature neonates: a prospective study. *J Ultrasound Med.* (2023) 42 (1):221–31. doi: 10.1002/jum.16075
- deCampo D, Hwang M. Characterizing the neonatal brain with ultrasound elastography. *Pediatr Neurol.* (2018) 86:19–26. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2018.06.005
- Kim HG, Park MS, Lee JD, Park SY. Ultrasound elastography of the neonatal brain: preliminary study. *J Ultrasound Med.* (2017) 36(7):1313–9. doi: 10.7863/ultra.16.06079
- Giampini A, Bardach A, Comandé D, Berrueta M, Argento FJ, Rodríguez Cairó F, et al. COVID-19 and pregnancy: an umbrella review of clinical presentation, vertical transmission, and maternal and perinatal outcomes. *PLoS One.* (2021) 16(6):e0253974. doi: 10.1371/journal.pone.0253974
- Granja MG, Oliveira A, Figueiredo C, Gomes A, Ferreira E, Gostál-de-Araújo E, et al. SARS-CoV-2 infection in pregnant women: neuroimmune-endocrine changes at the maternal-fetal interface. *Neuroimmunomodulation.* (2021) 28(1):1–21. doi: 10.1159/000515556
- Manti S, Leonardi S, Resace F, Harford TJ, Perez MK, Piedimonte G. Effects of vertical transmission of respiratory viruses to the offspring. *Front Immunol.* (2022) 13:853009. doi: 10.3389/fimmu.2022.853009
- Orenton EE, Goffman D, Friedman AM. The epidemiology of COVID-19 in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol.* (2022) 65(1):10–22. doi: 10.1097/GRF.0000000000000674
- Bastos SNMAN, Barbosa BLF, Cruz LGR, Sousa RP, Silva Melo SSE, Luz CCBDS. Clinical and obstetric aspects of pregnant women with COVID-19: a systematic review. *Rev Bras Ginecol Obstet.* (2021) 43(12):949–60. doi: 10.1055/s-0041-1733913
- Valdeira C, Méndez G, Echeverría A, Suarez N, Julio K, Sandoval F. COVID-19 and neurological manifestations: a synthesis from the child neurologist's corner. *World J Pediatr.* (2022) 18(6):373–82. doi: 10.1007/s12519-022-00550-4
- Casabianca M, Caila C, Titomanlio L, Lengua L. Neurological consequences of SARS-CoV-2 infections in the pediatric population. *Front Pediatr.* (2023) 11:1123348. doi: 10.3389/fped.2023.1123348
- Govi-Dalela T, Sivawany L. Neurological effects of COVID-19 in children. *Pediatr Clin North Am.* (2021) 68(5):1081–91. doi: 10.1016/j.pcl.2021.05.010
- Stafstrom CE, Jantzie LL. COVID-19: neurological considerations in neonates and children. *Children.* (2020) 7(9):133. doi: 10.3390/children7090133
- Perlman JM, Salvatore C. Coronavirus disease 2019 infection in newborns. *Clin Perinatol.* (2022) 49(1):73–92. doi: 10.1016/j.cpr.2021.11.005
- Allorey J, Chatterjee S, Kew T, Gaetano A, Stallings E, Fernández-García S, et al. SARS-CoV-2 positivity in offspring and timing of mother-to-child transmission: living systematic review and meta-analysis. *Br Med J.* (2022) 376:e067696. doi: 10.1136/bmj-2021-067696
- Singer TG, Evansovich KD, Fisher K, Demmler-Harrison GJ, Risen SR. Coronavirus infections in the nervous system of children: a scoping review making

