

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

MARIA EDUARDA CANELLAS DE CASTRO

**ANÁLISE COMPARATIVA DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO MOMENTO DO  
PARTO: DIÁLOGO ENTRE MÃES EXPOSTAS AO SARS-COV-2 NA GESTAÇÃO E  
SEUS RECÉM-NASCIDOS**

BRASÍLIA  
2025

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

MARIA EDUARDA CANELLAS DE CASTRO

**ANÁLISE COMPARATIVA DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO MOMENTO DO  
PARTO: DIÁLOGO ENTRE MÃES EXPOSTAS AO SARS-COV-2 NA GESTAÇÃO E  
SEUS RECÉM-NASCIDOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Anderson de Sousa Munhoz Soares

**BRASÍLIA  
2025**

MARIA EDUARDA CANELLAS DE CASTRO

**ANÁLISE COMPARATIVA DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO MOMENTO DO PARTO: DIÁLOGO ENTRE MÃES EXPOSTAS AO SARS-COV-2 NA GESTAÇÃO E SEUS RECÉM-NASCIDOS**

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

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Alexandre Anderson de Sousa Munhoz Soares (Presidente)**

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

**Profa. Dra. Meimei Guimarães Junqueira de Queirós**

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

**Profa. Dra. Marta David Rocha de Moura**

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

**Prof. Dr. Paulo Roberto Margotto**

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

**Prof. Dr. Luiz Sérgio Fernandes de Carvalho (Suplente)**

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

Canellas de Castro, Maria Eduarda

**Análise comparativa de mediadores inflamatórios no momento do parto: diálogo entre mães expostas ao SARS-CoV-2 na gestação e seus recém-nascidos.**

Brasília, 2025.

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

Orientador: Alexandre Anderson de Sousa Munhoz Soares

**1. SARS-CoV-2 2. Infecção pré-natal 3. Mediadores imunológicos solúveis 4. Interação materno-fetal 5. Recém-nascido**

Dedico este trabalho ao Victor, meu esposo e melhor amigo, que caminhou ao meu lado com apoio incansável e carinho permanente, especialmente nos momento em que acolheu Olga e Emília, nossas pequenas que chegaram durante o doutorado.

Dedico também aos meus companheiros e guias de jornada. Ao Geraldo, meu professor, mentor e amigo, que me convidou para encarar este projeto e me deu suporte em tempo integral. Ao Felipe, grande companheiro de profissão, incentivador e amigo fiel. Aos queridos Olindo, Ismael, Joaquim e Vitor do Instituto René Rachou da Fiocruz, que cuidaram de parte importante das amostras coletadas durante o projeto e viabilizaram meu aprendizado na escrita e publicação de um artigos científicos de qualidade. Ao Professor Alexandre Munhoz cuja orientação atenta, suporte contínuo e estímulo incansável foram fundamentais para a realização deste doutorado. A vocês serei eternamente grata.

Dedico ainda às 314 crianças e suas famílias, que se esforçaram para comparecer às consultas e participar das atividades do Projeto PROUDEST que deu origem a essa tese.

“Tudo vale a pena se a alma não é pequena”

- Fernando Pessoa

## RESUMO

**Fundamentos:** A pandemia de COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, impôs importantes desafios à saúde materno-fetal. Infecções na gestação representam risco para a mãe e podem influenciar o desenvolvimento fetal, dado que o sistema imunológico materno passa por mudanças significativas nesse período. Embora a transmissão vertical seja rara, a infecção materna pode modificar o ambiente imunológico fetal. Assim, estudar perfis de mediadores inflamatórios solúveis em mães e recém-nascidos é essencial para compreender o ambiente pré-natal e seus impactos. Contudo, o efeito global do SARS-CoV-2 na interface imunológica materno-fetal permanece pouco esclarecido, incluindo se o perfil imunológico do sangue do cordão umbilical reflete o padrão observado no soro materno.

**Objetivos:** Investigar a interação imunológica entre mãe e recém-nascido diante da exposição antenatal ao SARS-CoV-2, descrevendo assinaturas distintas de mediadores solúveis conforme a fase da infecção materna. Buscou-se caracterizar o perfil de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, reguladoras e fatores de crescimento no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos expostos (agudo ou convalescente) em comparação a controles saudáveis; comparar essas assinaturas entre cordão umbilical e soro materno por meio de *fold change*; identificar mediadores-chave e suas dinâmicas de alteração e persistência nos dois compartimentos; e analisar a conectividade das redes imunológicas para compreender correlações cruzadas entre os microambientes materno e neonatal expostos ao SARS-CoV-2 durante a gestação.

**Métodos:** Foi realizada uma análise paralela de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento em amostras pareadas de soro materno e sangue do cordão umbilical dos neonatos. Os participantes foram divididos em subgrupos baseados no momento da infecção materna por COVID-19: infecção Aguda (até 14 dias após o início dos sintomas na hora do parto), e fases convalescentes classificadas como Inicial (infecção no 3º trimestre), Intermediária (infecção no 2º trimestre) e Tardio (infecção no 1º trimestre), além de um grupo de controles saudáveis (CS). A análise comparativa entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis seguida do pós-teste de Dunn, e a comparação entre amostras pareadas foi feita pelo teste de Wilcoxon. Além disso, foram empregadas análises de rede integrativas para explorar a conectividade e o interplay entre os mediadores inflamatórios nos microambientes materno e do sangue do cordão umbilical.

**Resultados:** Os dados revelaram que amostras de sangue do cordão umbilical de neonatos de mães com COVID-19 aguda e convalescente apresentaram níveis aumentados de diversos mediadores inflamatórios. Notavelmente, CCL11, IFN- $\gamma$ ,

IL1-Ra e G-CSF mostraram níveis elevados na maioria dos subgrupos de COVID-19 no sangue do cordão umbilical, com magnitudes de *fold change* variando de 1,6x a 8,2x em comparação com os controles saudáveis. A análise comparativa de pares mãe-recém-nascido demonstrou que mediadores como CCL11, CCL4, IFN- $\gamma$ , PDGF e G-CSF exibiram uma magnitude de incremento significativamente maior no sangue do cordão umbilical em comparação com o soro materno, atingindo valores de até 15,7x, particularmente na fase convalescente da COVID-19. As assinaturas dos mediadores inflamatórios solúveis revelaram perfis distintos para o sangue do cordão umbilical e o soro materno: enquanto o soro materno exibiu um declínio progressivo de mediadores, o sangue do cordão umbilical mostrou um conjunto crescente de moléculas desde a fase aguda até a convalescença da COVID-19. A análise de rede integrativa demonstrou um aumento da conectividade e da interação entre os mediadores inflamatórios em ambos os microambientes, progredindo da fase aguda para a convalescença tardia da COVID-19.

**Conclusão:** Nossos resultados fornecem fortes evidências de que o perfil imunológico do sangue do cordão umbilical não reflete passivamente o do soro materno, mas apresenta assinaturas imunológicas distintas e dinâmicas em resposta à exposição pré-natal ao SARS-CoV-2. A persistência de elevações em mediadores como CCL11, IFN- $\gamma$ , IL1-Ra e G-CSF no sangue do cordão umbilical, independentemente do estágio da infecção materna, sugere um fenômeno de "preparação in utero" (*utero priming*) que pode modular a imunidade neonatal a longo prazo. As marcadas diferenças nos níveis de mediadores como PDGF e G-CSF entre o soro materno e o sangue do cordão umbilical, especialmente durante a convalescença, reforçam a necessidade de considerar a interface materno-fetal como compartimentos imunológicos distintos. Essas descobertas apoiam a hipótese de uma complexa interação entre o soro materno e o microambiente do sangue do cordão umbilical que pode impactar o desenvolvimento fetal. Coletivamente, essas evidências sobre a comunicação materno-fetal são cruciais para subsidiar o aprimoramento da prática clínica e das políticas de saúde pública, visando o manejo da exposição pré-natal à infecção por SARS-CoV-2 e a proteção da saúde de mães e neonatos durante e após a pandemia.

**Palavras-chave:** 1. SARS-CoV-2 2. Infecção pré-natal 3. mediadores inflamatórios solúveis 4. Interação materno-fetal 5. Recém-nascido

## ABSTRACT

**Background:** The COVID-19 pandemic, caused by SARS-CoV-2, imposed major challenges to maternal–fetal health. Infections during pregnancy pose risks to the mother and may influence fetal development, as the maternal immune system undergoes significant changes throughout gestation. Although vertical transmission is rare, maternal infection can modify the fetal immune environment. Thus, analyzing soluble immune mediators in mothers and newborns is essential to understand the prenatal immune milieu and its impacts. However, the overall effect of SARS-CoV-2 on the maternal–fetal immune interface remains unclear, including whether the immune profile in umbilical cord blood mirrors that of maternal serum.

**Objectives:** To investigate the immunological interaction between mother and newborn following antenatal exposure to SARS-CoV-2, identifying distinct signatures of soluble mediators according to the phase of maternal infection. Specifically, we aimed to characterize profiles of chemokines, pro-inflammatory and regulatory cytokines, and growth factors in umbilical cord blood from exposed neonates (acute or convalescent) compared with healthy controls; compare these signatures between cord blood and maternal serum using fold-change analyses; identify key mediators and their dynamics of alteration and persistence in both compartments; and assess immunological network connectivity to explore cross-correlations between maternal serum and cord blood microenvironments following gestational SARS-CoV-2 infection.

**Methods:** A parallel analysis of chemokines, cytokines, and growth factors was performed in paired maternal serum and umbilical cord blood samples. Participants were divided into subgroups based on the timing of maternal COVID-19 infection: Acute (up to 14 days after symptom onset at delivery), and convalescent phases classified as Early (infection in the 3rd trimester), Intermediate (2nd trimester), and Late (1st trimester), in addition to a healthy control (HC) group. Comparative analyses between groups were conducted using Kruskal–Wallis followed by Dunn’s post-test, and paired comparisons were performed using Wilcoxon’s test. Integrative network analyses were also employed to explore connectivity and interplay among immune mediators in maternal and cord blood microenvironments.

**Results:** Umbilical cord blood samples from neonates of mothers with acute and convalescent COVID-19 showed increased levels of several immune mediators. CCL11, IFN- $\gamma$ , IL-1Ra, and G-CSF were elevated across most COVID-19 subgroups, with fold-change magnitudes ranging from 1.6 $\times$  to 8.2 $\times$  compared with healthy controls. Paired mother–newborn comparisons demonstrated that mediators such as CCL11, Notably, CCL4, IFN- $\gamma$ , PDGF, and G-CSF exhibited significantly greater increases in

umbilical cord blood than in maternal serum, reaching up to 15.7×, particularly during the convalescent phase. Soluble mediator signatures revealed distinct profiles for cord blood and maternal serum: while maternal serum showed a progressive decline in mediators, cord blood displayed an expanding set of molecules from the acute to late convalescent phase. Integrative network analysis demonstrated increased connectivity and interaction among immune mediators in both microenvironments, progressing from acute infection to late convalescence.

**Conclusion:** Our findings provide strong evidence that the immune profile of umbilical cord blood does not passively reflect maternal serum but instead presents distinct and dynamic immunological signatures in response to prenatal SARS-CoV-2 exposure. The persistent elevation of mediators such as CCL11, IFN- $\gamma$ , IL-1Ra, and G-CSF in cord blood, regardless of maternal infection stage, suggests an in utero priming effect that may modulate long-term neonatal immunity. Marked differences in mediators such as PDGF and G-CSF between maternal serum and cord blood—particularly during convalescence—highlight the importance of considering the maternal–fetal interface as distinct immunological compartments. These findings support the hypothesis of a complex interplay between maternal serum and the cord blood microenvironment that may influence fetal development. Collectively, these insights into maternal–fetal immunological communication are critical for informing clinical practice and public health policies aimed at managing prenatal exposure to SARS-CoV-2 and protecting maternal and neonatal health during and after the pandemic.

**Keywords:** 1. SARS-CoV-2 2. Prenatal infection 3. Soluble immune mediators 4. Maternal-fetal interaction 5. Newborn

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1 - Compêndio da população e métodos do estudo. 29
- Figura 2 - mediadores inflamatórios solúveis no sangue do cordão umbilical de neonatos nascidos de mães com COVID-19 aguda ou convalescente. 33
- Figura 3 - Fold change de mediadores inflamatórios solúveis no sangue do cordão umbilical de neonatos nascidos de mães com COVID-19 aguda ou convalescente em relação aos controles saudáveis. 35
- Figura 4 - Perfis de mediadores inflamatórios solúveis de amostras pareadas de sangue do cordão umbilical e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente. 37
- Figura 5 - Fold change dos mediadores inflamatórios solúveis no sangue do cordão umbilical dividido pelos valores medianos observados nas amostras de soro pareadas de mães com COVID-19 aguda ou convalescente. 39
- Figura 6 - Assinaturas de mediadores inflamatórios solúveis de amostras pareadas de sangue do cordão umbilical de neonatos e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente. 41
- Figura 7 - Análise descritiva das assinaturas ascendentes de mediadores inflamatórios solúveis de amostras pareadas de sangue do cordão umbilical e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente. 42
- Figura 8 - Redes integrativas de mediadores inflamatórios solúveis em amostras pareadas de sangue do cordão umbilical de neonatos e de soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente. 44
- Figura 9 - Resumo das alterações nos mediadores inflamatórios solúveis em amostras pareadas de sangue do cordão umbilical e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente 46

## ABREVIATURAS E SIGLAS

- CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
- CCL11 - Ligante 11 de Quimiocina
- CCL2 - Ligante 2 de Quimiocina
- CCL3 - Ligante 3 de Quimiocina
- CCL4 - Ligante 4 de Quimiocina
- CCL5 - Ligante 5 de Quimiocina
- CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Brasil
- COVID-19 - doença do coronavírus 19
- CS - Controles Saudáveis
- CXCL10 - quimiocina 10
- CXCL8 - quimiocina 8
- ECA-2 - Enzima Conversora de Angiotensina II
- FGF-básico - Fator básico do crescimento de fibroblastos
- FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
- G-CSF - Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos
- GM-CSF - Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
- HC - Healthy controls
- HRAN - Hospital Regional da Asa Norte
- HUB - Hospital Universitário de Brasília
- IFN- $\gamma$  - Interferon- $\gamma$
- IL-10 - Interleucina-10
- IL-12 - Interleucina-12
- IL-13 - Interleucina-13
- IL-15 - Interleucina-15
- IL-17 - Interleucina-17
- IL-1 $\beta$  - Interleucina-1 $\beta$
- IL-1Ra - Interleucina-1Ra
- IL-2 - Interleucina-2
- IL-4 - Interleucina-4
- IL-5 - Interleucina-5
- IL-6 - interleucina-6
- IL-7 - Interleucina-7
- IL-9 - Interleucina-9
- JCR - Journal Citation Reports
- MERS-CoV - Síndrome Respiratória do Oriente Médio por Coronavírus
- NASEM - National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
- PROUDEST - Pregnancy Outcome and Child Development – Effects of SARS-CoV-2 Infection Trial
- qRT-PCR - reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
- REBEC - Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos
- RT-PCR - Real Time – Polimerase Chain Reaction
- SARS-CoV - Síndrome Respiratória Aguda Grave por Coronavírus

- SARS-CoV-2 - Síndrome Respiratória Aguda Grave por Coronavírus 2
- SDRA - síndrome do desconforto respiratório agudo
- TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$
- VEGF - fator de crescimento endotelial vascular
- VOCs - variantes de preocupação

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 COVID-19: Origem, patogênese e aspectos evolutivos ao longo do tempo.....	16
1.2 A exposição ao SARS-CoV-2 durante a gestação.....	19
1.3 Os Mediadores Inflamatórios na Interface Materno-Fetal.....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1. Objetivo primário</b> .....	<b>23</b>
2.2. Objetivos secundários.....	23
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1 Aspectos Gerais</b> .....	<b>24</b>
3.2 População do estudo.....	25
Figura 1 - Compêndio da população e métodos do estudo.....	27
3.3 Amostras biológicas.....	27
3.4 Processamento e armazenamento de soro e sangue do cordão umbilical.....	27
3.5 Quantificação de mediadores inflamatórios solúveis.....	28
3.6 Análise estatística.....	28
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
4.1 mediadores inflamatórios solúveis no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.....	31
Figura 2 - mediadores inflamatórios solúveis no sangue do cordão umbilical de neonatos nascidos de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.....	31
4.2 <i>Fold change</i> de mediadores inflamatórios solúveis no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos de mães com COVID-19 aguda ou convalescente em relação aos controles saudáveis.....	32
Figura 3 - <i>Fold change</i> de mediadores inflamatórios solúveis no sangue do cordão umbilical de neonatos nascidos de mães com COVID-19 aguda ou convalescente em relação aos controles saudáveis.....	33
4.3 Perfis de mediadores inflamatórios solúveis de amostras pareadas de sangue do cordão umbilical e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.....	34
Figura 4 - Perfil dos mediadores inflamatórios solúveis em amostras pareadas de sangue de cordão umbilical e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.....	35
Figura 5 - <i>Fold change</i> dos mediadores inflamatórios solúveis no sangue de cordão umbilical dividido pelos valores medianos observados nas amostras pareadas de soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.....	37
4.4 Assinaturas de mediadores inflamatórios solúveis de amostras pareadas de sangue do cordão umbilical de neonatos e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.....	38
Figura 6 - Assinaturas de mediadores inflamatórios solúveis de amostras pareadas de sangue do cordão umbilical de neonatos e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.....	39
Figura 7 - Análise descritiva das assinaturas ascendentes de mediadores inflamatórios solúveis de amostras pareadas de sangue do cordão umbilical e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.....	41
4.5 Redes integrativas de mediadores inflamatórios solúveis em amostras pareadas de sangue do cordão umbilical de recém-nascidos e soro de mães com	

COVID-19 aguda ou convalescente.....	42
Figura 8 - Redes integrativas de mediadores inflamatórios solúveis em amostras pareadas de sangue do cordão umbilical de neonatos e de soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.....	42
4.6 Resumo das alterações nos mediadores inflamatórios solúveis em amostras pareadas de sangue do cordão umbilical e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.....	44
Figura 9 - Resumo das alterações dos mediadores inflamatórios solúveis em amostras pareadas de sangue do cordão umbilical e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.....	44
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>64</b>
ANEXO 1 – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa.....	64
ANEXO 2 - Outras publicações relacionadas ao Estudo PROUDEST (em parceria com outros autores).....	69
<b>9. APÊNDICES.....</b>	<b>71</b>
APÊNDICE 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	71
APÊNDICE 2 – Planilha de Dados do Estudo.....	72
APÊNDICE 3 – Planilha de coleta de dados de seguimento de consultas.....	73
APÊNDICE 4 - Artigo com dados originais dos mediadores inflamatórios em gestantes – pré requisito para a defesa do doutorado.....	74

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 COVID-19: Origem, patogênese e aspectos evolutivos ao longo do tempo

Em março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) elevou a infecção causada pelo novo coronavírus, SARS-CoV-2 (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2), oficialmente denominada COVID-19 (doença do coronavírus 19), à condição de pandemia. Desde a emergência dos primeiros casos na China ao final de 2019, a comunidade científica empreendeu esforços significativos para elucidar a história natural e a evolução da doença sob múltiplas perspectivas. Contudo, diversas lacunas no conhecimento persistem (1). Globalmente, a COVID-19 acumulou mais de 778 milhões de casos confirmados, dos quais mais de 7 milhões resultaram em óbito (2).

Os coronavírus são caracterizados por serem vírus envelopados, possuindo um genoma de RNA de fita simples com aproximadamente 30.000 pares de bases. O SARS-CoV-2 é classificado no gênero *Betacoronavirus*, que também abrange o SARS-CoV (vírus da síndrome respiratória aguda grave) e o MERS-CoV (vírus da síndrome respiratória do Oriente Médio), e tem alto potencial de infecção nos humanos (3, 4).

Embora compartilhem classificações, SARS-CoV-2, SARS-CoV e MERS-CoV exibem distinções notáveis. O SARS-CoV-2 e o SARS-CoV demonstram uma coincidência genômica de 79%, enquanto a similaridade entre SARS-CoV-2 e MERS-CoV é de 50%. Clinicamente, a infecção por SARS-CoV-2 se destaca por ser mais contagioso e, em geral, de menor gravidade quando comparada às infecções causadas por SARS-CoV e MERS-CoV (5).

As origens de SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 são reconhecidas como zoonóticas. A gênese de SARS-CoV e MERS-CoV ocorreu em morcegos, propagando-se para humanos via hospedeiros intermediários, como o civeta-de-palmeira asiática (*Paradoxurus hermaphroditus*) e camelos, respectivamente. Em contraste, o mecanismo de transmissão animal-humano do SARS-CoV-2 ainda não foi completamente elucidado (6).

A detecção direta do SARS-CoV-2 é primariamente realizada por meio de dois métodos diagnósticos principais, ambos utilizando material biológico coletado por

swab nasofaríngeo. São eles: o teste de amplificação de ácido nucleico, cujo principal representante é o RT-PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction), e o teste de antígeno, que consiste em imunoenaios capazes de identificar proteínas virais específicas (7, 8).

A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre principalmente por meio de gotículas respiratórias no ar, contato direto e secreções. Há também evidências de transmissão fecal-oral. A disseminação pode ocorrer tanto por indivíduos sintomáticos quanto assintomáticos. O espectro clínico da COVID-19 é vasto, variando desde infecções completamente assintomáticas até quadros graves que podem culminar em óbito. As manifestações iniciais mais prevalentes incluem febre, tosse e dispneia. Sintomas adicionais frequentemente observados englobam fadiga, mialgia, náuseas, vômitos, diarreia, cefaleia, astenia, rinorreia, anosmia e ageusia. Progressivamente, este quadro clínico pode evoluir para complicações severas como pneumonia, síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), disfunções hepáticas e cardíacas, eventos trombóticos e manifestações neurológicas (9-11).

A principal alteração patológica observada em pacientes com COVID-19 é o edema pulmonar, frequentemente seguido por lesão alveolar difusa caracterizada pela formação de membranas hialinas. Microscopicamente, os alvéolos exibem hiperplasia de pneumócitos tipo II, além da presença de macrófagos, monócitos e mediadores inflamatórios provenientes de células mononucleares intersticiais (12).

A patogênese da COVID-19 é intrínseca e tem sido consistentemente relacionada a uma resposta imune disfuncional (13, 14). A falha em estabelecer uma estratégia imune eficaz é multifatorial, abrangendo: i) a inibição da resposta antiviral precoce mediada por interferons tipo I nas células hospedeiras; ii) a alteração da função de apresentação de antígenos; e iii) um fenótipo de macrófagos alterados, frequentemente observado em indivíduos com obesidade, diabetes, idosos e portadores de doenças inflamatórias crônicas. Tais condições favorecem a persistência viral e o dano tecidual prolongado, concomitante ao recrutamento de células mieloides inflamatórias prejudiciais ao sítio da infecção. O incremento da mielopoiese e o dano vascular exacerbam a liberação dessas células mieloides inflamatórias da medula óssea para a circulação, e seu subsequente recrutamento para o local da infecção resulta em dano tecidual extenso, lesões vasculares e formação de trombos. Este cenário é particularmente comum em pacientes com doença grave (15).

Após a infecção das células epiteliais respiratórias, o SARS-CoV-2 induz uma resposta imune que culmina na liberação desregulada de citocinas inflamatórias. A intensa secreção de citocinas pelo sistema imunológico, em resposta à infecção viral e/ou infecções secundárias, é sucedida pela infiltração de macrófagos e neutrófilos no parênquima pulmonar, caracterizando o fenômeno da "tempestade de citocinas". O vírus é capaz de ativar linfócitos T auxiliares patogênicos (células Th1) para secretar citocinas pró-inflamatórias, como o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e a interleucina-6 (IL-6). Por sua vez, o GM-CSF estimula monócitos patogênicos a liberar adicionalmente IL-6, fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e outras citocinas (16). Na COVID-19, a tempestade de citocinas é primariamente marcada por elevadas concentrações de IL-6 e TNF- $\alpha$  (17). Nestes cenários, a inflamação descontrolada acarreta danos orgânicos múltiplos, precipitando a disfunção, especialmente dos sistemas cardíaco, hepático e renal (18-20).

Para as cepas iniciais do SARS-CoV-2, o período médio de incubação era de aproximadamente 4 a 5 dias antes do surgimento dos sintomas. O pico da carga viral do SARS-CoV-2 era tipicamente alcançado entre 5 e 6 dias após o início dos sintomas. Em média, casos graves de COVID-19 evoluíam para a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) em torno de 8 a 9 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas. É importante notar que este processo pode apresentar variações dependendo da variante viral envolvida (21).

Com a contínua evolução viral e o surgimento de novas variantes, surgiram preocupações acerca de um potencial aumento da patogenicidade, especialmente devido à capacidade dessas variantes de escapar a imunidade conferida por infecção prévia ou vacinação. A identificação exaustiva de todas as mutações do SARS-CoV-2 e suas correlações com alterações patológicas é uma tarefa complexa, em parte devido à grande proporção de pacientes assintomáticos. Contudo, dados substanciais já foram estabelecidos para mutações específicas. Conforme previamente discutido, a proteína S do SARS-CoV-2, em maior proporção nas novas variantes, interage com o receptor ECA-2 para mediar a entrada viral na célula hospedeira. As substituições de aminoácidos observadas na proteína S das novas variantes estão diretamente ligadas à sua habilidade de invadir as células hospedeiras (22).

As variantes de preocupação (VOCs) do SARS-CoV-2, incluindo Alfa, Beta, Gama, Delta e Ômicron, são caracterizadas por mutações notáveis que impactam sua transmissibilidade, virulência e capacidade de escape imune. A variante Alfa (Reino Unido) demonstrou maior transmissibilidade e gravidade. A Beta (África do Sul)

apresentou extensas mutações na proteína S e rápida predominância. A Gama (Brasil), com 17 substituições, exibiu escape imune e transmissibilidade duas vezes maior. A Delta (Índia) foi a mais transmissível, superando as anteriores em pelo menos 40%, com maior gravidade e mortalidade. Por fim, a Ômicron (África do Sul) é marcada por mais de 30 mutações na proteína S, grande capacidade de evasão imune e maior risco de reinfecção, embora estudos preliminares sugiram uma doença mais branda (22-29).

O conhecimento sobre as consequências da infecção pelo SARS-CoV-2 e da síndrome clínica multissistêmica da COVID-19 encontra-se em contínua evolução, impulsionado por estudos clínicos emergentes.

## **1.2 A exposição ao SARS-CoV-2 durante a gestação**

Estudos sobre exposição gestacional ao SARS-CoV-2 relatam riscos aumentados de prematuridade e restrição de crescimento intrauterino, bem como maior necessidade de admissão em unidade de terapia intensiva neonatal (30-35). O risco de parto prematuro é consistente em diferentes populações e ocorre mesmo em casos de infecção materna leve, sendo mediado principalmente por processos inflamatórios e alterações placentárias (32, 33).

Os desfechos clínicos e relativos ao neurodesenvolvimento das crianças expostas intra útero à infecção materna por COVID-19 apresentam resultados heterogêneos, mas há evidências de maior risco de atraso no desenvolvimento neuropsicomotor em comparação a controles não expostos, especialmente em casos de infecção materna grave ou próxima ao parto (36). Estudo do nosso grupo de pesquisa, que avaliou as crianças através das escalas Bayley-III, revelou atraso de desenvolvimento aos 6 e 12 meses de idade, particularmente no domínio da linguagem (37). Tais impactos no desenvolvimento infantil não podem ser caracterizados como sintomas persistentes compatíveis com COVID longa no período pós-natal (38-41). O conceito de COVID longa exige sintomas persistentes por pelo menos três meses após a infecção, o que raramente é documentado em lactentes pequenos, seja por limitação metodológica ou pela ausência de sintomas específicos observáveis nessa faixa etária (42). Adicionalmente, complicações vasculares decorrentes da inflamação sistêmica e da disfunção do sistema de coagulação podem

umentar significativamente o risco de doenças cerebrovasculares, meningoencefalite e encefalopatia hipóxico-isquêmica, particularmente em adultos (43).

A possibilidade de distúrbios no neurodesenvolvimento em crianças expostas intra útero ao SARS-CoV-2 levanta uma preocupação significativa. Dada a vasta quantidade de indivíduos expostos, mesmo um pequeno aumento no risco de desenvolvimento neuropsicomotor adverso resultaria em um impacto considerável em termos de saúde pública (44-50). De acordo com estimativas, mais de 59 milhões de pessoas nos Estados Unidos e 300 milhões globalmente foram diagnosticadas com COVID-19, incluindo mais de 155.500 mulheres grávidas nos Estados Unidos (50). Considerando aproximadamente 140 milhões de nascimentos vivos anualmente em todo o mundo e uma prevalência de positividade para o SARS-CoV-2 em mulheres grávidas atingindo até 15% em grandes centros urbanos (51), o número de crianças expostas à infecção materna por COVID-19 *in utero* poderia alcançar até 20 milhões por ano, especialmente em virtude da baixa adesão inicial à vacinação contra a COVID-19 entre as gestantes (52, 53).

Estudos de acompanhamento, incluindo um monitoramento de 12 meses de mais de 7.000 partos em um grande sistema hospitalar, onde mais de 200 gestações foram expostas à COVID-19, indicam que a infecção pré-natal pelo SARS-CoV-2 está associada a um aumento no risco de diagnósticos de distúrbios do neurodesenvolvimento na prole (54). Existem várias vias potenciais pelas quais a infecção materna pelo SARS-CoV-2 pode impactar o cérebro fetal em desenvolvimento (54-57):

- i) Ativação imune materna: Durante janelas neurodesenvolvimentais críticas na gestação, a ativação do sistema imunológico da mãe pode ocasionar efeitos adversos no desenvolvimento neurológico do feto.
- ii) Infecção fetal direta: A transmissão transplacentária do vírus pode resultar na infecção direta dos tecidos neurológicos fetais.
- iii) Comprometimento da função placentária: A disfunção placentária pode acarretar desfechos adversos na gravidez, como restrição de crescimento fetal, descolamento ou hematoma retroplacentário e parto prematuro, todos associados a um maior risco de lesões neurológicas.

Essas possíveis vias sublinham a complexidade das interações entre a infecção materna por SARS-CoV-2 e o desenvolvimento fetal, reforçando, assim, a

imperatividade de vigilância contínua e pesquisas aprofundadas para compreender integralmente os riscos e mecanismos envolvidos. O impacto potencial em saúde pública é significativo, dado o número expressivo de crianças potencialmente afetadas globalmente.

### **1.3 Os Mediadores Inflamatórios na Interface Materno-Fetal**

A infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez acarreta riscos aumentados de resultados maternos e neonatais adversos (32). Embora a frequência da transmissão vertical do SARS-CoV-2 ainda seja debatível, estudos anteriores forneceram evidências de que a infecção viral durante a gravidez leva a vários efeitos intra uterinos e fetais da transferência transplacentária de mediadores inflamatórios solúveis, incluindo anticorpos específicos para vírus e citocinas, em resposta a infecções maternas, incluindo SARS-CoV-2 (58-61).

Infecções durante a gravidez não apenas representam um risco para a saúde materna, mas também têm implicações potenciais para o desenvolvimento fetal (62-64). A transição do sistema imunológico materno durante a gravidez, de um estado pró-inflamatório no início da gestação para um perfil anti-inflamatório em estágios intermediários e tardios da gravidez, pode contribuir para uma maior vulnerabilidade a infecções (65, 66). A interação dinâmica entre as respostas imunológicas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que ocorrem em distintas fases gestacionais é crucial para salvaguardar a saúde materna e garantir uma gestação bem-sucedida (67). O estudo dos perfis de mediadores inflamatórios em contextos materno e neonatal tem ganhado atenção significativa devido às suas implicações para a compreensão do ambiente imunológico pré-natal e dos resultados fetais provocados pela interação imunológica materno-fetal (68). As alterações imunológicas durante a gravidez têm implicações significativas para as redes de mediadores solúveis na interface materno-fetal, orquestrando o desenvolvimento fetal e a saúde do recém-nascido (69).

O impacto abrangente da infecção pelo SARS-CoV-2 na interface imunológica materno-fetal ainda é pouco compreendido, e por potencialmente atingir o crescimento e desenvolvimento das crianças, é crucial obtermos respostas mais claras. Nessa linha, o presente estudo teve como objetivo investigar as alterações dos mediadores inflamatórios solúveis em mães com COVID-19 aguda ou convalescente e seu impacto

no microambiente imunológico do sangue do cordão umbilical. Nossos achados forneceram evidências sobre a *crosstalk* materno-fetal que pode, em última análise, subsidiar a melhoria da prática clínica e das políticas de saúde pública para o manejo da exposição pré-natal à infecção por SARS-CoV-2.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo primário

Investigar a interação imunológica e as assinaturas distintas de mediadores inflamatórios solúveis na díade mãe-recém-nascido, em resposta à exposição antenatal ao SARS-CoV-2, em diferentes fases da infecção materna.

### 2.2. Objetivos secundários

- i. Caracterizar o perfil de mediadores inflamatórios no momento do parto: Avaliar os níveis de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento em amostras de soro materno e sangue do cordão umbilical de recém-nascidos de mães com COVID-19 aguda ou convalescente, em comparação com controles saudáveis.
- ii. Comparar as assinaturas imunológicas: Determinar se o perfil de mediadores inflamatórios solúveis observado no sangue do cordão umbilical se assemelha ou difere do padrão identificado nas amostras de soro materno, quantificando as magnitudes de *fold change*.
- iii. Identificar mediadores-chave e suas dinâmicas: Reconhecer os mediadores inflamatórios solúveis que exibem as maiores alterações e persistência nos compartimentos materno e neonatal, ao longo das distintas fases gestacionais da infecção por SARS-CoV-2.
- iv. Analisar a conectividade das redes imunológicas: Construir e analisar redes integrativas de mediadores inflamatórios para compreender a conectividade de vizinhança e a correlação cruzada entre os microambientes do soro materno e do sangue do cordão umbilical em resposta à infecção por SARS-CoV-2.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Aspectos Gerais

Este estudo faz parte de uma investigação observacional prospectiva maior, denominada Projeto PROUDEST (*Pregnancy Outcome and Child Development – Effects of SARS-CoV-2 Infection Trial*) (70), realizada entre julho de 2020 e dezembro de 2021 no Distrito Federal, Brasil, durante a circulação das variantes B.1.1.28 e B.1.1.33 do SARS-COV-2. Além deste estudo, o PROUDEST engloba:

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

O protocolo do estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, e pelo Comitê de Ética Nacional - CONEP (CAAE 32359620.0.0000.5558) e registrado na Plataforma Brasileira de Ensaio Clínicos – REBEC (<https://ensaiosclinicos.gov.br>). O estudo seguiu os princípios éticos estabelecidos pela Declaração de Helsinki para pesquisas envolvendo seres humanos.

No presente estudo foram analisados, no momento do parto, os mediadores inflamatórios solúveis pareados do sangue das mães infectadas pelo SARS-CoV-2 na gestação e dos bebês através do sangue de cordão umbilical. As mães foram divididas em grupos de acordo com o momento da infecção durante a gestação. Estes

resultados foram comparados com dados de gestantes saudáveis em todos os trimestres gestacionais, cujo material biológico foi colhido no período pré-pandêmico armazenados no biorrepositório mantido no Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Minas), na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais (99).

### 3.2 População do estudo

Um total de 149 parturientes foram convidadas a participar deste estudo transversal, por amostragem de conveniência não probabilística de dois Centros de Referência Pública para COVID-19 (Hospital Universitário de Brasília - HUB e Hospital Regional da Asa Norte - HRAN, Brasília, DF, Brasil). O HRAN foi caracterizado pela Secretaria de Estado da Saúde do DF no início da pandemia como o hospital de referência para gestantes com COVID-19 e o HUB corresponde ao campo de atuação dos profissionais envolvidos no Estudo PROUDEST. As gestantes com diagnóstico de COVID-19, inicialmente acompanhadas no Setor de Ginecologia e Obstetrícia do HUB foram encaminhadas para continuar o seguimento no HRAN, uma vez que o HUB ficou caracterizado como serviço de suporte às gestantes sem COVID-19.