- the case for long-term neurodevelopmental surveillance. *Pediatr Neurol.* (2021) 117:47–63. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2021.01.007
21. Jia NK, Ojha S, Jia SK, Dureja H, Singh SK, Shukla SD, et al. Evidence of coronavirus (CoV) pathogenesis and emerging pathogen SARS-CoV-2 in the nervous system: a review on neurological impairments and manifestations. *J Mol Neurosci.* (2021) 71(1):2192–209. doi: 10.1007/s12031-020-01767-6
22. da Silva Chagas L, Sandre PC, de Velasco PC, Marcondes H, Ribeiro E, Ribeiro NCA, Barreto AL, et al. Neuroinflammation and brain development: possible risk factors in COVID-19-infected children. *Neuroimmunomodulation.* (2021) 28(1):22–8. doi: 10.1159/000512815
23. Siracusani L, Giallo A, Giordano S, Medaglia AA, Restivo GA, Pirrone I, et al. Neurological complications in pediatric patients with SARS-CoV-2 infection: a systematic review of the literature. *Ital J Pediatr.* (2021) 47(1):123. doi: 10.1186/s13052-021-01066-9
24. de Moraes FM, de Souza JWPS, Alves LP, de Siqueira MFR, Dos Santos APA, de Carvalho Berardo MM, et al. SARS-CoV-2 infection and possible neonatal neurological outcomes: a literature review. *Virus.* (2022) 14(5):1037. doi: 10.3390/v14051037
25. Zimmer A, Youngblood A, Adnan A, Miller BJ, Goldsmith DR. Prenatal exposure to viral infection and neuropsychiatric disorders in offspring: a review of the literature and recommendations for the COVID-19 pandemic. *Brain Behav Immun.* (2021) 91:756–70. doi: 10.1016/j.bbi.2020.10.024
26. Figueiredo CP, Rentes-Dantas FL, da Poian AT, Clarke JR. SARS-CoV-2-associated cytokine storm during pregnancy as a possible risk factor for neuropsychiatric disorder development in post-pandemic infants. *Neuropharmacology.* (2021) 201:108841. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108841
27. Briana D, Syddou G, Papaevangelou V. Perinatal COVID-19. *Pediatr Infect Dis J.* (2021) 40(12):e504–6. doi: 10.1097/INF.0000000000003356
28. Shook LL, Fouman LT, Edlow AG. Immune responses to SARS-CoV-2 in pregnancy: implications for the health of the next generation. *J Immunol.* (2022) 209(8):1465–73. doi: 10.1093/immunol/2200414
29. O'Loughlin L, Alvarez Toledo N, Budrie L, Waechter R, Rayner J. A systematic review of severe neurological manifestations in pediatric patients with coexisting SARS-CoV-2 infection. *Neurol Int.* (2021) 13(3):410–27. doi: 10.3390/neurol1303041
30. Shook LL, Sullivan EL, Lo JO, Pettis RH, Edlow AG. COVID-19 in pregnancy: implications for fetal brain development. *Trends Mol Med.* (2022) 28(4):319–30. doi: 10.1016/j.molmed.2022.02.004
31. Gränebaum A, Dudenhausen J, Chervenak FA. COVID and pregnancy in the United States - an update as of August 2022. *J Perinat Med.* (2023) 51(1):34–8. doi: 10.1515/jpm-2022-0361
32. Amirian A, Palzad R, Hassanpour V, Mirzadeh N, Abd F. Neonatal outcome among pregnant women with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J Mater Fetal Neonatal Med.* (2022) 35(25):9234–48. doi: 10.1080/14767058.2021.2022648
33. Neef V, Buxmann H, Rabenau HF, Zacharowski K, Palmann FJ. Characterization of neonates born to mothers with SARS-CoV-2 infection: review and meta-analysis. *Pediatr Neonatol.* (2021) 62(1):11–20. doi: 10.1016/j.pedneo.2020.10.001
34. Simbar M, Nazarpour S, Sheidati A. Evaluation of pregnancy outcomes in mothers with COVID-19 infection: a systematic review and meta-analysis. *J Obstet Gynaecol.* (2023) 43(1):2162867. doi: 10.1080/01443615.2022.2162867
35. Płarska I, Bizon M, Sawicki W. Influence of COVID-19 infection on placental function. *Ginek Pol.* (2023) 94(1):79–83. doi: 10.5603/GPa.2022.0139
36. Garbis Iñigo E, Llorens Salvador R, Escrig R, Hervás D, Vento M, Martí-Bonmati L. Quantitative evaluation of neonatal brain chakky using shear wave elastography. *J Ultrasound Med.* (2021) 40(4):795–804. doi: 10.1002/jum.15464
37. Wang J, Zhang Z, Xu X, Lu X, Wu T, Tong M. Real-time shear wave elastography evaluation of the correlation between brain tissue stiffness and body mass index in premature neonates. *Transl Pediatr.* (2021) 10(12):3230–6. doi: 10.21037/tp.21-513
38. Liao J, Yang H, Yu J, Liang X, Chen Z. Progress in the application of ultrasound elastography for brain diseases. *J Ultrasound Med.* (2020) 39(11):2093–104. doi: 10.1002/jum.15317
39. Liu L, Bongers A, Bilton LE, Jugé L. The combined use of DTI and MR elastography for monitoring microstructural changes in the developing brain of a neurodevelopmental disorder model: poly (Ic)-induced maternal immune-activated rats. *PLoS One.* (2023) 18(1):e0280498. doi: 10.1371/journal.pone.0280498
40. Huang M, Zhang Z, Katz J, Freeman C, Kilbaugh T. Brain contrast-enhanced ultrasonography and elastography in infants. *Ultrasonography.* (2022) 41(4):633–49. doi: 10.14366/ug.21.224
41. Germano C, Mesina A, Tavella E, Vitale R, Avella V, Barbieri M, et al. Fetal brain damage during maternal COVID-19: emerging hypothesis, mechanism, and possible mitigation through maternal-targeted nutritional supplementation. *Nutrients.* (2022) 14(6):3303. doi: 10.3390/nu14163303
42. Kamik M, Beeska NM, Uthalah CA, Nicanj SM, Bettadapura ADS, Aliev G, et al. A review on SARS-CoV-2-induced neuroinflammation, neurodevelopmental complications, and recent updates on the vaccine development. *Mol Neurobiol.* (2021) 58(9):4535–63. doi: 10.1007/s12035-021-02399-6
43. Jeličić I, Veselinović A, Čirović M, Jakovljević V, Raičević S, Subotić M. Maternal distress during pregnancy and the postpartum period: underlying mechanisms and child's developmental outcomes—a narrative review. *Int J Mol Sci.* (2022) 23(2):1393. doi: 10.3390/ijms23213932
44. Norman M, Navé I, Söderling I, Ahlberg M, Hervás Alding H, Axonson B, et al. Association of maternal SARS-CoV-2 infection in pregnancy with neonatal outcomes. *JAMA Netw Open.* (2021) 3(2):2076–86. doi: 10.1001/jama.2021.5775; Erratum in: *JAMA Netw Open.* (2021) 3(2):101978.
45. Coiro S, Carosso AR, Cusato I, Borella F, Betero L, Bonetti M, et al. Obstetric and neonatal outcome in SARS-CoV-2 infection during pregnancy: a prospective cohort study. *J Obstet Gynaecol Res.* (2022) 48(2):393–401. doi: 10.1111/jog.15105
46. Ayed M, Embaireng A, Kartum M, More K, Akpallaf M, AlNafisi A, et al. Neurodevelopmental outcomes of infants born to mothers with SARS-CoV-2 infections during pregnancy: a national prospective study in Kuwait. *BMC Pediatr.* (2022) 22(1):319. doi: 10.1186/s12887-022-03359-2

14.2 ANEXO B – Ficha de coleta de dados



PROUDEST

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



PLANILHA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Data ____/____/____

Nome:

Prontuário:

DN: ____/____/____

Idade:

Telefones:

Cidade de Residência:

Estado civil: Casada () Solteira () União estável () Separada / Divorciada ()

Escolaridade: Ensino Fundamental () Ensino Médio () Ensino Superior ()

Ocupação:

Raça declarada: () Branca () Preta () Parda () Outros

DUM:

Idade gestacional: sem dias

1ª US obstétrico – Data:

Idade gestacional: sem dias

Paridade: G P A

Altura: Peso:

Pressão Arterial:

Diagnóstico de COVID-19 realizado por:

() RT-PCR () Sorologia IgG + () Sorologia IgM +

() Teste rápido IgG + () Teste rápido IgM + () TC de tórax + sintomas

Data da realização do teste:

|Onde realizou teste:

Teve sintomas: () Sim () Não

Para pacientes sintomáticas:

Data de início dos sintomas:

Sintomas apresentados: () Febre () Tosse () Falta de ar () Dor de garganta () Dor no corpo

() Congestão nasal ou coriza () Diarreia () Perda de paladar () Perda de olfato

() Dor de cabeça

Outros (descreva): _____

Esteve internada durante esta gestação: () Sim () Não

Data de internação hospitalar:

Local:

Dias de internação hospitalar:

Quadro apresentado durante internação hospitalar:

Quando ficou grávida, você:

☐ Queria engravidar naquele momento ☐ Queria esperar mais tempo ☐ Não queria engravidar

☐ Utilizava algo para evitar a gravidez ☐ Desejava usar algo para evitar a gravidez

Teve acesso ao planejamento familiar ☐ Sim ☐ Não

Se não: ☐ Unidade de saúde fechada

☐ Foi atendida na unidade de saúde mas não conseguiu método

☐ Método falhou ☐ Outros: _____

Doença pré-existente: ☐ Sim ☐ Não

Se sim: Qual?

Doenças diagnosticada durante a gestação: ☐ Sim ☐ Não

Se sim: Qual?

Presença de TORSCH diagnosticada no pré-natal: ☐ Sim ☐ Não

Se sim: Qual?

Uso de medicamento durante a gestação: ☐ Sim ☐ Não

Se sim: Qual?

14.3 ANEXO C – Parecer consubstanciado do CEP

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								
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td colspan="2">Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Asa Norte</td> <td>CEP: 70.910-900</td> </tr> <tr> <td>UF: DF</td> <td>Município: BRASILIA</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (61)3107-1918</td> <td>E-mail: cepfm@unb.br</td> </tr> </table>	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
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							

**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:** BRASILIA
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:** BRASILIA
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	Iarissa.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 FERNANDES	Aceito

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

**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

14.4 ANEXO D - Parecer consubstanciado da CONEP

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DA EMENDA

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: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

Versão: 4

CAAE: 32359620.0.0000.5558

Instituição Proponente: EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES - EBSEH

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.154.765

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1670184_E1.pdf de 30/11/2021.

INTRODUÇÃO

A história natural da COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, ainda está sendo descrita. Pouco se conhece de seus efeitos sobre a gestação, puerpério e a saúde da mãe e do feto, assim como do impacto no desenvolvimento a longo prazo dos filhos de mães contaminadas durante a gestação. Com base nos dados descritos até hoje, o quadro clínico da COVID-19 na gestação não parece diferir do observado fora desse período. A doença pode ser assintomática ou cursar com manifestações clínicas que variam de formas leves a quadros graves(1). Quando presentes, os sintomas mais comuns na gestação são febre (67%) e tosse (66%), acompanhados em menor frequência por mal-estar, dispnéia e diarreia. Os achados laboratoriais indicam a ativação dos sistemas inflamatório e da coagulação, tendo sido descritas elevação do D-dímero (22%), linfocitopenia (14%) e elevação da Proteína C-reativa (19%). Na tomografia de tórax predomina o padrão em vidro fosco (82%) sobre o achado de áreas de consolidação (18%) (2). A experiência de

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.154.765

outras pandemias com comprometimento respiratório mostrou que grávidas e puérperas tinham maior risco de evolução para formas graves e morte, como foi observado nas epidemias causadas pelo influenza H1N1 e, principalmente, pelos coronavírus SARS-CoV e MERS-CoV, cujas taxas de mortalidade na gestação foram de 25% e 27%, respectivamente (3). No entanto, apesar da semelhança estrutural entre os coronavírus, as evidências disponíveis indicam uma virulência menor para o SARS-CoV-2 na gestação, com menores taxas de admissão em UTI, intubação e morte, quando comparadas ao SARS-CoV e MERS-CoV (4). Em recente revisão sistemática que incluiu 385 gestantes, mais de 95% dos casos foram leves, 4% graves e presente são praticamente limitadas a casos de infecção no terceiro trimestre, e que os efeitos da infecção materna no primeiro e segundo trimestres permanecem largamente inexplorados. Outro aspecto importante diz respeito ao risco de contaminação do recém-nascido durante ou logo após o nascimento. Práticas como clameamento tardio do cordão e contato pele a pele entre mães e recém-nascidos não são universalmente recomendadas e as evidências sobre o risco de contágio durante o aleitamento materno ainda são limitadas (13, 14). Considerando que neonatos não têm anticorpos contra outros coronavírus, teoricamente eles podem ser mais vulneráveis à infecção por SARS-CoV-2. A infecção materna por SARS-CoV-2 não expõe o feto e neonato apenas aos efeitos causados diretamente pelo vírus. As consequências da resposta inflamatória materna e fetal, com produção de citocinas potencialmente citotóxicas, assim como o efeito do uso de medicações antivirais não foram adequadamente estudadas até o presente. O relato de adultos infectados que desenvolveram doenças neurológicas, como confusão mental, acidente vascular cerebral, convulsão ou perda de olfato, sugere um efeito direto ou indireto no sistema nervoso central (SNC). Igualmente, foi relatado um quadro de encefalopatia hemorrágica aguda diagnosticada através da ressonância magnética em uma mulher na sexta década de vida acometida por COVID 19 (15). A prevalência de comprometimento neurológico pela doença ainda está sendo observada, mas um estudo com 214 pacientes no Japão mostrou que 36% apresentavam algum achado clínico relacionado ao sistema nervoso (16). Em estudos pré-clínicos, estudos com ratos geneticamente modificados para expressar o receptor para o vírus SARS-CoV mostraram que, ao ser colocado em contato com a mucosa nasal, o microrganismo não se disseminava em direção aos pulmões mas preferencialmente em direção ao cérebro, através dos neurônios olfativos. Uma vez no cérebro, o SARS-CoV se disseminou rapidamente, causando danos nos nervos que levaram à morte dos animais (17). Alguns anos depois, o experimento foi replicado com o coronavírus MERS-CoV (18). Em ambos os estudos, o microrganismo mostrou maior afinidade por neurônios de determinadas áreas, incluindo o tronco cerebral, envolvido na regulação da respiração involuntária. Em humanos,