Todas as parturientes, doravante denominadas “mães”, forneceram consentimento informado por escrito antes da inclusão no estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), apresentado no Apêndice 1.

A população do estudo compreendeu amostras pareadas de sangue periférico materno (n=149) e sangue do cordão umbilical de seus descendentes (n=149), coletadas no parto. A população do estudo foi categorizada em cinco grupos, com base no status da mãe para COVID-19, referidos como:

- i) “Agudo” / “*Acute*” (n=18) – infecção aguda por SARS-CoV-2 (até 14 dias do início dos sintomas no parto);
- ii) “Inicial” / “*Early*” (n=24) – infecção convalescente por SARS-CoV-2 adquirida no terceiro trimestre de gravidez (28 a 41 semanas);
- iii) “Intermediário” / “*Intermediate*” (n=50) – infecção convalescente por SARS-CoV-2 adquirida no segundo trimestre de gravidez (14 a 27 semanas);

iv) “Tardio” / “*Late*” (n=39) – infecção convalescente por SARS-CoV-2 adquirida no primeiro trimestre de gravidez (4 a 13 semanas) e

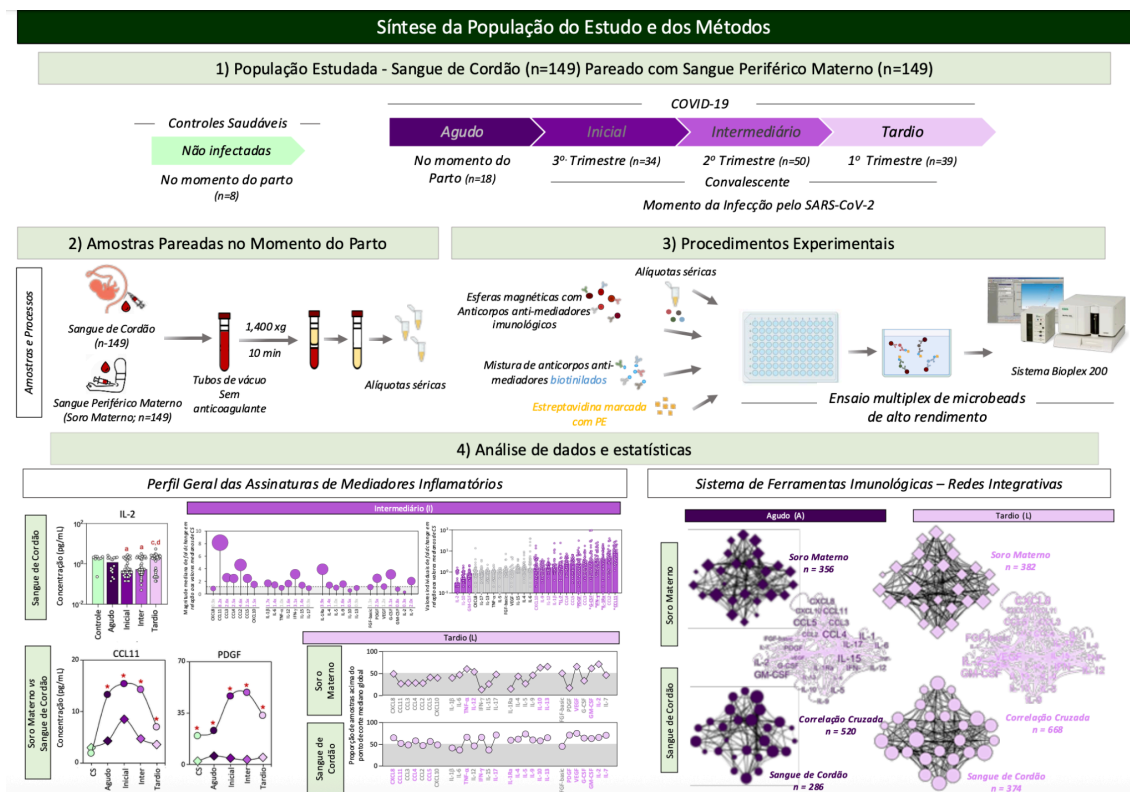
v) “Controles Saudáveis” (CS) / “HC” ou “*Healthy controls*” (n=8) - grupo controle de referência compreendendo indivíduos saudáveis não infectados sem histórico clínico de COVID-19, com sorologia negativa para infecção por SARS-CoV-2 no parto e sem diagnóstico posterior confirmado até 30 dias após o parto.

A introdução das primeiras vacinas contra a COVID-19, ocorrida concomitantemente à seleção das participantes do estudo, representou um potencial fator de confusão para a nossa análise imunológica, especialmente no grupo de gestantes imunizadas. Portanto foram excluídas do estudo as mães vacinadas para COVID-19 antes ou durante a gravidez. Também foram excluídas do estudo mães com diagnóstico confirmado de toxoplasmose, sífilis, rubéola, herpes, doença de Chagas, citomegalovírus, vírus Zika ou vírus da imunodeficiência humana durante a gravidez, bem como fumantes e usuárias de álcool/drogas ilícitas.

O diagnóstico de COVID-19 pelas gestantes foi baseado em pelo menos um dos seguintes critérios: (a) sorologia positiva para IgM ou IgG Anti-SARS-CoV-2 por teste rápido (Biomanguinhos, FIOCRUZ, Brasil); (b) reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qRT-PCR) positiva para SARS-CoV-2 em amostras de *swab* nasofaríngeo ou (c) sintomas clínicos sugestivos de COVID-19 e uma tomografia computadorizada de tórax compatível com COVID-19.

Um compêndio da população e métodos do estudo é apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Compêndio da população e métodos do estudo.



### 3.3 Amostras biológicas

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

### 3.4 Processamento e armazenamento de soro e sangue do cordão umbilical

Amostras de sangue periférico de um total de 149 mães foram coletadas por venopunção, no parto, usando tubos a vácuo sem anticoagulante (CS, n=8; Agudo,

n=18; Inicial, n=34; Intermediário, n=50 e Tardio, n=39). Um total de 149 amostras pareadas de sangue venoso do cordão umbilical de recém-nascidos (5 mL) foram coletadas da parte placentária, imediatamente após o clampeamento, usando tubos a vácuo sem anticoagulante. As amostras de sangue periférico materno e de sangue do cordão umbilical foram submetidas a centrifugação a 1.400 x g, por 10 min, 4°C, dentro de 6 h após a coleta, alíquotadas e armazenadas a -80°C até o processamento para quantificação de mediadores inflamatórios solúveis.

### **3.5 Quantificação de mediadores inflamatórios solúveis**

Os níveis de mediadores inflamatórios solúveis foram quantificados em amostras de sangue do cordão umbilical e soro materno por ensaio multiplex de microbeads de alto rendimento (Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, no laboratório da FIOCRUZ-Minas em Belo Horizonte (MG). As concentrações de quimiocinas (CXCL8; CCL11; CCL3; CCL4; CCL2; CCL5; CXCL10), pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ ; IL-6; TNF- $\alpha$ ; IL-12; IFN- $\gamma$ ; 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 medidas em lotes paralelos realizados por um técnico treinado usando um Sistema Bio-Plex 200 (Hercules, CA, EUA) na instalação de citometria de fluxo da FIOCRUZ-Minas. As concentrações finais de mediadores inflamatórios solúveis do sangue do cordão umbilical e do soro materno foram expressas em pg/mL, de acordo com uma regressão de ajuste de curva logística de 5 parâmetros de curvas padrão.

### **3.6 Análise estatística**

Estatísticas descritivas foram realizadas usando o 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 múltipla entre os Controles Saudáveis e os subgrupos de COVID-19 (Agudo, Inicial, Intermediário e Tardio) foi realizada por Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. A análise estatística entre amostras pareadas de sangue do cordão umbilical e soro materno foi realizada pelo teste de Wilcoxon. Em todos os casos, a significância estatística foi considerada em  $p < 0,05$ .

A análise da magnitude do *fold change* em mediadores inflamatórios solúveis foi avaliada como a razão entre as concentrações de soro e sangue do cordão umbilical em subgrupos de COVID-19 dividida pelos níveis medianos observados em controles saudáveis. Adicionalmente, a magnitude do *fold change* em mediadores inflamatórios solúveis foi calculada como a razão das concentrações de sangue do cordão umbilical divididas pelos valores medianos observados no soro materno. *Fold changes*  $\leq 0,8x$  e  $\geq 1,5x$  foram incluídos no conjunto de parâmetros considerados para a análise do diagrama de Venn (disponível em <https://bioinformatics.psb.ugent.be>) para identificar atributos comuns e seletivos entre os subgrupos.

As assinaturas de mediadores inflamatórios solúveis foram adicionalmente avaliadas para quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento do sangue do cordão umbilical e soro materno. Para este propósito, os dados originais de mediadores solúveis, de amostras de sangue do cordão umbilical e soro materno, expressos como variáveis contínuas (pg/mL) foram convertidos em dados categóricos apresentados como proporção (%) de indivíduos com níveis acima dos valores de corte definidos como a concentração mediana global de cada mediador solúvel (CXCL8 =3,1; CCL11=6,9; CCL3=0,8; CCL4=5,4; CCL2=10,2; CCL5=244,5; CXCL10=43,3; IL-1 $\beta$ =0,2; IL-6=0,6; TNF- $\alpha$ =4,0; IL-12=0,3; IFN- $\gamma$ =1,5; IL-15=31,8; IL-17=1,5; IL-1Ra=98,4; IL-4=0,2; IL-5=8,3; IL-9=2,8; IL-10=2,2; IL-13=0,6; FGF-básico=1,7; PDGF=12,2; VEGF=8,0; G-CSF=4,1; GM-CSF=0,4; IL-2=0,8 e IL-7=2,5 pg/mL). As assinaturas de mediadores inflamatórios solúveis do sangue do cordão umbilical e do soro materno foram analisadas considerando o percentil 50 como uma zona cinzenta para identificar o conjunto de mediadores inflamatórios com níveis aumentados em cada grupo de estudo, posteriormente montados como perfis de assinatura ascendente.

Redes integrativas de mediadores inflamatórios do sangue do cordão umbilical e soro materno foram construídas com base na análise de correlação de Spearman. A correlação cruzada entre mediadores inflamatórios dos compartimentos do sangue do cordão umbilical e soro materno foi avaliada usando os testes de classificação de Spearman. Correlações significativas ( $p < 0,05$ ) foram empregadas para construir redes de clusters (quimiocinas; citocinas pró-inflamatórias; citocinas reguladoras e fatores de crescimento) usando o software Cytoscape de código aberto (disponível em <https://cytoscape.org>). A análise comparativa entre subgrupos foi realizada considerando o número de correlações observadas para cada cluster de mediadores solúveis e o número total de correlações computadas para cada subgrupo.

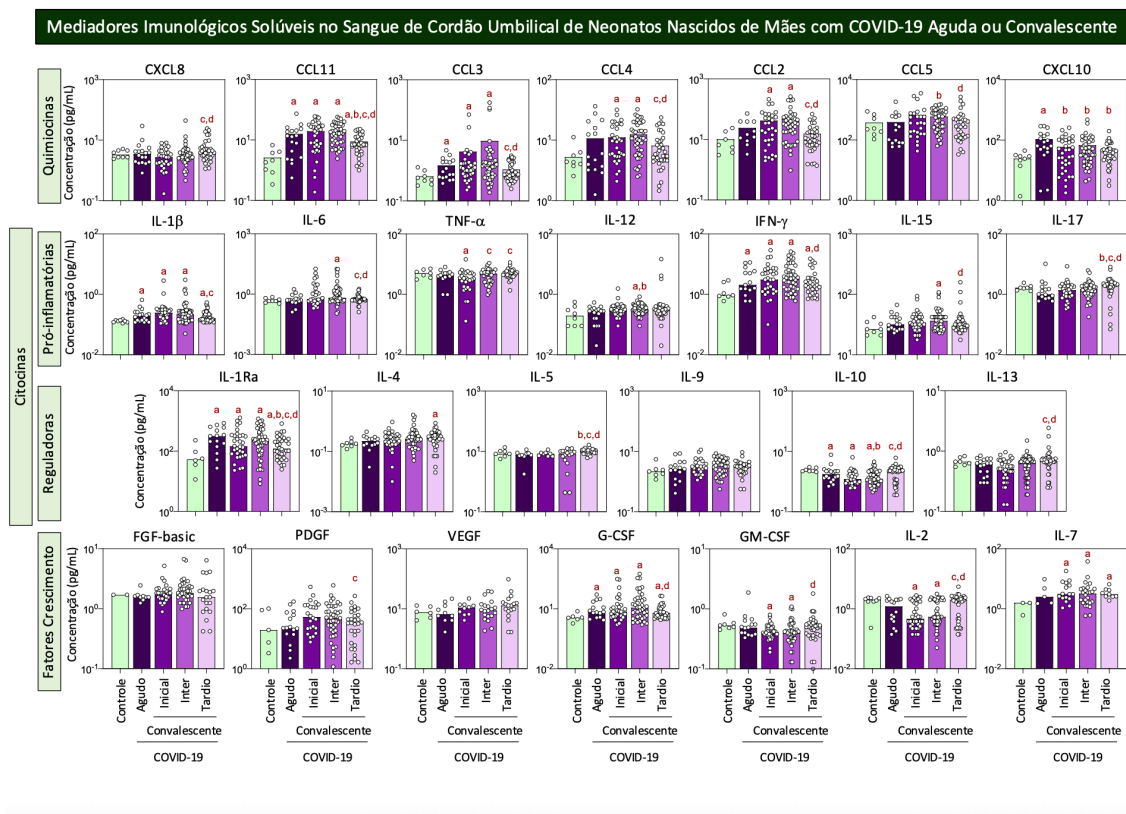
Análises adicionais de mediadores inflamatórios solúveis foram realizadas para comparar e resumir as principais alterações observadas nos compartimentos do sangue do cordão umbilical e soro materno. Para este propósito, a normalização de escores Z ( $Z\text{-scores} = (\text{valor original} - \bar{x}) / \text{SD}$ ) foi aplicada para construir mapas de cores. O número de mediadores solúveis com escore  $Z \geq 4$  em cada compartimento foi identificado e subsidiou a análise comparativa entre os grupos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Mediadores inflamatórios solúveis no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos de mães com COVID-19 aguda ou convalescente

Os níveis de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento foram medidos em amostras de sangue do cordão umbilical de recém-nascidos de mães com COVID-19 aguda ou convalescente e os resultados apresentados na Figura 2.

**Figura 2 - Mediadores inflamatórios solúveis no sangue do cordão umbilical de neonatos nascidos de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.**



Na Figura 2 são apresentados os mediadores inflamatórios solúveis no sangue do cordão umbilical de neonatos nascidos de mães com COVID-19 aguda ou convalescente. Os níveis de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento foram medidos em amostras de sangue do cordão umbilical coletadas de neonatos nascidos de mães com infecção aguda por SARS-CoV-2 (■, n=18) até 14 dias após o início dos sintomas, ou COVID-19

convalescente devido à infecção prévia por SARS-CoV-2, referidos como Inicial (■, n=34), Intermediário (■, n=50), ou Tardio (■, n=39), em comparação com Controles Saudáveis (CS= ■, n=8). Os níveis de mediadores inflamatórios solúveis foram quantificados por um ensaio multiplex de alto rendimento, conforme descrito em População, Materiais e Métodos. Os resultados são apresentados como distribuição de dispersão de amostras individuais sobre gráficos de barras mostrando os valores medianos da concentração no sangue do cordão umbilical (pg/mL). A análise comparativa múltipla foi realizada por Kruskal–Wallis seguida pelo pós-teste de Dunn. Em todos os casos, a significância foi considerada em  $p < 0,05$ . Diferenças significativas foram sublinhadas pelas letras “a”, “b”, “c”, “d” e “e” para comparações com os grupos Controle, Agudo, Inicial, Intermediário e Tardio, respectivamente.

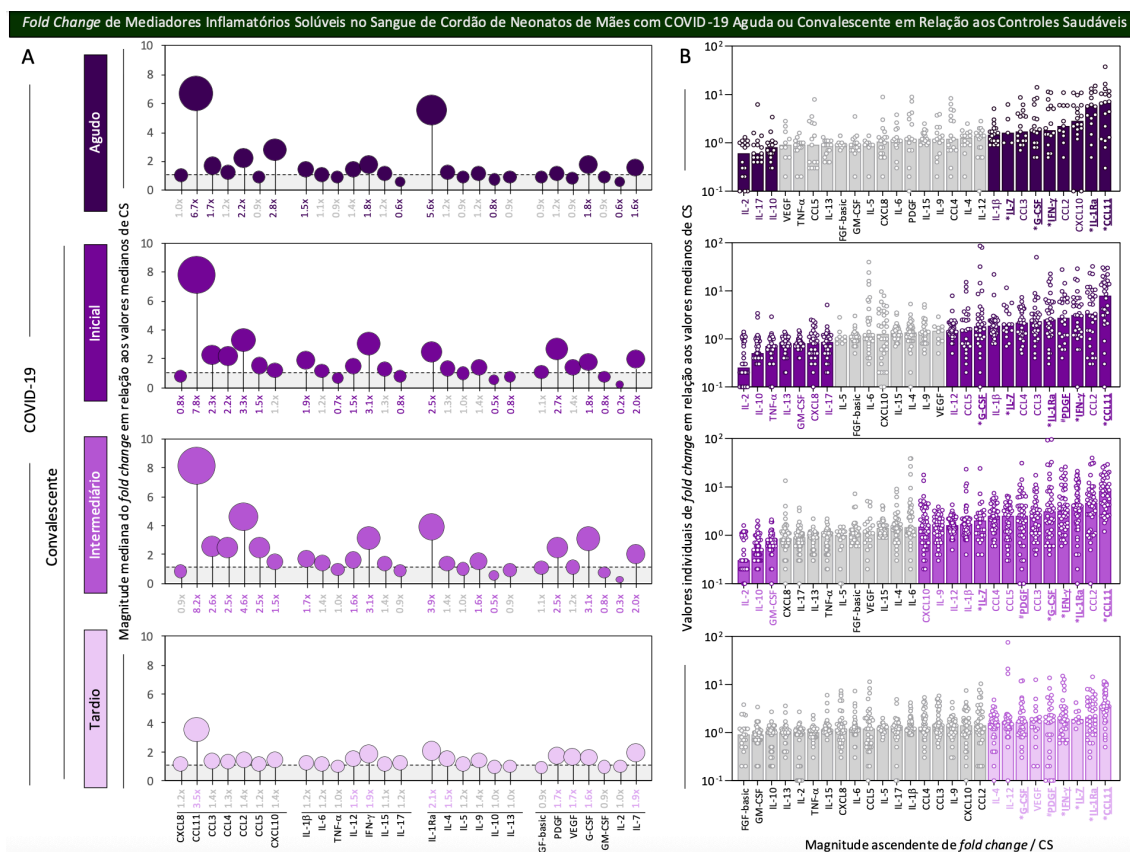
A análise dos dados demonstrou um aumento de CCL11, CCL3, CXCL10, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1Ra e G-CSF e uma diminuição de IL-10 em amostras de sangue do cordão umbilical de recém-nascidos de mães com infecção aguda por SARS-CoV-2 em comparação com os Controles Saudáveis (CS). A análise de amostras de sangue do cordão umbilical nas fases de COVID-19 convalescente Inicial e Intermediária mostrou níveis aumentados de CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL1-Ra, G-CSF e IL-7 e uma diminuição de IL-10 e IL-2 em comparação com os CS. Em geral, as amostras de sangue do cordão umbilical do subgrupo convalescente Tardio exibiram menos diferenças em comparação com os CS, compreendendo níveis mais altos de CCL11, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-7. No entanto, o subgrupo Tardio apresentou níveis distintos de vários mediadores inflamatórios em comparação com os subgrupos Inicial e/ou Intermediário, incluindo: níveis aumentados de CXCL8, TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-5, IL-10, IL-13, GM-CSF, juntamente com níveis reduzidos de CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-1Ra, PDGF, G-CSF e IL-2 (Figura 2).

#### **4.2 *Fold change* de mediadores inflamatórios solúveis no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos de mães com COVID-19 aguda ou convalescente em relação aos controles saudáveis**

Com o objetivo de caracterizar ainda mais o perfil de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento em amostras de sangue do cordão umbilical de recém-nascidos de mães com COVID-19 aguda ou convalescente, a ordem de magnitude dos *fold changes* nas concentrações de mediadores inflamatórios solúveis

foi calculada de acordo com os valores medianos dos CS. Os resultados são mostrados na Figura 3.

**Figura 3 - Fold change de mediadores inflamatórios solúveis no sangue do cordão umbilical de neonatos nascidos de mães com COVID-19 aguda ou convalescente em relação aos controles saudáveis.**



Na Figura 3, os níveis de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento foram medidos em amostras de sangue do cordão umbilical coletadas de neonatos nascidos de mães com infecção aguda por SARS-CoV-2 (●, n=18) até 14 dias após o início dos sintomas, ou COVID-19 convalescente devido à infecção prévia por SARS-CoV-2, referidos como Inicial (●, n=34), Intermediário (●, n=50) ou Tardio (●, n=39). Os níveis de mediadores inflamatórios solúveis foram quantificados por um ensaio multiplex de alto rendimento, conforme descrito em População, Materiais e Métodos. (A) A magnitude do *fold change* é mostrada em gráficos de pirulito de acordo com os valores medianos

observados para os Controles Saudáveis (CS, n=8). A magnitude do *fold change* de mediadores inflamatórios solúveis com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foi sublinhada em negrito. (B) Os resultados são mostrados como distribuição de dispersão de valores individuais de *fold change*/mediana de CS. A cor cinza foi usada para rotular mediadores inflamatórios solúveis com valores de *fold changes* (FC) de  $0,8x \leq FC \leq 1,5x$ . mediadores inflamatórios comuns observados em todos os subgrupos de COVID-19 (Agudo, Inicial, Intermediário e Tardio) foram rotulados com \* e aqueles observados apenas nos subgrupos convalescentes (Inicial, Intermediário e Tardio) identificados por #.

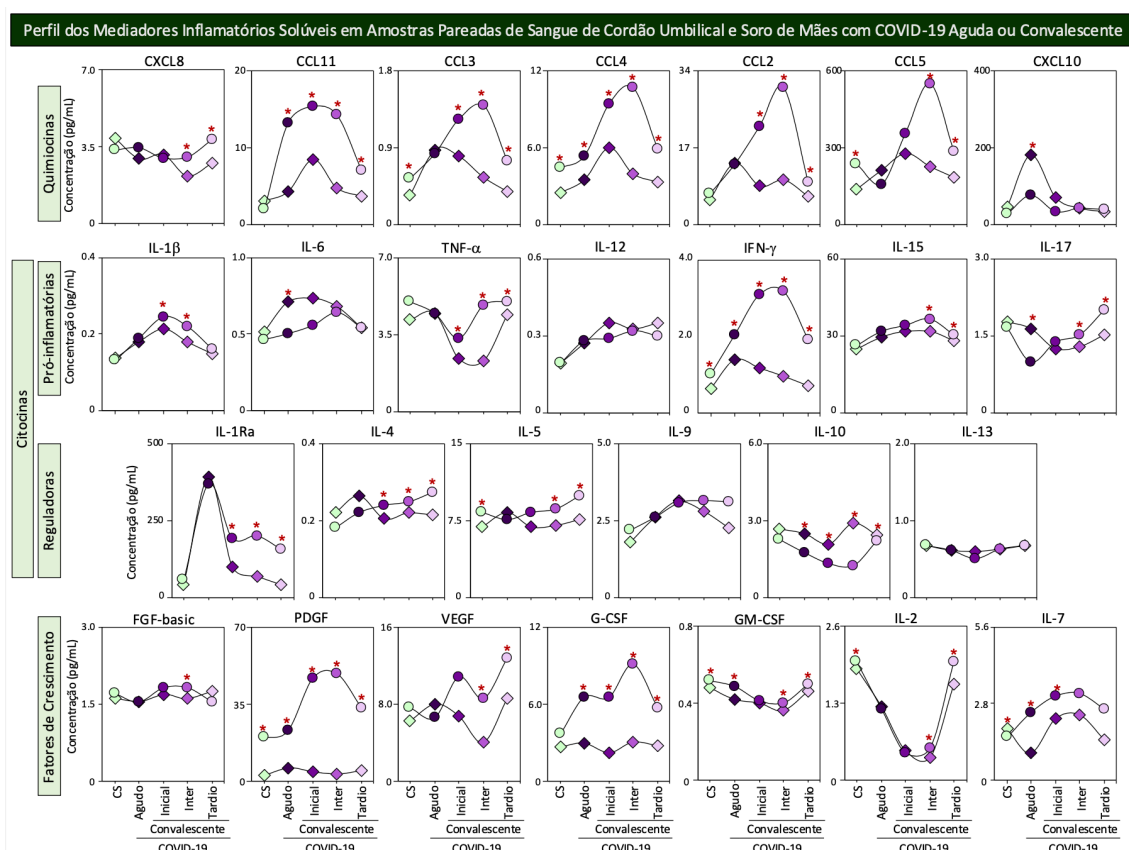
A análise dos dados demonstrou que o sangue do cordão umbilical do subgrupo Agudo apresentou uma gama de mediadores inflamatórios solúveis com magnitudes de *fold change* superiores a 1,5x, atingindo valores tão altos quanto 6,7x, com  $CCL11 > IL1Ra > CXCL10 > CCL2 > IFN-\gamma \sim G-CSF > CCL3 > IL-7 > IL-1\beta$ . O sangue do cordão umbilical dos subgrupos Inicial e Intermediário exibiu um grande conjunto de mediadores inflamatórios solúveis com magnitudes de *fold change* maiores que 1,5x, atingindo 7,2x e 8,2x, respectivamente. Em geral, os dados demonstraram uma ordem de magnitude de  $CCL11 > CCL2 > IFN-\gamma > PDGF > IL-1Ra > CCL3 > CCL4 > IL-7 > IL-1\beta > G-CSF > CCL5 \sim IL-12$  no subgrupo Inicial e  $CCL11 > CCL2 > IL-1Ra > IFN-\gamma \sim G-CSF > CCL3 > PDGF \sim CCL5 \sim CCL4 > IL-7 > IL-1\beta > IL-12 \sim IL-9 > CXCL10$  no subgrupo Intermediário (Figura 3, gráficos de barras). O sangue do cordão umbilical do subgrupo Tardio mostrou um pequeno conjunto de mediadores solúveis com *fold changes* aumentados, superiores a 1,5x até 3,5x:  $CCL11 > IL-1Ra > IL-7 \sim IFN-\gamma > PDGF \sim VEGF > G-CSF > IL-12 \sim IL-4$ . Por outro lado, magnitudes de *fold change* diminuídas abaixo de 0,8x foram observadas em Agudo ( $IL-2 \sim IL-17 < IL-10$ ), Inicial ( $IL-2 < IL-10 < TNF-\alpha < IL-13 \sim GM-CSF \sim CXCL8 \sim IL-17$ ) e Intermediário ( $IL-2 < IL-10 < GM-CSF$ ), sem valores abaixo de 0,8x observados no subgrupo Tardio (Figura 3, gráficos de barras).

A análise do diagrama de Venn identificou um conjunto de mediadores inflamatórios solúveis comuns com níveis aumentados em todos os subgrupos de COVID-19 (de 1,6x até 8,2x), compreendendo CCL11, IFN- $\gamma$ , IL-1Ra e G-CSF (Figura 3, \* abaixo dos gráficos de barras). Além disso, *fold changes* aumentados de PDGF foram comumente observados apenas na COVID-19 convalescente (subgrupos Inicial, Intermediário e Tardio) (Figura 3, # abaixo dos gráficos de barras).

### 4.3 Perfis de mediadores inflamatórios solúveis de amostras pareadas de sangue do cordão umbilical e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente

Embora a transferência transplacentária da maioria dos mediadores solúveis não seja esperada em humanos, o perfil imunológico materno pode interferir na resposta imune fetal e impactar o microambiente do sangue do cordão umbilical. A fim de avaliar se o perfil dos mediadores inflamatórios do soro materno se assemelha ao padrão observado nas amostras de sangue do cordão umbilical de seus descendentes, foi realizada uma análise paralela de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento nos pares mãe-recém-nascido dos subgrupos Agudo, Inicial, Intermediário e Tardio de COVID-19, bem como em controles saudáveis. Os resultados são apresentados na Figura 4.

**Figura 4 - Perfil dos mediadores inflamatórios solúveis em amostras pareadas de sangue de cordão umbilical e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.**

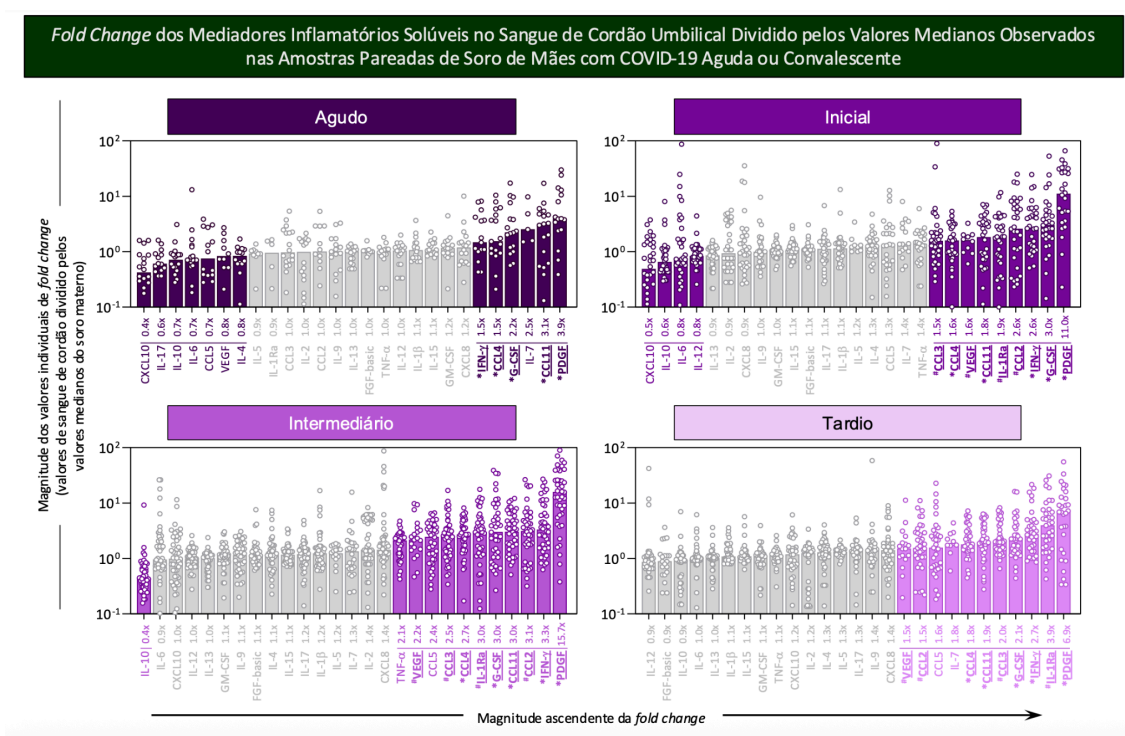


Na Figura 4, os níveis de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento foram medidos em amostras de sangue do cordão umbilical coletadas de neonatos (círculos = ○) e amostras de soro pareadas de mães (losangos = ◇) com infecção aguda por SARS-CoV-2 (●; ◆, n=18) até 14 dias após o início dos sintomas, ou COVID-19 convalescente devido à infecção prévia por SARS-CoV-2, referidos como: Inicial (●; ◆, n=34), Intermediário (●; ◆, n=50) ou Tardio (●; ◆, n=39), em comparação com Controles Saudáveis (CS = ●; ◆, n=8). Os níveis de mediadores inflamatórios solúveis foram quantificados por um ensaio multiplex de alto rendimento, conforme descrito em População, Materiais e Métodos. Os resultados são apresentados como valores medianos da concentração no sangue do cordão umbilical e no soro materno (pg/mL), utilizando as legendas de símbolos conforme mostrado na figura. Linhas de conexão foram usadas para traçar os perfis dos mediadores inflamatórios solúveis das amostras de sangue do cordão umbilical e do soro materno. A análise comparativa intragrupo entre amostras pareadas foi realizada pelo teste de Wilcoxon e a significância foi considerada em  $p < 0,05$ . Diferenças significativas foram sublinhadas pelo asterisco vermelho “\*” para comparações dentro dos grupos CS, Agudo, Inicial, Intermediário e Tardio.

A análise comparativa demonstrou que a maioria dos mediadores inflamatórios solúveis em amostras pareadas de soro materno e sangue do cordão umbilical de controles saudáveis apresentou valores medianos semelhantes, exceto por 8 de 27 moléculas (30%), compreendendo níveis mais altos de CCL3, CCL4, CCL5, IFN- $\gamma$ , IL-5, PDGF, GM-CSF e IL-2 e nível mais baixo de IL-7 observados no sangue do cordão umbilical em comparação com o soro materno (Figura 4, símbolos verdes). Perfis distintos de mediadores inflamatórios solúveis foram identificados na análise pareada dos subgrupos Agudo de mãe-recém-nascido para 11 de 27 analitos (41%), compreendendo níveis aumentados de CCL11, CCL4, IFN- $\gamma$ , PDGF, G-CSF, GM-CSF e IL-7 e níveis diminuídos de CXCL10, IL-6, IL-17 e IL-10 em amostras de sangue do cordão umbilical em comparação com o soro materno (Figura 4, símbolos roxos escuros). Notavelmente, houve um aumento nos níveis de um conjunto maior de mediadores inflamatórios solúveis observados em amostras de sangue do cordão umbilical dos subgrupos convalescentes de COVID-19 (Inicial = 11/27, 41%; Intermediário = 20/27, 74% e Tardio = 18/27, 67%) em comparação com o soro materno (Figura 4). IL-10 foi o único parâmetro que apresentou níveis medianos mais baixos no sangue do cordão umbilical em comparação com o soro materno durante toda a convalescença da COVID-19 (Figura 4).

Com o objetivo de identificar os mediadores inflamatórios solúveis com maior magnitude para diferenciar amostras de sangue do cordão umbilical do soro materno, os valores de *fold change* foram calculados para cada mediador imunológico solúvel nos subgrupos de COVID-19 de acordo com os valores medianos do soro materno correspondente. Os resultados são apresentados na Figura 5.

**Figura 5 - *Fold change* dos mediadores inflamatórios solúveis no sangue de cordão umbilical dividido pelos valores medianos observados nas amostras pareadas de soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.**



Na Figura 5, a magnitude do *fold change* foi calculada para as amostras de sangue do cordão umbilical dividida pelos valores medianos observados para o soro materno correspondente. Os resultados são apresentados como distribuição de dispersão de *fold changes* individuais (valores medianos de sangue do cordão umbilical/soro materno). Mediadores inflamatórios solúveis com *fold changes*  $\leq 0,8x$  e  $\geq 1,5x$  foram rotulados por formato de cor. A cor cinza foi usada para rotular mediadores inflamatórios solúveis com valores de *fold change* (FC) de  $0,8x \leq FC \leq 1,5x$ . Mediadores inflamatórios comuns observados em todos os subgrupos de

COVID-19 (Agudo, Inicial, Intermediário e Tardio) foram rotulados com \* e aqueles observados apenas nos subgrupos convalescentes (Inicial, Intermediário e Tardio) identificados por #.