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.154.765

o tropismo neurológico do SARS-CoV-2 poderia ser investigado de forma indireta através de métodos de imagem e foi sugerido que o vírus pode estar presente no líquido cefalorraquidiano 1, o que sem dúvida abre perspectivas interessantes de pesquisa para pacientes com COVID-19 que já farão punção lombar por outro motivo. Do exposto, fica evidente que a infecção pelo SARS-CoV-2 durante a gestação abre um espectro de possibilidades de pesquisa quanto aos efeitos na saúde materna, fetal, neonatal e ao longo da infância. A descrição das consequências da infecção e a investigação dos mecanismos moleculares subjacentes podem propiciar um melhor entendimento da doença e abrir portas para o cuidado e tratamento baseados em achados científicos. O estudo que aqui propomos é viável, já que se trata de uma pesquisa principalmente observacional, sem riscos agregados para os participantes. Adicionalmente, o momento é oportuno do ponto de vista operacional, uma vez que se espera uma rápida concentração de novos casos em um curto intervalo de tempo, com resolução em poucos meses. Essa situação permite a concentração de esforços em um espaço de tempo limitado, favorecendo a coleta de dados, reduzindo custos e diminuindo o risco de perdas de seguimento. Finalmente, entendemos que o momento é especialmente propício do ponto de vista do comprometimento das agências de fomento à pesquisa, do interesse dos pesquisadores e da vontade de colaboração da população. Frente a uma pandemia que paralisou as atividades laborais e sociais, abalou a economia mundial e atualmente ameaça ceifar vidas em todos os estratos sociais, é perceptível uma vontade coletiva de colaboração mútua para achar respostas à altura das circunstâncias.

HIPÓTESE

A exposição materna à infecção pelo vírus SARS-CoV-2 durante a gestação está associada a riscos diretos à própria gestação, à gestante e ao feto em desenvolvimento? A gestação em si poderia exercer efeito protetor ou deletério sobre o binômio mãe-feto em relação à gravidade da COVID-19? A exposição intraútero à infecção pelo vírus SARS-CoV2 está associada a alteração no desenvolvimento neuropsicomotor infantil?

METODOLOGIA

O estudo será realizado no período de junho de 2020 a janeiro de 2026 na cidade de Brasília – DF, no Hospital Universitário de Brasília (HUB-UnB) e Hospital Regional da Asa Norte (HRAN) e dividido em dois braços (PREGNANT E BORN). Procedimentos Operacionais: SUBGRUPO PREGNANT: No HRAN, as gestantes na fase aguda da COVID-19 serão atendidas, internadas e submetidas a parto segundo necessidade, após submissão do termo de consentimento e questionário epidemiológico.

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.154.765

No HUB-UnB, questionário será realizado em primeira consulta de pré-natal para avaliação de história clínica e sociodemográfica das mães; idade gestacional; sintomas, intervenções e resultados relacionados ao COVID-19; triagem para infecções congênitas e outras morbidades, além de triagem para avaliação psicológica, por meio do Inventário de Depressão de Beck (BDI). As consultas pré-natais ocorrerão mensalmente até a semana 34; a cada 2 semanas, entre as semanas 34 e 36; e então semanalmente até o parto no HUB-UnB. Durante avaliação pré-natal será realizada avaliação geral de saúde; exame físico geral; testes bioquímicos clínicos de rotina e ultrassonografia obstétrica. O sangue materno será coletado na primeira consulta de pré-natal. Durante o parto será realizada a coleta de sangue materno, sangue de cordão umbilical e liquor exclusivamente nas pacientes com indicação de punção lombar para raqui-anestesia. As amostras de tecido placentário serão colhidas logo após o nascimento da criança e armazenadas até o momento da análise. NO SUBGRUPO BORN, os dados do recém-nascido serão colhidos imediatamente após o nascimento. A coleta de sangue e liquor do recém-nascido ocorrerá segundo necessidade médica apenas em crianças com necessidade de cuidados neonatais. Para todas as análises será utilizado o sangue do cordão umbilical e o sangue periférico coletados com 6, 12 e 24 meses. Ressonância magnética cerebral será realizada aos neonatos segundo necessidade médica seguindo a técnica padrão. Ultrassonografia transfontanela será realizada nas crianças filhas de mães com COVID 19 na gestação e comparadas a crianças que não foram expostas ao COVID-19. O acompanhamento do crescimento e desenvolvimento infantil seguirá os intervalos determinados pelo Ministério da Saúde e ocorrerá em um ambulatório especificamente criado para esse fim, composto por equipe multidisciplinar de médicos pediatras, psicólogos, terapeutas ocupacionais, fonoaudiólogos e enfermeiros. Será realizada avaliação de neurodesenvolvimento até os 42 meses de vida que contemplará aspectos cognitivos, motores, socioemocionais e relacionados à linguagem e comportamento adaptativo e será realizada com a versão validada da Escala de Desenvolvimento Infantil Bayley IV. A partir de dois anos e meio de idade serão também avaliados aspectos relacionados ao desempenho intelectual, através da Escala Wechsler de Pré-Escola e Inteligência Primária, com intervalo de seis meses até completar 5 anos de idade. Será realizada análise de anticorpos e citocinas em amostras de leite humano em lactantes infectadas pelo SARS-CoV-2 no ou vacinadas durante o seguimento. Será realizada avaliação oftalmológica de rotina com 6, 12 e 24 meses de idade. Após as coletas de material biológico, as amostras serão centrifugadas e armazenadas em freezer a -87° C localizado no Hospital Universitário de Brasília, endereço: Setor de Grandes Áreas Norte 605 - Asa Norte, Brasília - DF, Sala de Pesquisa Clínica. Posteriormente, amostras serão encaminhadas à FIOCRUZ/Minas no