A análise dos dados demonstrou que o sangue do cordão umbilical do subgrupo Agudo apresentou uma gama de mediadores inflamatórios solúveis com magnitudes de *fold change* superiores a 1,5x, atingindo valores tão altos quanto 3,9x, com PDGF > CCL11 > IL-7 > G-CSF > CCL-4 ~ IFN- $\gamma$ . O sangue do cordão umbilical dos subgrupos convalescentes de COVID-19 (Inicial, Intermediário e Tardio) exibiu um conjunto maior de mediadores inflamatórios solúveis com magnitudes de *fold change* de até 11,0x, 15,7x e 6,9x, respectivamente. Em geral, os dados do subgrupo Inicial demonstraram uma ordem de magnitude de PDGF > G-CSF > IFN- $\gamma$  ~ CCL-2 > IL-1Ra > CCL-11 > VEGF ~ CCL4 > CCL3. Os dados do subgrupo Intermediário mostraram uma ordem de magnitude de PDGF > IFN- $\gamma$  > CCL2 > CCL11 ~ G-CSF ~ IL-1Ra > CCL4 > CCL3 > CCL5 > VEGF > TNF- $\alpha$ . Os resultados do subgrupo Tardio mostraram uma ordem de magnitude de PDGF > IL-1Ra > IFN- $\gamma$  > G-CSF > CCL3 > CCL11 > CCL4 ~ IL-7 > CCL5 > CCL2 ~ VEGF. Por outro lado, magnitudes de *fold change* diminuídas (abaixo de 0,8x) foram observadas em Agudo (CXCL10 < IL-17 < IL-10 ~ IL-6 ~ CCL5 < VEGF < IL-4), Inicial (CXCL10 < IL-10 < IL-6 ~ IL-12) e Intermediário (IL-10), sem valor abaixo de 0,8x observado no subgrupo Tardio (Figura 5).

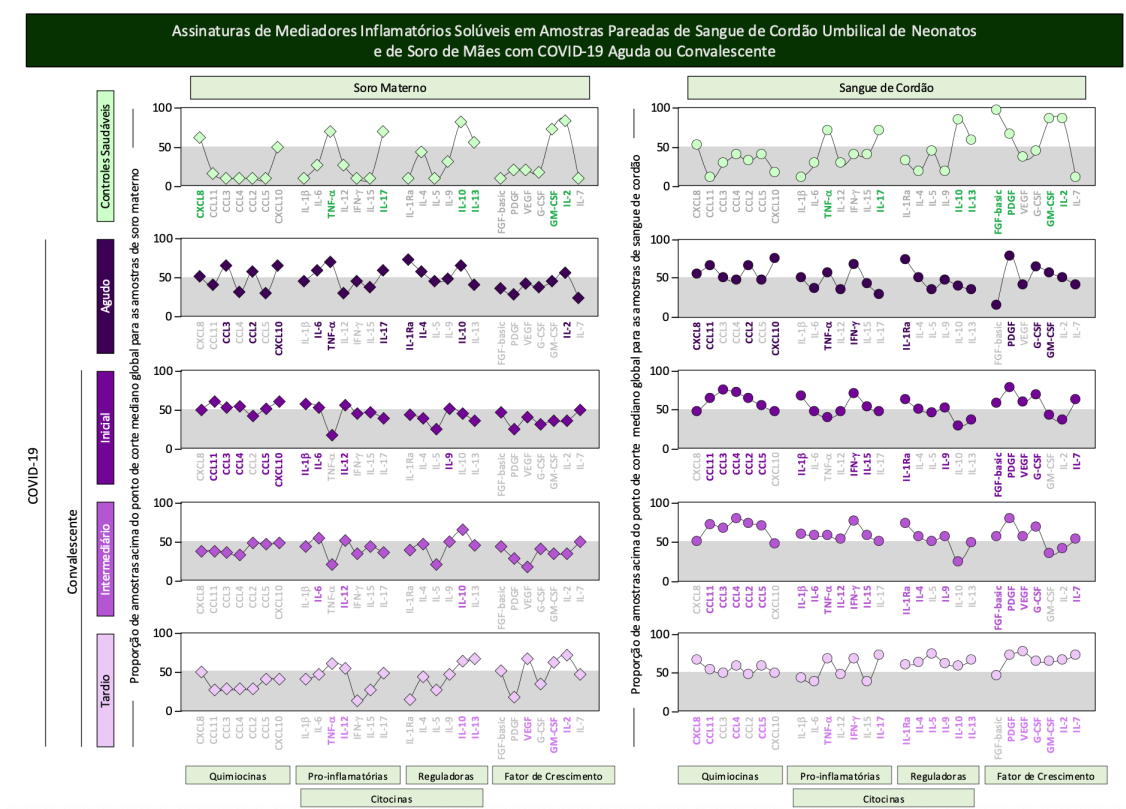
A análise do diagrama de Venn identificou um conjunto de mediadores inflamatórios solúveis comuns com níveis aumentados acima de 1,5x até 15,7x em amostras de sangue do cordão umbilical em relação ao soro materno em todos os subgrupos de COVID-19, compreendendo CCL11, CCL4, IFN- $\gamma$ , PDGF e G-CSF (Figura 5, \* abaixo dos gráficos de barras). Além disso, *fold changes* aumentados de CCL2, CCL3, IL-1Ra e VEGF foram comumente observados apenas na COVID-19 convalescente (subgrupos Inicial, Intermediário e Tardio) (Figura 5, # abaixo dos gráficos de barras).

#### **4.4 Assinaturas de mediadores inflamatórios solúveis de amostras pareadas de sangue do cordão umbilical de neonatos e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente**

A fim de obter uma visão panorâmica dos mediadores inflamatórios solúveis no soro materno e no sangue do cordão umbilical de seus descendentes, as assinaturas

de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento foram montadas para os pares mãe-recém-nascido dos subgrupos Agudo, Inicial, Intermediário e Tardio, bem como para os controles saudáveis. As assinaturas de mediadores inflamatórios solúveis no soro materno e no sangue do cordão umbilical foram construídas como dados categóricos, reportadas como a proporção de amostras com níveis acima do ponto de corte mediano global determinados para amostras de soro materno e sangue do cordão umbilical. Os resultados são apresentados na Figura 6.

**Figura 6 - Assinaturas de mediadores inflamatórios solúveis de amostras pareadas de sangue do cordão umbilical de neonatos e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.**



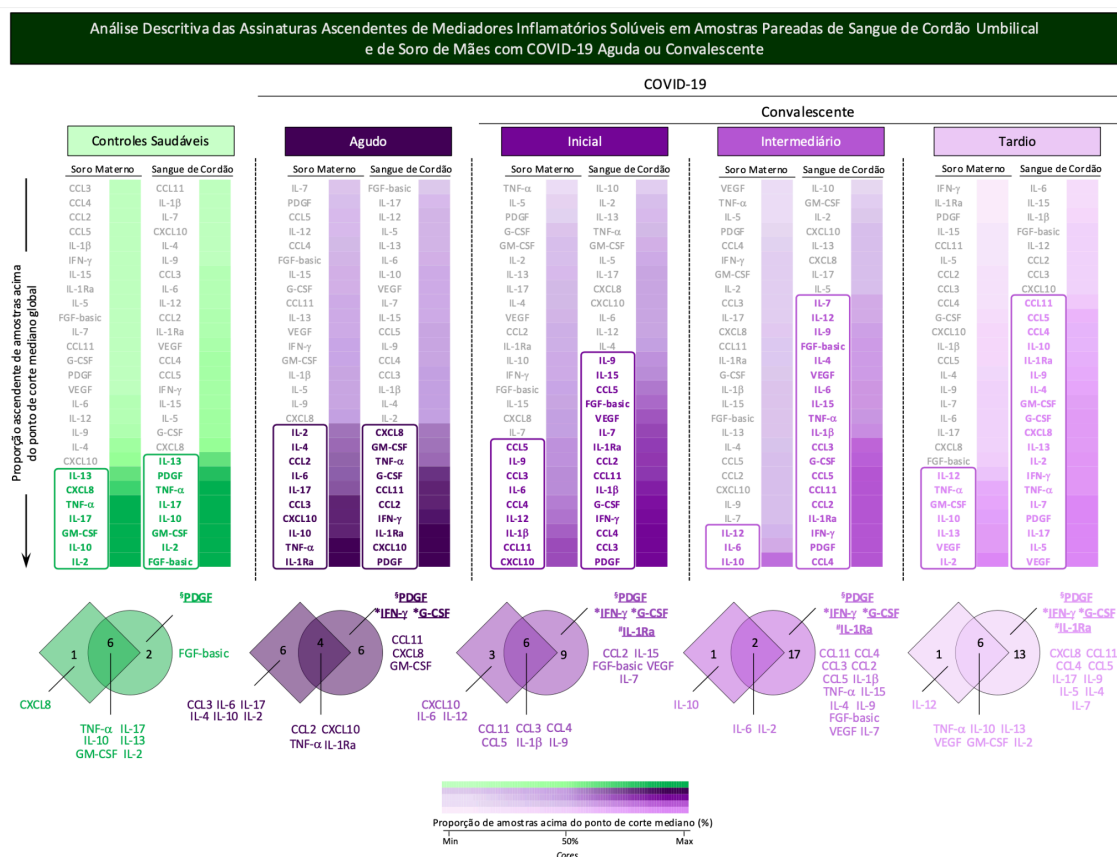
Na Figura 6, as assinaturas de amostras pareadas de soro materno (losangos =  $\diamond$ ) e sangue do cordão umbilical (círculos =  $\circ$ ) foram comparadas para cada subgrupo de COVID-19, bem como para os controles saudáveis. Linhas de conexão foram usadas para traçar as assinaturas de distintas categorias de perfis de mediadores inflamatórios solúveis (quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, juntamente com fatores de crescimento). Os mediadores inflamatórios

solúveis com proporção de amostras acima do percentil 50 (zona cinza) foram incluídos no conjunto de atributos com níveis aumentados e foram destacados por formato de cor em negrito sublinhado. Em controles saudáveis, um pequeno conjunto de mediadores inflamatórios com níveis aumentados foi observado para o soro materno (7/27, 26% – CXCL8, TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-10, IL-13, GM-CSF, IL-2) e amostras de sangue do cordão umbilical (8/27, 30% – TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-10, IL-13, FGF-básico, PDGF, GM-CSF, IL-2). No subgrupo Agudo, um total de 10 de 27 mediadores inflamatórios (37%) estavam aumentados no soro materno (CCL3, CCL2, CXCL10, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-1Ra, IL-4, IL-10 e IL-2) e nas amostras de sangue do cordão umbilical (CXCL8, CCL11, CCL2, CXCL10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1Ra, PDGF, G-CSF e GM-CSF) (Figura 6).

Perfis distintos de mediadores solúveis foram identificados no soro materno e no sangue do cordão umbilical dos subgrupos convalescentes. Diminuição no conjunto de mediadores inflamatórios observados para o soro materno dos subgrupos Inicial (9/27, 33%), Intermediário (3/27, 11%) e Tardio (7/27, 26%). Por outro lado, um número maior de mediadores inflamatórios permaneceu com níveis aumentados em amostras de sangue do cordão umbilical nos subgrupos convalescentes (Inicial = 15/27, 56%; Intermediário = 19/27, 70% e Tardio = 19/27, 70%) (Figura 6).

Uma análise adicional das assinaturas de mediadores inflamatórios solúveis foi realizada para identificar moléculas comuns e seletivas com níveis aumentados em pares de soro materno e sangue do cordão umbilical em controles saudáveis e durante COVID-19 aguda ou convalescente. Para este propósito, os mediadores inflamatórios solúveis foram classificados considerando a proporção ascendente de amostras com níveis acima da mediana global e os dados apresentados na Figura 7.

**Figura 7 - Análise descritiva das assinaturas ascendentes de mediadores inflamatórios solúveis de amostras pareadas de sangue do cordão umbilical e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.**



Os resultados da Figura 7 são apresentados como perfil ascendente da proporção (%) de amostras com níveis de mediadores inflamatórios solúveis acima dos valores de corte, definidos como a concentração mediana global geral de cada mediador solúvel conforme descrito em Material e Métodos. Mapas de calor (colormaps) foram criados para identificar os mediadores inflamatórios solúveis que exibem uma proporção de indivíduos acima de 50% e selecionar o conjunto de atributos com níveis aumentados (retângulos de coluna), destacados por formato de cor em negrito. A legenda de cores utilizada para a proporção numérica (%) de amostras com níveis de mediadores inflamatórios solúveis acima dos valores de corte (Min, 50% e Máx) é fornecida na figura.

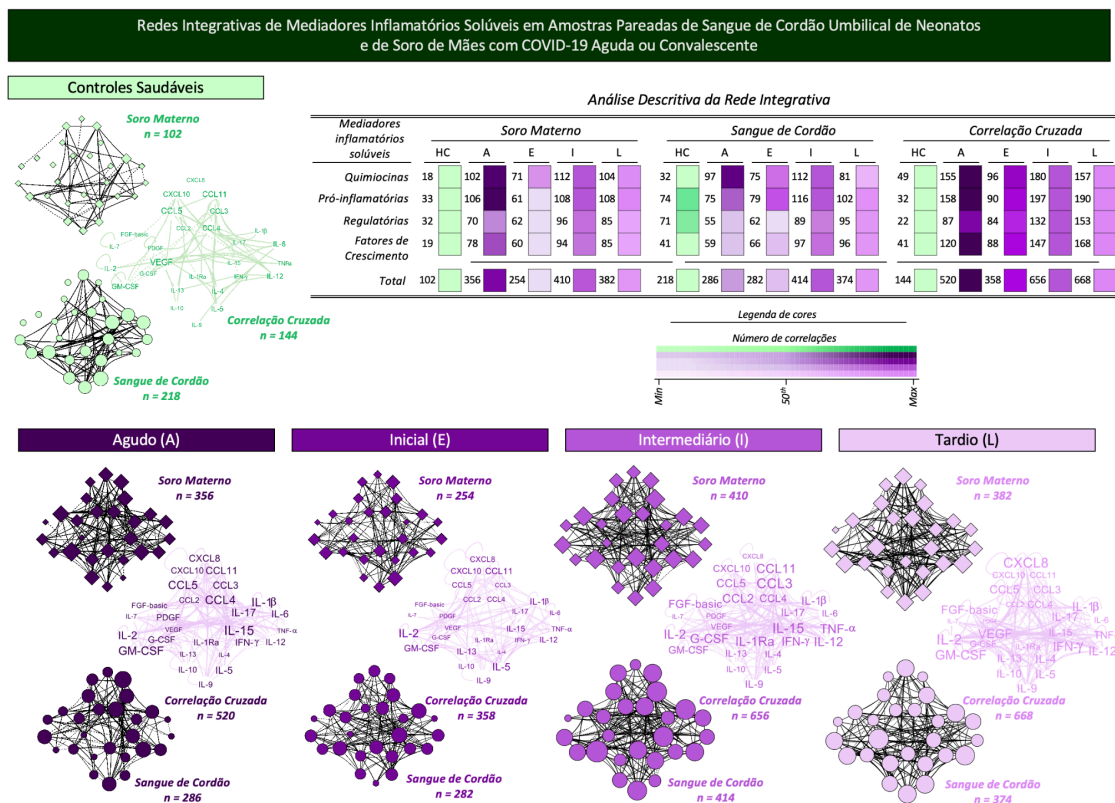
A análise do diagrama de Venn permitiu a identificação de mediadores inflamatórios comuns e seletivos observados em pares mãe-recém-nascido. A análise descritiva de mediadores inflamatórios seletivos apontou que o PDGF estava

universalmente aumentado em amostras de sangue do cordão umbilical de todos os grupos de estudo (CS, Agudo, Inicial, Intermediário e Tardio). IFN- $\gamma$  e G-CSF estavam aumentados em amostras de sangue do cordão umbilical de todos os subgrupos de COVID-19 (Figura 7, atributos sublinhados com \*). IL-1Ra estava seletivamente aumentado no sangue do cordão umbilical dos subgrupos convalescentes (Inicial; Intermediário; Tardio) (Figura 7, atributos sublinhados com #).


#### **4.5 Redes integrativas de mediadores inflamatórios solúveis em amostras pareadas de sangue do cordão umbilical de recém-nascidos e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente**

Um panorama complementar da interação entre mediadores inflamatórios solúveis de amostras de soro materno e sangue do cordão umbilical foi explorado por análises de correlação e correlação cruzada. Os resultados são apresentados na Figura 8.