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.154.765

seguinte endereço: Avenida Augusto de Lima, nº 1.715, Barro Preto, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, aos cuidados do Professor Olindo Filho. Amostras de líquido serão encaminhadas para University of Kaiserslautern Gottlieb-Daimler localizada em Kaiserslautern, Alemanha no seguinte endereço: Strabe 67773, Center for Cognitive Science, em nome do Professor Thomas Lachmann. O prazo para armazenamento do material biológico no Brasil e no exterior será de 05 anos, até o final da pesquisa.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Composição da Amostra:

Mulheres expostas: amostragem por conveniência. Serão consultados dados do centro de registro obrigatório de resultados positivos (Diretoria de Vigilância Epidemiológica – DIVEP) e oferecidas vagas de pré-natal de alto risco em ambulatório próprio a este fim no HUB-UnB a mulheres com idade superior a 18 anos, gestantes, com teste positivo para SARS-CoV-2 durante qualquer etapa da gestação. Será oferecida a assistência ao parto no HUB-UnB ou HRAN (para os casos de doença COVID-19 na fase aguda). O recrutamento finalizará ao alcançar um n de 300 mulheres.

Mulheres não expostas: amostragem por conveniência. Durante os meses do estudo, será oferecida sorologia ou teste rápido para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 (IgG e IgM) a todas as mulheres admitidas para assistência ao parto no Hospital Universitário de Brasília. Àquelas com sorologia ou teste rápido negativo e que consentam em participar do estudo, será oferecido consulta puerperal no HUB-UnB e acompanhamento de Crescimento e Desenvolvimento para seus filhos no Serviço de Pediatria do Hospital Universitário de Brasília, até a idade de cinco anos, em um ambulatório criado especificamente para esse fim. O recrutamento finalizará ao alcançar um n 300 de mulheres.

Recém-nascidos expostos: a amostra será composta pelos filhos das mulheres infectadas pelo SARS-CoV-2 nas distintas fases da gravidez, que conformaram a amostra de “expostas” ou recém-nascidos cujas mães comprovaram a exposição ao SARS-CoV-2 durante a gestação.

Recém-nascidos não expostos: a amostra será composta pelos filhos de mulheres que conformaram o grupo “não expostas” que permaneçam com sorologia negativa até o fim do período neonatal. Neonatos expostos: grupo representado por recém-nascidos não expostos que forem infectados no período neonatal. Ao diagnóstico, passarão a integrar o grupo “recém-nascidos expostos” para fins de acompanhamento pediátrico.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**

Continuação do Parecer: 5.154.765

Mulheres expostas: Doenças crônicas pré-existent graves com necessidade de uso contínuo de medicamentos e que possam afetar significativamente o desfecho materno e fetal. Tabagismo e/ou etilismo; Suspeita ou confirmação de outras infecções congênitas como toxoplasmose, sífilis, rubéola, herpes, Chagas e zika. Impossibilidade de acompanhamento sequencial até o parto.

Mulheres não expostas: Doenças crônicas pré-existent graves com necessidade de uso contínuo de medicamentos que possam afetar significativamente o desfecho materno e fetal; Tabagismo e/ou etilismo; Suspeita ou confirmação de outras infecções congênitas, como toxoplasmose, sífilis, rubéola, herpes, Chagas e zika. Impossibilidade de acompanhamento sequencial até o parto.

Recém-nascidos expostos: Indícios ou confirmação de síndromes genéticas; Suspeita ou confirmação de outras infecções congênitas, como toxoplasmose, sífilis, rubéola, herpes Chagas e zika; Impossibilidade de acompanhamento sequencial até os cinco anos de vida.

Recém-nascidos não expostos: Indícios ou confirmação de síndromes genéticas; Suspeita ou confirmação de outras infecções congênitas, como toxoplasmose, sífilis, rubéola, chagas, herpes e zika; Impossibilidade de acompanhamento sequencial até os cinco anos de vida.

Objetivo da Pesquisa:**OBJETIVO PRIMÁRIO**

Determinar os efeitos da infecção por SARS-CoV-2 na gestação, parto e puerpério e comparar os achados clínicos, epidemiológicos, psicológicos, imagenológicos, laboratoriais e de desenvolvimento a longo prazo entre filhos de mães expostas e não expostas à infecção pelo SARS-CoV-2 durante a gestação.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- 1 - Avaliar o efeito da COVID-19 nos indicadores de morbidade e mortalidade materna;
- 2- 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.
- 3- Investigar a presença do SARS-CoV-2 e/ou de anticorpos anti-SARS-CoV-2 no sangue materno, sangue do cordão umbilical, naquelas mulheres submetidas a raquianestesia para cesárea, no líquido e no leite materno
- 4 -Investigar a presença de marcadores inflamatórios, fatores epigenéticos e expressão gênica no sangue materno, sangue do cordão umbilical, naquelas mulheres submetidas a raquianestesia para

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar**Bairro:** Asa Norte**CEP:** 70.719-040**UF:** DF**Município:** BRASÍLIA**Telefone:** (61)3315-5877**E-mail:** cone@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.154.765

pré-natal integral, incluindo consultas médicas, acompanhamento psicológico, exames laboratoriais e de imagem no Hospital Universitário de Brasília, assim como a assistência ao parto e nascimento no HUB-UnB ou HRAN. Igualmente, aos filhos das participantes, será garantido o acompanhamento do crescimento e desenvolvimento no ambulatório de pediatria do HUB, criado especialmente a este fim.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Etapa A (braço PREGNANT): Estudo observacional longitudinal, prospectivo. Refere-se ao acompanhamento de gestantes infectadas pelo SARS-CoV-2 em qualquer etapa da gestação, desde o momento da identificação da infecção até a alta domiciliar pós-parto. **Etapa B (braço BORN):** Estudo de coortes prospectivo, comparativo, analítico. Refere-se ao acompanhamento de recém-nascidos filhos de mães expostas e de mães não expostas à infecção pelo SARS-CoV-2 durante a gestação.