**Figura 8 - Redes integrativas de mediadores inflamatórios solúveis em amostras pareadas de sangue do cordão umbilical de neonatos e de soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.**



Na Figura 8, circuitos de rede integrativa foram montados para quimiocinas séricas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento medidos em amostras de sangue do cordão umbilical coletadas de neonatos (círculos = ○) e amostras de soro pareadas de mães (losangos = ◇) na infecção aguda por SARS-CoV-2 (A = ●; ◆, n=18) até 14 dias após o início dos sintomas, ou COVID-19 convalescente devido à infecção prévia por SARS-CoV-2, referidos como: Inicial (E = ●; ◆, n=34), Intermediário (I = ●; ◆, n=50) ou Tardio (L = ●; ◆, n=39), em comparação com Controles Saudáveis (CS = ●; ◆, n=8). Os níveis de mediadores inflamatórios solúveis foram quantificados por um ensaio multiplex de alto rendimento, conforme descrito em Material e Métodos. Os circuitos da rede foram construídos com base na análise de correlação do teste de *rank* de Spearman entre pares de mediadores inflamatórios solúveis. Apenas correlações significativas moderadas/fortes (escores “r” ≥ |0,40|) (p<0,05) foram utilizadas para construir redes com quatro circuitos de *clusters* (quimiocinas; citocinas pró-inflamatórias; citocinas reguladoras e

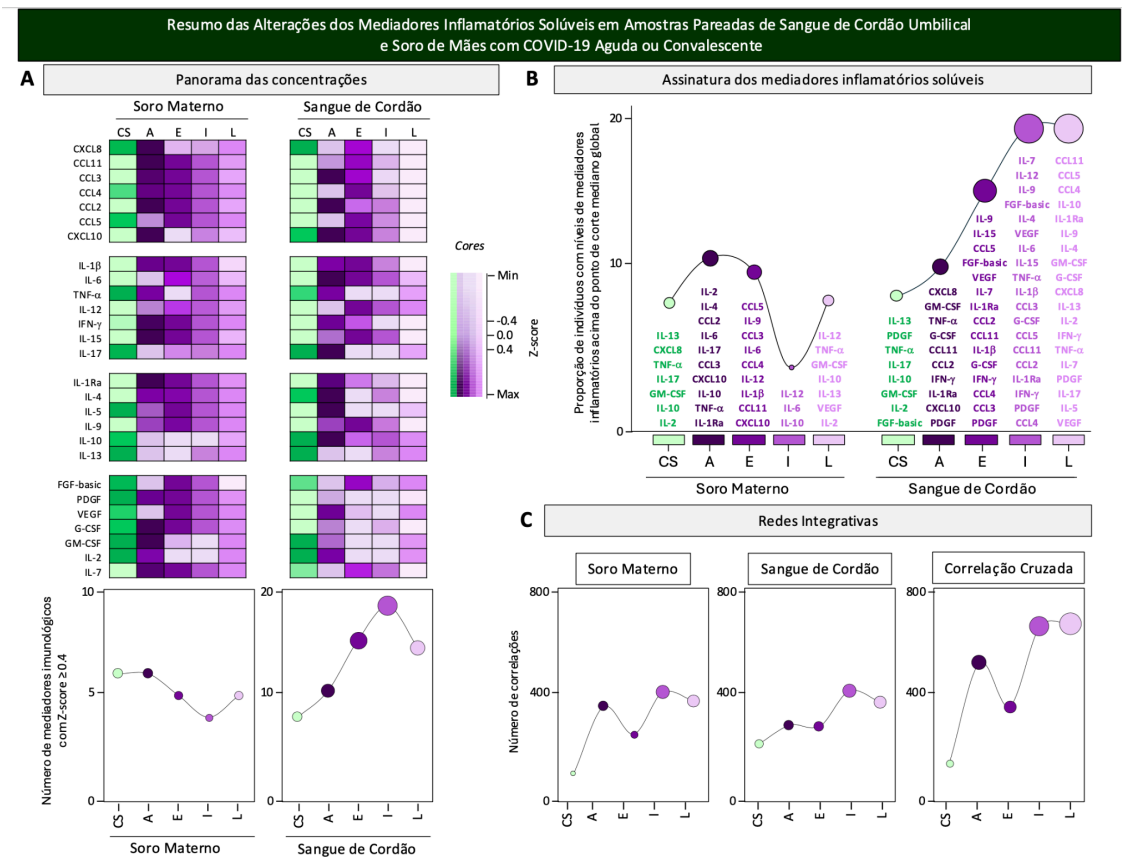
fatores de crescimento) utilizando a plataforma de *software* de código aberto Cytoscape (disponível em <http://cytoscape.org>). Nuvens de correlação cruzada foram montadas para compilar os correlogramas de mediadores inflamatórios solúveis do soro materno e das amostras de sangue do cordão umbilical. O número de correlações dentro de cada *cluster* e a correlação total de mediadores inflamatórios solúveis para cada grupo são fornecidos na tabela inserida. Mapas de cores ilustram a análise comparativa do número de correlações dentro de cada *cluster* entre os subgrupos de soro materno, amostras de sangue do cordão umbilical e sua correlação cruzada. A legenda de cores utilizada para o número de correlações ( , Mín, 50° e Máx) é fornecida na Figura 8.

Análises de correlações entre quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento foram usadas para avaliar a conectividade de vizinhança nos microambientes de soro materno e sangue do cordão umbilical. Adicionalmente, análises de correlação cruzada entre mediadores solúveis de soro materno e sangue do cordão umbilical foram calculadas para caracterizar a interação de mediadores inflamatórios solúveis entre esses compartimentos. A análise dos dados demonstrou que, em geral, o número de correlações no soro materno e no sangue do cordão umbilical, bem como a correlação cruzada entre os pares mãe/cordão umbilical, aumentou na COVID-19 Aguda em comparação com os CS (n=102 e 356; n=218 e 286; n=144 e 520, respectivamente). Números aumentados de correlação no sangue do cordão umbilical (n=414 e 374), juntamente com maior correlação cruzada entre os pares mãe/cordão umbilical (n=656 e 668), foram observados desde a infecção aguda até os subgrupos convalescentes Intermediário e Tardio (Figura 8).

#### **4.6 Resumo das alterações nos mediadores inflamatórios solúveis em amostras pareadas de sangue do cordão umbilical e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.**

Uma visão panorâmica das alterações nas concentrações gerais, assinaturas e redes integrativas de mediadores inflamatórios solúveis foi obtida para análise comparativa entre amostras de sangue do cordão umbilical e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente. Os resultados são apresentados na Figura 9.

**Figura 9 - Resumo das alterações dos mediadores inflamatórios solúveis em amostras pareadas de sangue do cordão umbilical e soro de mães com COVID-19 aguda ou convalescente.**



Na Figura 9, um panorama de **(A)** as concentrações globais, **(B)** as assinaturas dos mediadores inflamatórios solúveis e **(C)** as redes integrativas de mediadores inflamatórios solúveis (quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento) foi composto por amostras de sangue do cordão umbilical coletadas de neonatos e amostras de soro de mães com infecção aguda por SARS-CoV-2 (■, n=18) até 14 dias após o início dos sintomas, ou COVID-19 convalescente devido à infecção prévia por SARS-CoV-2, referidos como: Inicial (■, n=34), Intermediário (■, n=50) ou Tardio (■, n=39), em comparação com Controles Saudáveis (CS = ■, n=8). Para resumir as principais alterações observadas na concentração global de mediadores solúveis nos compartimentos de sangue do cordão umbilical e soro materno, foi aplicada a normalização por escores Z (*Z-scores*) e construídos *colormaps* (mapas de calor) para calcular o número de mediadores solúveis com escore  $Z \geq 4$  em cada compartimento. Os resultados são apresentados em gráficos de linha para ilustrar a análise comparativa entre os subgrupos. As assinaturas dos mediadores inflamatórios solúveis foram compiladas para permitir

comparações entre os conjuntos de mediadores solúveis com níveis aumentados no sangue do cordão umbilical e nas amostras de soro materno de cada subgrupo. Gráficos de linha ilustram o ritmo dos mediadores inflamatórios. As redes integrativas foram comparadas considerando o número de correlações observadas para o sangue do cordão umbilical, o soro materno e a correlação cruzada entre eles em cada subgrupo. Gráficos de linha ilustram o perfil de correlação entre os mediadores inflamatórios em cada subgrupo.

As construções de mapas de calor foram montadas para análise comparativa das concentrações de mediadores inflamatórios solúveis entre os dois compartimentos. Os dados demonstraram um perfil invertido para amostras de soro materno e sangue do cordão umbilical. Enquanto um declínio nos mediadores solúveis foi observado no compartimento do soro materno desde os subgrupos agudos até os convalescentes de COVID-19, um aumento de mediadores solúveis foi observado em amostras de sangue do cordão umbilical da COVID-19 aguda para a convalescente. A análise das assinaturas de mediadores solúveis confirmou ainda esses achados. Um aumento nos números de correlação foi observado no soro materno, nas amostras de sangue do cordão umbilical e na interação de correlação cruzada dos CS até a COVID-19 convalescente Tardio. No entanto, as formas de onda revelaram que durante a infecção aguda, uma regulação positiva mais pronunciada foi observada nos números de correlação no soro materno e na interação de correlação cruzada em comparação com as amostras de sangue do cordão umbilical (Figura 9).

## 5. DISCUSSÃO

O surgimento de patógenos recém-identificados ou de patógenos previamente conhecidos que se espalham para novas áreas geográficas ou populações apresenta desafios significativos para a saúde global. A compreensão da patogênese dessas doenças infecciosas emergentes, particularmente em uma população vulnerável como mulheres grávidas, além da identificação de potenciais biomarcadores na interface materno-fetal, são extremamente importantes para propor intervenções clínicas. O presente estudo tenta caracterizar o perfil de mediadores inflamatórios solúveis em amostras de soro de mães com COVID-19 aguda e convalescente e no microambiente do sangue do cordão umbilical de seus descendentes, em comparação com controles saudáveis, empregando abordagens estatísticas distintas para análise de dados. O aspecto único deste estudo reside na medição das assinaturas de mediadores inflamatórios em díades mãe/recém-nascido e na observação de que essas assinaturas diferem significativamente, destacando a importância de avaliar microambientes distintos de forma independente ao monitorar gestações afetadas pela COVID-19.

A compreensão da resposta imunológica à infecção por SARS-CoV-2 expandiu-se rapidamente, desde uma extensa pesquisa básica até aplicações clínicas (71-73). A literatura científica sobre a imunidade à COVID-19 durante a gravidez permanece limitada (74-76). As alterações fisiológicas no sistema imunológico observadas durante a gravidez tornam as mulheres grávidas e seus descendentes um grupo de risco para desfechos adversos da infecção por SARS-CoV-2 (59,62-64). Embora a transmissão materno-fetal da infecção por SARS-CoV-2 seja rara, as alterações imunológicas durante a gravidez podem aumentar o risco de complicações em gestações afetadas pela COVID-19 (77,78).

A interação entre a interface materno-fetal compreende complexas alterações fisiológicas e sofre modificações ao longo dos trimestres da gravidez (67). Portanto, a análise da interface materno-fetal durante a COVID-19 aguda e convalescente é relevante para avaliar a dinâmica das alterações nas respostas imunológicas das mães e o impacto no microambiente do sangue do cordão umbilical. Independentemente da relevância deste tópico, o efeito do SARS-CoV-2 durante a gravidez, bem como o impacto de longo prazo no desenvolvimento infantil, ainda precisa ser elucidado.

Nessa linha, o presente estudo teve como objetivo investigar se o perfil de mediadores inflamatórios solúveis no sangue do cordão umbilical espelha o observado no soro de mães com infecção aguda (no parto) e convalescente (Early/Intermediate/Late) por SARS-CoV-2 (respectivamente, 3º, 2º e 1º trimestres). Para esse propósito, amostras pareadas de soro materno e sangue do cordão umbilical de seus recém-nascidos foram obtidas no parto e categorizadas de acordo com o momento da infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez. Tem sido demonstrado que infecções virais adquiridas no período perinatal podem levar a complicações neonatais relevantes, e o trimestre da gravidez em que ocorre a infecção por SARS-CoV-2 é crucial para determinar o risco de desfechos adversos (79-82).

Nossos resultados demonstraram que, durante a infecção aguda, as amostras de sangue do cordão umbilical apresentaram um aumento de vários mediadores inflamatórios solúveis, incluindo CCL11, CCL3, CXCL10, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1Ra e G-CSF e uma diminuição de IL-10, assemelhando-se à tempestade de citocinas classicamente relatada pela infecção por SARS-CoV-2. A regulação positiva em CXCL10 foi previamente relatada durante a infecção por SARS-CoV-2 adquirida no 3º trimestre de gravidez, alinhando-se com nossa observação (83,84).

Nossos achados mostraram que, à medida que a infecção materna progride da fase aguda para a convalescente, as alterações nos mediadores inflamatórios do sangue do cordão umbilical não espelham o perfil do soro materno. Esses achados sugerem que o impacto da infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez desencadeia alterações compartimentalizadas no perfil imunológico do soro materno e do sangue do cordão umbilical, com um efeito de longo prazo neste último, contrastando com a diminuição típica observada no soro materno. Alguns estudos relataram que a disfunção endotelial e as alterações no fluxo vascular placentário devido à infecção por COVID-19 favorecem a passagem de mediadores solúveis e outros componentes do sistema imunológico para o sangue do cordão umbilical (85,86). O mecanismo preciso subjacente à *crosstalk* entre microambientes sistêmicos e compartimentalizados, como a díade soro materno & sangue do cordão umbilical, bem como soro materno & líquido cefalorraquidiano, ainda precisa ser elucidado. Nesse contexto, tem sido demonstrada a existência de um panorama divergente de mediadores inflamatórios solúveis no soro e no líquido cefalorraquidiano, enfatizando a relevância de compreender a resposta imunológica sistêmica e compartimentalizada desencadeada pela infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez (87). Portanto, a resposta imunológica durante a

gravidez é o resultado da combinação e especificidades do sistema imunológico materno e do microambiente feto-placentário, levando a uma resposta imunológica única (88).

A infecção por COVID-19 durante a gravidez provoca uma resposta inflamatória sistêmica materna que leva a alterações no microambiente da placenta. Essas alterações podem incitar uma disfunção imunológica no feto que, em última análise, apresenta efeitos de curto e longo prazo na prole (89). Nossos achados apoiam a hipótese de participação feto-placentária ativa nas respostas imunológicas. Conforme demonstrado por Taglauer e colegas (83), embora algumas citocinas e quimiocinas estivessem elevadas no compartimento neonatal, sua presença não era simplesmente o resultado de transferência passiva da circulação materna. Esses achados se alinham com observações anteriores de que as alterações nos mediadores inflamatórios do sangue do cordão umbilical não representam uma transferência passiva do soro materno, mas sim indicam mecanismos independentes que ocorrem dentro da díade placentária-fetal (67,83).

A análise da díade mãe-cordão umbilical permitiu a caracterização do diálogo da resposta imunológica na interface materno-fetal através da COVID-19 aguda e convalescente adquirida durante a gravidez. Independentemente do estágio da COVID-19, as amostras de sangue do cordão umbilical de recém-nascidos de mães com COVID-19 exibiram níveis mais altos de CCL11, IFN- $\gamma$ , IL-1Ra e G-CSF em comparação com os controles saudáveis. Notavelmente, é importante mencionar que o CCL4 apresentou um aumento nos subgrupos convalescentes, assim como o PDGF também aumentou no sangue do cordão umbilical em todos os subgrupos, incluindo os CS. Esses dados são consistentes com os efeitos conhecidos do SARS-CoV-2, que pode desencadear uma ativação imunológica sistêmica polifuncional mesmo em compartimentos neonatais. Além disso, esses achados estão de acordo com a hipótese de que as alterações nos mediadores inflamatórios do sangue do cordão umbilical representam um mecanismo independente dentro da interface placentária-fetal (67,83,90). Nesse contexto, esse fenômeno, referido como "priming in utero", mesmo na ausência de infecção congênita por bactérias e vírus, é caracterizado por alterações em citocinas, quimiocinas fetais e outros fatores celulares e humorais que não se assemelham à resposta materna (91,92). O conhecimento desse microambiente fetal distinto em comparação com a resposta imunológica materna traz novas percepções sobre a resposta imunológica compartimentalizada induzida pela COVID-19 gestacional.

Estudos anteriores demonstraram que a infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez induz um estado pró-inflamatório dentro da cavidade amniótica, causando um aumento de mediadores inflamatórios na circulação fetal (93). Nossos dados destacaram a presença de níveis elevados de CCL11 e IFN- $\gamma$  em amostras de sangue do cordão umbilical, o que pode indicar um estado elevado de inflamação na interface materno-fetal. Além disso, os níveis mais altos de IL-1Ra, uma molécula anti-inflamatória, podem desempenhar um papel como mecanismo compensatório para neutralizar o ambiente pró-inflamatório induzido pela COVID-19 materna, protegendo os compartimentos neonatais da inflamação excessiva que poderia prejudicar o desenvolvimento (94). Estudos anteriores relataram que níveis aumentados de IL-1Ra durante a infecção por SARS-CoV-2 podem prever desfechos graves de COVID-19 em pacientes e podem ser úteis como biomarcador prognóstico para guiar estratégias de tratamento (95).

A persistência de G-CSF em amostras de sangue do cordão umbilical, desde as fases aguda até as convalescentes, sublinha ainda mais a complexidade da resposta imunológica na interface materno-fetal. O G-CSF é conhecido por desempenhar um papel tanto na defesa imunológica quanto na reparação tecidual, sugerindo que sua elevação pode refletir uma tentativa de equilibrar a ativação imunológica com a homeostase tecidual (94,96). É bem sabido que o G-CSF aumenta durante a gravidez, englobando os mapas de paisagens de citocinas de distintas fases da resposta imunológica gestacional (67). Tem sido sugerido que o G-CSF atua como mediador anti-inflamatório durante a gravidez (67).

Nossos dados demonstraram níveis mais altos de CCL4, particularmente nos subgrupos convalescentes, sugerindo ativação imunológica persistente mesmo após a resolução da infecção aguda. O CCL4, uma quimiocina envolvida no recrutamento de monócitos e linfócitos, pode contribuir para a resposta imunológica de longo prazo e alguns relatos identificam essa quimiocina como uma molécula redundante em correlações entre outros componentes do sistema imunológico na interface materno-fetal (97). Além disso, todos os subgrupos de sangue do cordão umbilical apresentaram níveis mais altos de PDGF, independentemente da infecção materna por SARS-CoV-2. Nesse contexto, o papel dessa molécula pode refletir um processo fisiológico basal essencial para o desenvolvimento fetal. No entanto, é fundamental investigação adicional para compreender o seu papel específico no contexto da COVID-19 materna e da interface materno-fetal, bem como a sua travessia para os compartimentos fetais. Essas observações podem refletir uma interface materno-fetal

complexa e persistente, mesmo durante a fase convalescente da COVID-19, sugerindo que os efeitos da infecção materna podem se estender além da fase aguda, potencialmente influenciando os resultados de saúde neonatal e infantil. Alguns relatos mostraram que infecções virais maternas, como gripe e citomegalovírus, podem levar a alterações persistentes nos perfis de citocinas fetais, com potenciais consequências de longo prazo para a função imunológica e suscetibilidade a doenças (98). Além disso, esse tipo de transferência de imunidade, chamada de imunidade protetora, refere-se à indução gradual do sistema imunológico fetal para o desenvolvimento da memória adaptativa *in utero*, e há evidências de que a inflamação fetal também pode ser benéfica para a indução imunológica (92).