Braços do estudo:

- RN expostos: Assistência ao nascimento, assistência pediátrica durante a internação na maternidade, exames laboratoriais de rotina, ressonância magnética, puericultura, avaliação do neurodesenvolvimento infantil.
- RN Não expostos: Assistência ao nascimento, assistência pediátrica durante a internação na maternidade, exames laboratoriais de rotina, puericultura, avaliação do neurodesenvolvimento infantil.
- Gestantes expostas: Consultas de pré-natal, exames laboratoriais e de imagem de rotina, parto e acompanhamento puerperal.
- Gestantes não-expostas: Consultas de pré-natal, exames laboratoriais e de imagem de rotina, parto e acompanhamento puerperal.

Patrocinador: O grupo de pesquisa PRODEST enviou o projeto para editais de fomento de pesquisa e aguarda respostas. Foram enviadas solicitações de fomento para editais do CNPQ, FAPEDF e edital COPEI da UnB. Até o momento sem resposta. As análises de citocinas serão custeadas pela FIOCRUZ/Minas conforme apresentado na emenda. Outros materiais de custeio e custo de publicações tem sido financiado pelo grupo de pesquisadores.

Número de participantes incluídos no Brasil: 1.200

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.154.765

Participarão os seguintes centros de pesquisa no Brasil: Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal, Instituição Instituto René Rachou/FIOCRUZ Minas, Hospital Regional da Asa Norte – HRAN, Distrito Federal Secretaria de Saúde, Escola Superior de Ciências da Saúde.

Haverá armazenamento de amostras: As análises de mRNA serão realizadas pelo Laboratório de Biologia da Universidade Técnica de Kaiserslautern na Alemanha. O laboratório do exterior vai custear o transporte das amostras, as análises e o custo da publicação. A participação do grupo de pesquisadores da Alemanha será na análise de mRNA das amostras de líquido cefalorraquidiano conforme consta no projeto e na publicação em revista científica destas análises em conjunto com o nosso grupo que fornecerá dos dados clínicos.

Previsão de início do estudo: 01/06/2021

Previsão de encerramento do estudo: 31/08/2026

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise de respostas ao Parecer Consubstanciado Conep nº 5.074.613 emitido pela Conep em 01/11/2021:

1. Como há previsão de armazenamento de material biológico em biorrepositório no exterior, solicita-se apresentar regulamento dos laboratórios no exterior envolvidos no armazenamento do material biológico: detalhamento operacional e de infraestrutura, bem como as condições de armazenamento do material, que podem estar contidos no projeto de pesquisa detalhado ou em forma de declaração. Cabe ressaltar que o prazo de armazenamento de material biológico humano em biorrepositório deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa correspondente e pode ser autorizado por até dez anos. Solicita-se explicitar no projeto de pesquisa o tempo de armazenamento.

RESPOSTA: Segue em anexo carta de cooperação entre a Universidade de Kaiserslautern, Alemanha e a Universidade de Brasília para realização do estudo em questão.

O prazo para armazenamento do material biológico será de 05 anos, até o final da pesquisa (2026) e está explicitado no "projeto de pesquisa modificado" realçado em cor da fonte vermelha.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: coneplsaude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.154.765

2. Quanto ao termo de consentimento livre e esclarecido referente ao arquivo "Novo_TCLE.pdf", postado na Plataforma Brasil em 05/07/2021, seguem as considerações:

2.1. Na página 2 de 3, lê-se: "Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte)". Solicita-se incluir no TCLE que, quando for necessário seu deslocamento em função do estudo, será garantido o ressarcimento, de TODAS AS DESPESAS do participante da pesquisa e de seu acompanhante com o estudo. Salienta-se que os itens ressarcidos não são apenas aqueles relacionados a transporte e alimentação, mas a todo gasto decorrente da participação no estudo (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.21 e IV.3.g).

RESPOSTA: Modificações realizadas no TCLE constando nas linhas 82 a 84 do TCLE modificado e realçadas em cor da fonte vermelha:

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária. Se houver necessidade, será garantido o ressarcimento de TODAS as despesas suas e do seu acompanhante, incluindo aquelas relacionadas a transporte, alimentação ou quaisquer outros gastos decorrente da participação do estudo.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.2. Solicita-se inserir no TCLE a explicitação acerca do direito de buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.h).

RESPOSTA: Modificações realizadas no TCLE constando nas linhas 86 e 87 do TCLE modificado e realçadas em cor da fonte vermelha:

É seu direito buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.3. Solicita-se incluir no TCLE o pedido de autorização para coleta, depósito, armazenamento e utilização do material biológico humano no exterior. Para melhor esclarecer o participante da pesquisa, solicita-se informar no TCLE o nome e o país onde estão localizados os laboratórios centrais em que as amostras biológicas coletadas no estudo serão processadas e armazenadas (Resolução CNS nº 441 de 2011, item 2.II).

RESPOSTA: Modificações realizadas no TCLE constando nas linhas 64 a 72 do TCLE modificado e realçadas em cor da fonte vermelha:

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.154.765

Sobre armazenamento e utilização de material biológico: o sangue coletado no seu braço, o sangue do cordão umbilical, o sangue da criança, o líquido e a placenta serão coletados, armazenados e enviados para estudo em laboratórios do Brasil e do exterior. O material biológico humano coletado poderá ser enviado para o laboratório localizado em Kaiserslautern, Alemanha no seguinte endereço: University of Kaiserslautern Gottlieb-Daimler-Strabe 67773 – Center for Cognitive Science no nome do Professor Thomas Lachmann, assim como para a Fiocruz Minas, no seguinte endereço: Avenida Augusto de Lima, nº 1.715, Barro Preto, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil CEP: 30.190-002, aos cuidados do Professor Olindo Filho ou ainda permanecerão armazenado para estudo no Hospital Universitário de Brasília, endereço: Setor de Grandes Áreas Norte 605 - Asa Norte, Brasília - DF, 70840-90, Sala de Pesquisa Clínica, aos cuidados dos pesquisadores Geraldo Magela e Lizandra Paravidine até o fim do estudo programado para 2026.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.4. Solicita-se que seja informado no TCLE que a retirada do consentimento de guarda das amostras biológicas humanas armazenadas em banco deverá ser realizada POR ESCRITO E ASSINADA, podendo dar-se a qualquer tempo, sem prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão (Resolução CNS nº 441 de 2011, item 10.I).