A análise comparativa de mediadores inflamatórios na díade mãe-recém-nascido demonstrou que certos mediadores, como PDGF e G-CSF, estavam marcadamente elevados no sangue do cordão umbilical em relação ao soro materno, especialmente durante a convalescença, com *fold changes* de até 15,7x. Esse padrão diferencial entre soro materno e sangue do cordão umbilical sugere uma resposta imunológica distinta no ambiente fetal em comparação com a circulação materna. A análise de rede integrativa revelou ainda uma conectividade de vizinhança aumentada entre os mediadores inflamatórios em ambos os microambientes, particularmente no contexto da COVID-19 convalescente tardia. Tem sido postulado que as redes de resposta imunológica podem integrar vias pelo engajamento de três tipos de interações, incluindo cooperação, complementação e compensação (98). Essas interações são relevantes para garantir a redundância das vias de mediadores inflamatórios que asseguram a robustez do sistema imunológico. Nessa linha, no presente estudo, exploramos o conceito de redundância e robustez do sistema imunológico usando o conceito de redes integrativas, montadas de acordo com o número de correlações entre mediadores inflamatórios do soro materno e do sangue do cordão umbilical que podem ser transpostas para os princípios de cooperação, complementação e compensação entre as propriedades funcionais dos mediadores inflamatórios. A análise das interações de mediadores inflamatórios é relevante para uma melhor compreensão das alterações imunológicas associadas à infecção por SARS-CoV-2 durante distintas fases gestacionais. Nossos dados demonstraram que mediadores inflamatórios solúveis em pares mãe-recém-nascido mostraram um aumento da conectividade de vizinhança em ambos os microambientes, bem como em sua interação da COVID-19 aguda para a convalescente tardia. Acreditamos que uma interpretação biológica razoável para esses achados é que a infecção por SARS-CoV-2 adquirida no 1º trimestre de gravidez levou a uma redundância e

robustez aumentadas das interações imunológicas na díade mãe/recém-nascido. À medida que o sistema imunológico ganha redundância, o estabelecimento de mecanismos compensatórios adicionais é observado. Nesse sentido, a análise das correlações entre mediadores inflamatórios e sua variação representa uma abordagem racional para caracterizar a resposta imunológica compartimentalizada nos microambientes do sangue do cordão umbilical e soro materno. Nossos achados abrem caminho para futuras investigações sobre o papel de mediadores inflamatórios específicos na modulação da imunidade neonatal e seu impacto no desenvolvimento infantil.

O presente estudo possui algumas limitações. Apesar do grande número de amostras pareadas mãe-recém-nascido analisadas nesta investigação exploratória, o desenho observacional descritivo com múltiplas comparações sem correções para comorbidades, manifestações clínicas, gravidade da doença ou outras variáveis confundidoras constituiu uma limitação do estudo. Como o presente estudo foi realizado durante a circulação das cepas B.1.1.28 e B.1.1.33 do SARS-CoV-2, a generalização de nossos achados para cenários epidemiológicos de outras variantes do SARS-CoV-2 é limitada, uma vez que distintas variantes de preocupação podem interferir na resposta imunológica. Outra limitação é que a presente investigação é um estudo de centro único. Além disso, não realizamos uma análise de acompanhamento prospectivo das crianças para monitorar seu perfil de resposta imunológica.

## 6. CONCLUSÃO

Este estudo pioneiro investigou a complexa interação imunológica entre mães com COVID-19 aguda e convalescente e seus recém-nascidos, revelando assinaturas imunológicas distintas no soro materno e no sangue do cordão umbilical. Nossos achados demonstraram perfis distintos no sangue do cordão umbilical em comparação com o soro materno, trazendo novas percepções sobre o impacto potencial da infecção materna por SARS-CoV-2 em diferentes fases gestacionais na saúde e desenvolvimento neonatal.

Embora a infecção aguda por SARS-CoV-2 na mãe induza uma resposta inflamatória sistêmica em ambos os compartimentos, a fase convalescente apresenta um padrão imunológico mais diferenciado no sangue do cordão umbilical, sugerindo um efeito de longo prazo no ambiente fetal. A elevação persistente de mediadores como CCL11, IFN- $\gamma$ , IL-1Ra e G-CSF no sangue do cordão umbilical, independentemente do estágio da COVID-19 materna, ressalta a importância da "indução *in utero*" e seu potencial para modular a imunidade neonatal a longo prazo. As diferenças marcantes nos níveis de mediadores como PDGF e G-CSF entre o soro materno e o sangue do cordão umbilical, especialmente durante a convalescença, reforçam a necessidade de avaliar o ambiente materno-fetal como compartimentos imunológicos distintos.

Embora este estudo forneça *insights* valiosos sobre a resposta imunológica materno-fetal à infecção por SARS-CoV-2, reconhecemos as limitações inerentes ao seu desenho observacional e à especificidade das variantes de SARS-CoV-2 circulantes durante a coleta de dados. Estudos futuros devem focar em análises longitudinais, com maior diversidade de amostras, para monitorar os efeitos de longo prazo da exposição materna ao SARS-CoV-2 na saúde infantil.

Em última análise, uma compreensão detalhada da interface imunológica materno-fetal em resposta à COVID-19 é crucial para desenvolver estratégias eficazes de prevenção e intervenção, visando proteger a saúde de mães e recém-nascidos durante e após a pandemia. Juntas, essas evidências sobre a *crosstalk* materno-fetal podem subsidiar a melhoria da prática clínica e das políticas de saúde pública para o manejo da exposição pré-natal à infecção por SARS-CoV-2.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Wang B, Hu X, Gao J, Cheng H, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020 Feb 20;382(8):727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
2. Organização Mundial da Saúde. Dados do Painel de Controle do Coronavírus da OMS (COVID-19). Genebra: Organização Mundial da Saúde; 2023. Disponível em: [🌐 covid19.who.int](https://covid19.who.int)
3. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, Haagmans PE, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*. 2020 Apr;5(4):536-544. doi: 10.1038/s41564-020-0695-z.
4. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020 Feb 29;395(10224):565-574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
5. Zhou J, Chu H, Li C, Wong BH, Cheng ZS, Poon VK, et al. Active replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus and aberrant induction of inflammatory cytokines and chemokines in human macrophages: implications for pathogenesis. *J Infect Dis*. 2014 May 1;209(9):1331-1342. doi: 10.1093/infdis/jit504.
6. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2019 Mar;17(3):181-192. doi: 10.1038/s41579-018-0118-9.
7. Mariano G, Farthing RJ, Lale-Farjat SLM, Bergeron JRC. Structural Characterization of SARS-CoV-2: Where We Are, and Where We Need to Be. *Front Mol Biosci*. 2020 Dec 17;7:605236. doi: 10.3389/fmolb.2020.605236.
8. Kostoulas P, Eusebi P, Hartnack S. Diagnostic accuracy estimates for COVID-19 real-time polymerase chain reaction and lateral flow immunoassay tests with Bayesian latent-class models. *Am J Epidemiol*. 2021 Aug 1;190(8):1689-1695. doi: 10.1093/aje/kwab066.
9. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
10. Brandt JS, Hill J, Reddy A, Schuster M, Patrick HS, Rosen T, et al. Epidemiology of coronavirus disease 2019 in pregnancy: risk factors and associations with adverse maternal and neonatal outcomes. *Am J Obstet*

- Gynecol. 2021 Apr;224(4):389.e1-389.e9. doi: 10.1016/j.ajog.2020.10.035.
11. Metz TD, Clifton RG, Hughes BL, Sandoval GJ, Grobman WA, Saade GR, et al. Association of SARS-CoV-2 Infection With Serious Maternal Morbidity and Mortality From Obstetric Complications. *JAMA*. 2022 Feb 22;327(8):748. doi: 10.1001/jama.2022.0007.
  12. Yao X-H, He Z-C, Li T-Y, Zhang H-R, Wang Y, Mou H, et al. Pathological evidence for residual SARS-CoV-2 in pulmonary tissues of a ready-for-discharge patient. *Cell Res*. 2020 Jun 28;30(6):541–3. doi: 10.1038/s41422-020-0318-5.
  13. Gusev E, Sarapultsev A, Solomatina L, Chereshnev V. SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 2;23(3):1716. doi: 10.3390/ijms23031716.
  14. Darif D, Hammi I, Kihel A, El Idrissi Saik I, Guessous F, Akarid K. The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: What goes wrong? *Microb Pathog*. 2021 Apr;153:104799. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104799.
  15. Merad M, Blish CA, Sallusto F, Iwasaki A. The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science*. 2022 Mar 11;375(6585):1122–7. doi: 10.1126/science.abm8108.
  16. Hussman JP. Cellular and Molecular Pathways of COVID-19 and Potential Points of Therapeutic Intervention. *Front Pharmacol*. 2020 Jul 29;11:1169. doi: 10.3389/fphar.2020.01169.
  17. Hirano T, Murakami M. COVID-19: A New Virus, but a Familiar Receptor and Cytokine Release Syndrome. *Immunity*. 2020 May;52(5):731–3. doi: 10.1016/j.immuni.2020.04.007.
  18. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol*. 2021 Jan 30;93(1):250–6. doi: 10.1002/jmv.26232.
  19. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020 Apr 16;181(2):271-280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
  20. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *J Infect*. 2020 Jun;80(6):607–13. doi: 10.1016/j.jinf.2020.03.009.
  21. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*. 2020 Jun;20(6):363–74. doi: 10.1038/s41577-020-0311-8.
  22. Mistry P, Barmania F, Mellet J, Peta K, Strydom A, Viljoen IM, et al. SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Front Immunol*. 2022 Jan

- 3;12:809244. doi: 10.3389/fimmu.2021.809244.
23. Burki T. Understanding variants of SARS-CoV-2. *Lancet*. 2021 Feb 6;397(10273):462. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00298-1.
  24. Grint DJ, Wing K, Williamson E, McDonald HI, Bhaskaran K, Evans D, et al. Case fatality risk of the SARS-CoV-2 variant of concern B.1.1.7 in England, 16 November to 5 February. *Eurosurveillance*. 2021 Mar 18;26(11):2100256. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.11.2100256.
  25. Abdool Karim SS, de Oliveira T. New SARS-CoV-2 Variants — Clinical, Public Health, and Vaccine Implications. *N Engl J Med*. 2021 May 13;384(19):1866–8. doi: 10.1056/NEJMc2100362.
  26. Freitas ARR, Beckedorff OA, Cavalcanti LP de G, Siqueira AM, Castro DB de, Costa CF da, et al. The emergence of novel SARS-CoV-2 variant P.1 in Amazonas (Brazil) was temporally associated with a change in the age and sex profile of COVID-19 mortality: A population based ecological study. *Lancet Reg Health Am*. 2021 Sep;1:100021. doi: 10.1016/j.lana.2021.100021.
  27. Campbell F, Archer B, Laurenson-Schafer H, Jinnai Y, Konings F, Batra N, et al. Increased transmissibility and global spread of SARS-CoV-2 variants of concern as at June 2021. *Eurosurveillance*. 2021 Jun 17;26(24):2100509. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100509.
  28. 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. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104831.
  29. Callaway E, Ledford H. How bad is Omicron? What scientists know so far. *Nature*. 2021 Dec 9;600(7888):197–9. doi: 10.1038/d41586-021-03614-z.
  30. Regan AK, Arah OA, Fell DB, Sullivan SG. SARS-CoV-2 Infection During Pregnancy and Associated Perinatal Health Outcomes: A National US Cohort Study. *J Infect Dis*. 2022 Mar 2;225(5):759-767. doi: 10.1093/infdis/jiab626.
  31. Shafizadeh Z, Akbarian-Rad Z, Nasiri-Amiri F, Javanian M, Nouri HR, Rajabnia M, Geraili Z, Barat S, Roudbari JA. The relationship between maternal COVID-19 with fetal and neonatal complications and intrauterine vertical transmission: A cohort study on pregnant women. *PLoS One*. 2025 Jul 16;20(7):e0326450. doi: 10.1371/journal.pone.0326450.
  32. McClymont E, Albert AY, Alton GD, Boucoiran I, Castillo E, Fell DB, et al. Association of SARS-coV-2 infection during pregnancy with maternal and perinatal outcomes. *JAMA*. 2022 May 24;327(20):1983–91. doi: 10.1001/jama.2022.5906.

33. Norman M, Navér L, Söderling J, Akre O, Cnattingius S, Edstedt Bonamy AK. Association of Maternal SARS-CoV-2 Infection in Pregnancy With Neonatal Outcomes. *JAMA*. 2021 May 25;325(20):2076–2086. doi: 10.1001/jama.2021.5775.
34. Sturrock S, Ali S, Gale C, Battersby C, Le Doare K. Neonatal outcomes and indirect consequences following maternal SARS-CoV-2 infection in pregnancy: a systematic review. *BMJ Open*. 2023 Mar 15;13(3):e063052. doi: 10.1136/bmjopen-2022-063052.
35. Boettcher LB, Metz TD. Maternal and neonatal outcomes following SARS-CoV-2 infection. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2023 Feb;28(1):101428. doi: 10.1016/j.siny.2023.101428.
36. Fajardo-Martinez V, Ferreira F, Fuller T, Cambou MC, Kerin T, Paiola S, Mok T, Rao R, Mohole J, Paravastu R, Zhang D, Marschik P, Iyer S, Kesavan K, Borges Lopes MDC, Britto JAA, Moreira ME, Brasil P, Nielsen-Saines K. Neurodevelopmental delay in children exposed to maternal SARS-CoV-2 in-utero. *Sci Rep*. 2024 May 24;14(1):11851. doi: 10.1038/s41598-024-61918-2.
37. Motta F, Canellas-de-Castro ME, Fernandes GM, Sasaki LMP, de Araújo Júnior DA, Zaconeta AM, da Silva ÂP, Gomes CM, Albuquerque CP, Costa-Rocha IA, Santos JAT, Jesus JAL, Costa KN, Espindola LS, Mota LMHD, Lauand L, Castro LCG, Xavier MAP, Coelho-Dos-Reis JGA, Nóbrega OT, Silva PCD, Nery RR, Santos WT, Tristão RM, Alves CO, Martins-Filho OA, Soares AASM. Neuropsychomotor Development of Children Exposed to SARS-CoV-2 in Utero During COVID-19 Pandemic. *Biomedicines*. 2025 Sep 12;13(9):2256. doi: 10.3390/biomedicines13092256.
38. Celik IH, Tanacan A, Canpolat FE. Neonatal outcomes of maternal prenatal coronavirus infection. *Pediatr Res*. 2024 Jan;95(2):445-455. doi: 10.1038/s41390-023-02950-2.
39. Brum AC, Vain NE. Impact of perinatal COVID on fetal and neonatal brain and neurodevelopmental outcomes. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2023 Apr;28(2):101427. doi: 10.1016/j.siny.2023.101427.
40. Li Y, Lu Y, Tang H, Spector EA, Wen X, Germinal K, Milfort A, Guo Y, Bost S, Shenkman E, Bian J, Hu H, Guo J. Neonatal outcomes among pregnant women with COVID-19: a systematic scoping review and meta-analysis. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2025 Sep 25;25(1):948. doi: 10.1186/s12884-025-08090-1.
41. Shuffrey LC, Firestein MR, Kyle MH, Buthmann EP, Smith EM, Gyamfi-Bannerman C, et al. Association of Birth During the COVID-19

- Pandemic With Neurodevelopmental Status at 6 Months in Infants With and Without In Utero Exposure to Maternal SARS-CoV-2 Infection. *JAMA Pediatr.* 2022 Jun 1;176(6):e215563. doi:10.1001/jamapediatrics.2021.5563.
42. Gross RS, Thaweethai T, Salisbury AL, Kim S, Chen J, Patel MM, et al. Characterizing Long COVID Symptoms During Early Childhood. *JAMA Pediatr.* 2025 Jul 1;179(7):781–792. doi:10.1001/jamapediatrics.2025.1066.
43. Oxley TJ, Mocco J, Majidi S, Kellner CP, Shoirah H, Singh IP, et al. Large-vessel stroke as a presenting feature of Covid-19 in the young. *N Engl J Med.* 2020 Apr 16;382(16):e60. doi: 10.1056/NEJMc2009787.
44. Volkow ND, Gordon JA, Koob GF, et al. The healthy brain and child development study-shedding light on opioid exposure, COVID-19, and health disparities. *JAMA Psychiatry.* 2021 May 1;78(5):471-472. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2021.0069.
45. Lins B. Maternal immune activation as a risk factor for psychiatric illness in the context of the SARS-CoV-2 pandemic. *Brain Behav Immun Health.* 2021 Apr;16:100297. doi: 10.1016/j.bbih.2021.100297.
46. López-Díaz Á, Lázaro-Pérez D, Cuesta-Vargas A. COVID-19 infection during pregnancy and risk of neurodevelopmental disorders in offspring: time for collaborative research. *Biol Psychiatry.* 2021 Jan 1;89(1):e29-e30. doi: 10.1016/j.biopsych.2020.08.016.
47. Sakurada B, Sugiura Y, Takatsuka S. Neurodevelopmental disorders induced by maternal immune activation: toward a prevention strategy in the era of the COVID-19 pandemic. *Psychiatry Int.* 2020;1(1):24-26. doi: 10.1007/s43714-020-00004-9.
48. Figueiredo CP, Mendes-Silva D, Viana AL, et al. SARS-CoV-2-associated cytokine storm during pregnancy as a possible risk factor for neuropsychiatric disorder development in post-pandemic infants. *Neuropharmacology.* 2021 Dec 1;201:108841. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108841.
49. Okechukwu C. Inflammatory cytokines induced by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection during pregnancy may alter fetal brain development predisposing the offspring to neurodevelopmental disorders. *Nigerian J Exp Clin Biosci.* 2021;9(1):58-61. doi: 10.54881/njecb.2021.9.1.1.
50. Centers for Disease Control and Prevention. Data on COVID-19 During Pregnancy: Severity Of Maternal Illness. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2021. Disponível em: [CDC !\[\]\(a3dd5c856f597625dc3dc0bddfbe8467\_img.jpg\) www.cdc.gov](https://www.cdc.gov)
51. 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 Jun 4;382(23):2163-2164.