RESPOSTA: Modificações realizadas no TCLE constando nas linhas 74 a 76 do TCLE modificado e realçadas em cor da fonte vermelha:

A retirada do consentimento de guarda das amostras biológicas humanas armazenadas deverá ser realizada por escrito e assinada, podendo dar-se a qualquer tempo, sem prejuízo a você participante, com validade a partir da data da comunicação da decisão.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.5. Solicitam-se esclarecimentos quanto ao destino das amostras biológicas ao final das análises (exames) realizadas no estudo, isto é, se as amostras serão ou não destruídas. Caso as amostras sejam armazenadas para análises futuras, solicita-se adequar a documentação inserida na Plataforma Brasil à Resolução CNS nº 441 de 2011 e à Portaria MS nº 2.201 de 2011.

RESPOSTA: Modificações realizadas no TCLE constando nas linhas 72 e 73 do TCLE modificado e realçadas em cor da fonte vermelha:

Após a finalização dos exames e análises do material biológico, as amostras serão descartadas.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.154.765

2.6. Solicita-se que seja expresso de modo claro e afirmativo no TCLE que, caso necessário, será garantido o direito à assistência integral e gratuita ao participante, devido a danos decorrentes da participação na pesquisa e pelo tempo que for necessário (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.3.1 e II.3.2).

RESPOSTA: Modificações realizadas no TCLE constando nas linhas 86 a 88 do TCLE modificado e realçadas em cor da fonte vermelha:

Em caso de danos decorrentes da participação na pesquisa, você receberá assistência integral e imediata de forma gratuita pelos pesquisadores pelo tempo que for necessário. É seu direito buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.7. Deve ser garantido o acesso ao resultado do estudo, sempre que solicitado, em linguagem apropriada ao entendimento do participante ou do seu representante legal, conforme preconizado no item III.2.i da Resolução CNS nº 251 de 1997. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Modificações realizadas no TCLE constando nas linhas 80 a 82 do TCLE modificado e realçadas em cor da fonte vermelha:

A Sra. poderá solicitar, se assim quiser, o relatório final da pesquisa. Também, cópias de todos os resultados dos exames complementares realizados nesta pesquisa poderão ser solicitadas ao pesquisador. Ao término da pesquisa e com resultados demonstrados, você poderá nos solicitar e enviaremos o resultado pra você.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa.

Situação: Emenda aprovada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_167018_4_E1.pdf	30/11/2021 16:54:02		Aceito

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.154.765

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Estudo_PROUDEST_com_emendasCO NEP_30112021versao3.pdf	30/11/2021 15:46:23	LIZANDRA MOURA PARAVIDINE SASAKI	Aceito
Outros	Cooperacao_UNB_Alemanha.pdf	24/11/2021 23:59:05	LIZANDRA MOURA PARAVIDINE	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	CARTA_RESPOSTA_CONEP_EMEND A.docx	24/11/2021 23:42:13	LIZANDRA MOURA PARAVIDINE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_revisado2021versaolimpa.docx	24/11/2021 23:39:39	LIZANDRA MOURA PARAVIDINE SASAKI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_revisado2021modificacoes_realc adas.docx	24/11/2021 23:39:19	LIZANDRA MOURA PARAVIDINE SASAKI	Aceito
Cronograma	Cronograma_Proudest.pdf	08/09/2021 14:22:05	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Solicitação registrada pelo CEP	Carta_de_Respostas_as_Pendencias_29 0821.pdf	30/08/2021 11:00:49	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Parecer Anterior	parecer_anterior.pdf	30/08/2021 10:55:09	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Brochura Pesquisa	Estudo_PROUDEST_com_emendas_05 0721.docx	05/07/2021 13:59:49	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Brochura Pesquisa	Estudo_PROUDEST_com_emendas_05 0721.pdf	05/07/2021 13:59:35	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Novo_TCLE.pdf	05/07/2021 13:56:06	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	CV_Tulio_Medina.pdf	05/07/2021 11:45:56	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	CV_Zaconeta.pdf	05/07/2021 11:41:20	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	CV_Cleandro.pdf	05/07/2021 11:40:57	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	EmendaProudest3006.pdf	30/06/2021 16:55:30	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	CV_Aveliny.pdf	30/06/2021 16:32:58	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Yacara_Ribeiro_Pereira.pdf	30/06/2021 15:29:27	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Wanessa_Tavares_Santos.pdf	30/06/2021 15:28:05	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	CV_VitoriaReis.pdf	30/06/2021 15:27:15	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.154.765

Outros	CV_RodrigoNery.pdf	30/06/2021 15:26:45	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Rosana_Trstao.pdf	30/06/2021 15:23:53	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Patricia_Shu.pdf	30/06/2021 15:23:19	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Pabline_Cavalcante_da_Silva.pdf	30/06/2021 15:22:18	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	CV_Martins_OA.pdf	30/06/2021 15:21:45	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Maria_Eduarda_Canellas_de_Castro.pdf	30/06/2021 15:20:07	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Lucieny_Silva_Martins_Serra.pdf	30/06/2021 15:19:41	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Luiz_Claudio.pdf	30/06/2021 15:19:03	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	CV_Lucas.pdf	30/06/2021 15:18:21	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Leticia_Avelina.pdf	30/06/2021 15:17:44	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	CV_Gustavo_Takano.pdf	30/06/2021 15:15:56	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Fabiola_Zucchi.pdf	30/06/2021 15:13:48	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	DAvid.pdf	30/06/2021 15:12:22	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Caroline_de_Oliveira_Alves.pdf	30/06/2021 15:02:51	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	CV_Cecilia.pdf	30/06/2021 15:02:17	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	CV_Beto.pdf	30/06/2021 15:01:52	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Bruna_Nunes.pdf	30/06/2021 15:00:32	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Agenor_de_Castro.pdf	30/06/2021 14:58:56	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Alessandra_Rocha.pdf	30/06/2021 14:57:12	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Alexandre.pdf	30/06/2021 14:51:48	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Aleida.pdf	30/06/2021 14:51:14	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Karina_Nascimento_Costa.pdf	30/06/2021 14:50:13	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Lizandra.pdf	30/06/2021 14:45:39	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Outros	Felipe.pdf	30/06/2021	GERALDO MAGELA	Aceito

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conepe@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.154.765

Outros	Felipe.pdf	14:42:25	FERNANDES	Aceito
Outros	Geraldo_Magela_Fernandes.pdf	30/06/2021 14:41:27	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_Anuencia_FIOCRUZ_Minas_ Projeto_PROUDEST.pdf	30/06/2021 14:29:06	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_ CEP_4055854.pdf	10/02/2021 23:35:11	LIZANDRA MOURA PARAVIDINE	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorepositorio.docx	10/02/2021 23:10:34	LIZANDRA MOURA PARAVIDINE SASAKI	Aceito
Outros	ESCALAS_DE_DEPRESSAO.docx	10/02/2021 07:29:05	LIZANDRA MOURA PARAVIDINE	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 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

BRASILIA, 11 de Dezembro de 2021

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador(a))

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte CEP: 70.719-040
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.154.765

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040

UF: DF **Município:** BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

14.5 ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



PRODEST

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



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 rubriche as folhas e assine 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 materno, a placenta, o sangue do cordão umbilical também serão encaminhados para estudos em laboratórios. Caso você ou seu bebê precisem fazer uma anestesia ou punção na coluna por outro motivo, o líquido que encontra-se na medula espinhal) também será estudado. No caso da criança ela poderá ser submetida a uma ecografia do cérebro (ecografia transfontanela) ou a uma ressonância magnética de crânio se necessário para diagnóstico de possíveis doenças cerebrais, sendo tais exames indolores e realizados com a criança acordada ou dormindo, se indicado. Não serão solicitados exames de sangue da criança que forem diferentes da rotina clínica habitual, exceto para pesquisa da presença do coronavírus 19, anticorpos anti coronavírus 19 ou citocinas inflamatórias 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 _____



PROUDEST

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



Benefícios para o voluntário da pesquisa: o primeiro benefício deste estudo não é apenas para você, mas para toda a sociedade, pois permitirá que os médicos e gestores de saúde entendam melhor a doença e possam tratar melhor outras gestantes infectadas, assim como seus filhos. Outro benefício é que as participantes deste estudo que assim o desejarem terão todas as consultas de pré-natal, exames laboratoriais e ecografias realizadas no Hospital Universitário de Brasília, onde também poderão ter o parto. Igualmente, caso você participe do estudo, o seu filho poderá fazer todas as consultas de acompanhamento pediátrico no HUB.

Sobre armazenamento e utilização de material biológico: o sangue coletado no seu braço, o sangue do cordão umbilical, o sangue da criança, o líquido e a placenta serão coletados, armazenados e enviados para estudo em laboratórios do Brasil e do exterior. O material biológico humano coletado poderá ser enviado para o laboratório localizado em Kaiserslautern, Alemanha no seguinte endereço: University of Kaiserslautern Gottlieb-Daimler-Strabe 67773 – Center for Cognitive Science no nome do Professor Thomas Lachmann, assim como para a Fiocruz Minas, no seguinte endereço: Avenida Augusto de Lima, nº 1.715, Barro Preto, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil CEP: 30.190-002, aos cuidados do Professor Olindo Filho ou ainda permanecerão armazenado para estudo no Hospital Universitário de Brasília, endereço: Setor de Grandes Áreas Norte 605 - Asa Norte, Brasília - DF, 70840-90, Sala de Pesquisa Clínica, aos cuidados dos pesquisadores Geraldo Magela e Lizandra Paravidine até o fim do estudo programado para 2026. Após a finalização dos exames e análises do material biológico, as amostras serão descartadas.

A retirada do consentimento de guarda das amostras biológicas humanas armazenadas deverá ser realizada por escrito e assinada, podendo dar-se a qualquer tempo, sem prejuízo a você participante, com validade a partir da data da comunicação da decisão.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais (secretas) e serão repassadas apenas em reuniões ou publicações científicas, sem identificar as pessoas. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas e no computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço acima informado, pelo período mínimo de 5 anos.

A Sra. poderá solicitar, se assim quiser, o relatório final da pesquisa. Também, cópias de todos os resultados dos exames complementares realizados nesta pesquisa poderão ser solicitadas ao pesquisador. Ao término da pesquisa e com resultados demonstrados, você poderá nos solicitar e enviaremos o resultado pra você.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária. Se houver necessidade, será garantido o ressarcimento de TODAS as despesas suas e do seu acompanhante, incluindo aquelas relacionadas a transporte, alimentação ou quaisquer outros gastos decorrente da participação do estudo.

Em caso de danos decorrentes da participação na pesquisa, você receberá assistência integral e imediata de forma gratuita pelos pesquisadores pelo tempo que for necessário. E seu direito buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Geraldo Magela Fernandes no telefone (61) 981070071, email geraldofernandes@unb.br; Lizandra Moura Paravidine Sasaki no telefone (61) 98424-8707, email: lizandra78@gmail.com ou Licia Maria Henrique da Mota nos telefones (61) 99221-559, email: liciammota@gmail.com, disponíveis inclusive para ligação a cobrar.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina (CEP/FM) da Universidade de Brasília. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidos pelo telefone (61) 3107-1918 ou do e-mail cepfm@unb.br, horário de atendimento de 08:30hs às 12:30hs e de 14:30hs às 16:00hs, de segunda a sexta-feira. O CEP/FM está localizado na Faculdade de Saúde/Faculdade de Medicina no 2º andar do prédio, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Asa Norte, DF.

Brasília, _____ de _____ de _____

Nome do Participante da Pesquisa

Assinatura do Participante da Pesquisa

Assinatura dos Pesquisadores