- doi: 10.1056/NEJMc2007916.
52. Shook LL, Gaw SL, Edlow AG, et al. Countering COVID-19 vaccine hesitancy in pregnancy: the "4 Cs". *Am J Perinatol*. 2021 Oct 19. doi: 10.1055/a-1673-5546.
  53. Shook LL, Gaw SL, Edlow AG, et al. COVID-19 vaccination in pregnancy and lactation: current research and gaps in understanding. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Oct 14;11:735394. doi: 10.3389/fcimb.2021.735394.
  54. Edlow AG, Li JZ, Collier AY, et al. Neurodevelopmental outcomes at one year in offspring of mothers who test positive for SARS-CoV-2 during pregnancy. *medRxiv*. 2021 Dec 16. doi: 10.1101/2021.12.15.21267849.
  55. Racicot K, Mor G. Risks associated with viral infections during pregnancy. *J Clin Invest*. 2017 May 1;127(5):1591-1599. doi: 10.1172/JCI92015.
  56. Silasi M, Cardenas I, Kwon JY, et al. Viral infections during pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2015 Mar;73(3):199-213. doi: 10.1111/aji.12355.
  57. Granja MG, Martins-Filho OA, Mota LMHD, et al. SARS-CoV-2 infection in pregnant women: neuroimmune-endocrine changes at the maternal-fetal interface. *Neuroimmunomodulation*. 2021;28(1-2):1-21. doi: 10.1159/000518742.
  58. Beyrouiti R, Adams ME, Benjamin L, Cohen H, Farmer SF, Goh YY, et al. Characteristics of ischaemic stroke associated with COVID-19. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020 Apr;91(4):444-445. doi: 10.1136/jnnp-2020-323586.
  59. Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomed*. 2020 Mar 19;91(1):157-160. doi: 10.23750/abm.v91i1.9397.
  60. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Available from: [data.who.int](https://data.who.int)
  61. Abu Raya B, Giles ML, Sadarangani M. Vertical transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from the mother to the infant. *JAMA Pediatr*. 2020 Oct 1;174(10):1007-1008. doi: 10.1001/jamapediatrics.2020.2150.
  62. Khalil A, von Dadelszen P, Draycott T, Ugwumadu A, O'Brien P, Magee L. Change in the incidence of stillbirth and preterm delivery during the COVID-19 pandemic. *JAMA*. 2020 Aug 11;324(6):705-706. doi: 10.1001/jama.2020.12746.
  63. Galang RR, Newton SM, Woodworth KR, Griffin I, Oduyebo T, Sancken CL, et al. Risk factors for illness severity among pregnant women with confirmed severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection-surveillance for emerging threats to mothers and babies network, 22 state, local, and territorial health departments, 29 march 2020–5 march 2021. *Clin Infect Dis*. 2021 Nov 15;73(Suppl 3):S17-S23. doi: 10.1093/cid/ciab432.
  64. Wei SQ, Bilodeau-Bertrand M, Liu S, Auger N. The impact of COVID-19 on

- pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis. *CMAJ*. 2021 Apr 19;193(16):E540-E548. doi: 10.1503/cmaj.202604.
65. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol*. 2010 May;63(5):425-433. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x.
66. Song D, Prah M, Gaw SL, Narasimhan SR, Rai DS, Huang A, et al. Passive and active immunity in infants born to mothers with SARS-CoV-2 infection during pregnancy: prospective cohort study. *BMJ Open*. 2021 Nov 16;11(11):e053036. doi: 10.1136/bmjopen-2021-053036.
67. Dutta S, Sengupta P, Liew FF. Cytokine landscapes of pregnancy: mapping gestational immune phases. *Gynecol Obstet Clin Med*. 2024 Jan 18;4(1):e000011. doi: 10.1136/gocm-2024-000011.
68. Bernier E, Brien ME, Girard S. Pregnant individuals with uncomplicated pregnancies display pro-inflammatory immune changes when exposed to the COVID-19 pandemic. *Am J Reprod Immunol*. 2024 Jan;91(1):e13828. doi: 10.1111/aji.13828.
69. Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol*. 2000 Jul-Aug;47(2):87-103. doi: 10.1016/s0165-0378(00)00060-7.
70. Fernandes GM, Motta F, Sasaki LMP, Silva ÂPD, Miranda AM, 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 Nov 22;10(11):e26477. doi: 10.2196/26477.
71. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R, et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell*. 2020 May 28;181(5):1036-1045.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.026.
72. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020 Aug;584(7821):463–9. doi: 10.1038/s41586-020-2588-y.
73. Stephens DS, McElrath MJ. COVID-19 and the path to immunity. *JAMA*. 2020 Sep 29;324(12):1279–81. doi: 10.1001/jama.2020.16656.
74. Edlow AG, Li JZ, Collier AY, Atyeo C, James KE, Boatman AA, et al. Assessment of maternal and neonatal SARS-CoV-2 viral load, transplacental antibody transfer, and placental pathology in pregnancies during the COVID-19 pandemic. *JAMA Netw Open*. 2020 Nov 2;3(11):e2030455. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.30455.
75. Flannery DD, Gouma S, Dhudasia MB, Mukhopadhyay S, Pfeifer MR, Woodford EC, et al. SARS-CoV-2 seroprevalence among parturient women in

- Philadelphia. *Sci Immunol*. 2020 Dec 29;5(54):eabd5709. doi: 10.1126/sciimmunol.abd5709.
76. Atyeo C, Pullen KM, Bordt EA, Fischinger S, Burke J, Mitchell A, et al. Compromised SARS-CoV-2-specific placental antibody transfer. *Cell*. 2021 Jan 21;184(2):628-642.e10. doi: 10.1016/j.cell.2020.12.027.
77. 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 (N Y)*. 2021 Jun 11;2(6):591–610.e10. doi: 10.1016/j.medj.2021.04.016.
78. Caparros-Gonzalez RA, Pérez-Morente MA, Hueso-Montoro C, Álvarez-Serrano MA, de la Torre-Luque A. Congenital, intrapartum and postnatal maternal-fetal-neonatal SARS-CoV-2 infections: A narrative review. *Nutrients*. 2020 Nov 20;12(11):3570. doi: 10.3390/nu12113570.
79. de Vries LS. Viral infections and the neonatal brain. *Semin Pediatr Neurol*. 2019 Aug;32:100769. doi: 10.1016/j.spen.2019.08.005.
80. Auriti C, De Rose DU, Santisi A, Martini L, Piersigilli F, Bersani I, et al. Pregnancy and viral infections: Mechanisms of fetal damage, diagnosis and prevention of neonatal adverse outcomes from cytomegalovirus to SARS-CoV-2 and Zika virus. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2021 Nov;1867(11):166198. doi: 10.1016/j.bbadis.2021.166198.
81. Yates EF, Mulkey SB. Viral infections in pregnancy and impact on offspring neurodevelopment: mechanisms and lessons learned. *Pediatr Res*. 2024 May;96(1):64–72. doi: 10.1038/s41390-024-03145-z.
82. Al Beloushi M, Saleh H, Ahmed B, Konje JC. Congenital and perinatal viral infections: consequences for the mother and fetus. *Viruses*. 2024 Nov 15;16(11):1698. doi: 10.3390/v16111698.
83. Taglauer ES, Dhole Y, Boateng J, Snyder-Cappione J, Parker SE, Clarke K, et al. Evaluation of maternal-infant dyad inflammatory cytokines in pregnancies affected by maternal SARS-CoV-2 infection in early and late gestation. *J Perinatol*. 2022 Oct;42(10):1319–27. doi: 10.1038/s41372-022-01391-9.
84. Jain S, Allen IE, Song D, Piao X. Cytokine responses to SARS-COV2 infection in mother-infant dyads: a systematic review and meta-analysis. *Front Pediatr*. 2023 Dec 11;11:1277697. doi: 10.3389/fped.2023.1277697.
85. Rad HS, Röhl J, Stylianou N, Allenby MC, Bazaz SR, Warkiani ME, et al. The effects of COVID-19 on the placenta during pregnancy. *Front Immunol*. 2021 Oct 25;12:743022. doi: 10.3389/fimmu.2021.743022.
86. González-Mesa E, García-Fuentes E, Carvia-Pontiassec R, Lavado-Fernández

- Al, Cuenca-Marín C, Suárez-Arana M, et al. Transmitted fetal immune response in cases of SARS-CoV-2 infections during pregnancy. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Jan 19;12(2):245. doi: 10.3390/diagnostics12020245.
87. Sasaki LMP, Canellas-de-Castro ME, Fernandes GM, Motta F, Araújo Júnior DA, Schulte HL, et al. Systemic and cerebrospinal fluid immune mediators coordinate a dichotomic microenvironment in parturients with acute or convalescent phases of COVID-19. *Immunol Lett*. 2025 Jan 1;274:106979. doi: 10.1016/j.imlet.2025.106979.
88. Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nat Rev Immunol*. 2017 Aug;17(8):469–82. doi: 10.1038/nri.2017.64.
89. Gayen S, Urday P, Al-Kouatly HB, Solarin K, Chan JSY, Addya S, et al. COVID-19 infection during pregnancy induces differential gene expression in human cord blood cells from term neonates. *Front Pediatr*. 2022 Mar 15;10:834771. doi: 10.3389/fped.2022.834771.
90. Foo SS, Cambou MC, Mok T, Fajardo VM, Jung KL, Fuller T, et al. The systemic inflammatory landscape of COVID-19 in pregnancy: Extensive serum proteomic profiling of mother-infant dyads with in utero SARS-CoV-2. *Cell Rep Med*. 2021 Oct 19;2(10):100453. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100453.
91. Cardenas I, Means RE, Aldo P, Koga K, Lang SM, Booth CJ, et al. Viral infection of the placenta leads to fetal inflammation and sensitization to bacterial products predisposing to preterm labor. *J Immunol*. 2010 Jul 15;185(2):1248–57. doi: 10.4049/jimmunol.1000289.
92. Vidal MS Jr, Menon R. In utero priming of fetal immune activation: myths and mechanisms. *J Reprod Immunol*. 2023 Apr;157:103922. doi: 10.1016/j.jri.2023.103922.
93. Kosińska-Kaczyńska K, Rebizant B, Czeszko-Paprocka H, Bojdo A, Przybylski M, Chaberek K, et al. Maternal SARS-CoV-2 infection at delivery increases IL-6 concentration in umbilical cord blood. *J Clin Med*. 2023 Aug 29;12(17):5672. doi: 10.3390/jcm12175672.
94. Rosen DB, Murphy EA, Gejman RS, Capili A, Friedlander RL, Rand S, et al. Cytokine response over the course of COVID-19 infection in pregnant women. *Cytokine*. 2022 Jun;154:155894. doi: 10.1016/j.cyto.2022.155894.
95. Zhao Y, Qin L, Zhang P, Li K, Liang L, Sun J, et al. Longitudinal COVID-19 profiling associates IL-1RA and IL-10 with disease severity and RANTES with mild disease. *JCI Insight*. 2020 Oct 8;5(19):e139834. doi: 10.1172/jci.insight.139834.

96. Bailie KE, Irvine AE, Bridges JM, McClure BG. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in cord and maternal serum at delivery. *Pediatr Res.* 1994 Feb;35(2):164–8. doi: 10.1203/00006450-199402000-00007.
97. Hamilton SA, Tower CL, Jones RL. Identification of chemokines associated with the recruitment of decidual leukocytes in human labour: potential novel targets for preterm labour. *PLoS One.* 2013 Feb 21;8(2):e56946. doi: 10.1371/journal.pone.0056946.
98. Nish S, Medzhitov R. Host defense pathways: role of redundancy and compensation in infectious disease phenotypes. *Immunity.* 2011 May 27;34(5):629–36. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.009.
99. Pinheiro MB, Martins-Filho OA, Mota APL, Alpoim PN, Godoi LC, Silveira ACO, et al. Severe preeclampsia goes along with a cytokine network disturbance towards a systemic inflammatory state. *Cytokine.* 2013 Apr;62(1):165–73. doi: 10.1016/j.cyto.2013.01.018.

## 8. ANEXOS

### ANEXO 1 – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa

UNB - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE BRASÍLIA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

**Pesquisador:** GERALDO MAGELA FERNANDES

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 32359620.0.0000.5558

**Instituição Proponente:** EMPRESA BRASILEIRA DE SERVICOS HOSPITALARES - EBSERH

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.055.854

##### Apresentação do Projeto:

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

##### Objetivo da Pesquisa:

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

i. Avaliar o efeito da COVID-19 nos indicadores de morbidade e mortalidade materna; ii. Avaliar o efeito da COVID-19 nos indicadores de morbidade obstétrica: aborto, malformação fetal, distúrbios do crescimento fetal, parto prematuro e patologias obstétricas, como pré-eclâmpsia.iii.

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

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

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

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



Continuação do Parecer: 4.055.854

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

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

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

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

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

Benefícios:

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

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

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

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

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



Continuação do Parecer: 4.055.854

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

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

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

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

**Recomendações:**

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

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

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

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

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

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

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

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



Continuação do Parecer: 4.055.854

observações elencadas.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_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	Aceito

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

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.910-900

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3107-1918

**E-mail:** cepfm@unb.br

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



Continuação do Parecer: 4.055.854

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

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BRASILIA, 28 de Maio de 2020

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

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

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

1) Fernandes GM, Motta F, Sasaki LMP, Silva ÂPD, Miranda AM, Carvalho AO, Gomides APM, Soares AASM, Santos ACMD Jr, Alves CO, Gomes CM, Siracusa CC, Araújo DA Jr, Mendonça-Silva DL, Jesus JAL, Costa KN, **Castro MEC**, Kurizky PS, França PS, Tristão R, Pereira YR, Castro LCG, Zaconeta AM, Albuquerque CP, Mota LMHD. Pregnancy Outcomes and Child Development Effects of SARS-CoV-2 Infection (PROUDEST Trial): Protocol for a Multicenter, Prospective Cohort Study. *JMIR Res Protoc.* 2021 Apr 20;10(4):e26477. doi: 10.2196/26477.

2) Alves de Araujo Junior D, Motta F, Fernandes GM, **Castro MEC**, Sasaki LMP, Luna LP, Rodrigues TS, Kurizky PS, Soares AASM, Nobrega OT, Espindola LS, Zaconeta AM, Gomes CM, Martins-Filho OA, de Albuquerque CP, da Mota LMH. Neuroimaging assessment of pediatric cerebral changes associated with SARS-CoV-2 infection during pregnancy. *Front Pediatr.* 2023 May 24;11:1194114. doi: 10.3389/fped.2023.1194114.

3) Fernandes GM, Sasaki LMP, Jardim-Santos GP, Schulte HL, Motta F, da Silva ÂP, de Carvalho AO, Pereira YR, Alves CO, de Araújo Júnior DA, Mendonça-Silva DL, Costa KN, **de Castro MEC**, Lauand L, Nery RR, Tristão R, Kurizky PS, Nóbrega OT, Espindola LS, de Castro LCG, Alpoim PN, Godoi LC, Dusse LMSA, Coelho-Dos-Reis JGA, do Amaral LR, Gomes MS, Bertarini PLL, Brito-de-Sousa JP, da Costa-Rocha IA, Campi-Azevedo AC, Peruhype-Magalhães V, Teixeira-Carvalho A, Zaconeta AM, Soares AASM, Valim V, Gomes CM, de Albuquerque CP, Martins-Filho OA, da Mota LMH. Panoramic snapshot of serum soluble mediator interplay in pregnant women with convalescent COVID-19: an exploratory study. *Front Immunol.* 2023 Apr 12;14:1176898. doi: 10.3389/fimmu.2023.1176898.

4) Zica ACO, Novanta GR, Fernandes GM, **Castro MEC**, Motta F, Serra LSM, Sampaio ALL. Avaliação audiológica em bebês nascidos de mães que tiveram covid-19 no período gestacional. *Arq. ciências saúde UNIPAR* ; 27(10)2023. Article em Pt | LILACS | ID: biblio-1513182

5) Sasaki LMP, **Canellas-de-Castro ME**, Fernandes GM, Motta F, Araújo Júnior DA, Schulte HL, Jardim-Santos GP, Silva ÂP, Carvalho AO, Pereira YR, Siracusa CC, Rabelo IP, Santos Junior ACM, Alves CO, Lauand L, Nery RR, Mendonça-Silva DL, Tristão R, Jesus JAL, Costa KN, Castro LCG, Kurizky PS, Nóbrega OT, Espindola LS, Coelho-Dos-Reis JGA, Brito-de-Sousa JP, Costa-Rocha IA, Campi-Azevedo AC, Peruhype-Magalhães V, Teixeira-Carvalho A, Gomes CM, Albuquerque CP, Soares AASM, Zaconeta AM, Martins-Filho OA, Mota LMH. Systemic and cerebrospinal fluid immune mediators coordinate a dichotomic microenvironment in parturients with acute or convalescent phases of COVID-19. *Immunol Lett.* 2025 Aug;274:106979. doi: 10.1016/j.imlet.2025.106979.

6) Sasaki LP, Fernandes GM, Silva ÂPD, Pereira YR, Carvalho AO, Motta F, Junior DAA, **Canellas de Castro ME**, Jardim-Santos GP, Schulte HL, Siracusa CC, Rabelo IP, Monteiro PS, Zucchi FCR, Santos Junior ACMD, Costa-Rocha IA, Coelho-Dos-Reis JGA, Kurizky PS, Tristão R, Silva DLMD, Nóbrega OT, Soares AASM, Albuquerque CP, Gomes CM, Espindola LS, Martins-Filho OA, Zaconeta AM, Mota LMHD. Clinical characteristic and outcomes of pregnant women with COVID-19: The PROUDEST prospective cohort study. *PLoS One*. 2025 Jul 3;20(7):e0327174. doi: 10.1371/journal.pone.0327174.

7) Motta F, **Canellas-de-Castro ME**, Fernandes GM, Sasaki LMP, de Araújo Júnior DA, Zaconeta AM, da Silva ÂP, Gomes CM, Albuquerque CP, Costa-Rocha IA, Santos JAT, Jesus JAL, Costa KN, Espindola LS, Mota LMHD, Lauand L, Castro LCG, Xavier MAP, Coelho-Dos-Reis JGA, Nóbrega OT, Silva PCD, Nery RR, Santos WT, Tristão RM, Alves CO, Martins-Filho OA, Soares AASM; PROUDEST Study—Pregnancy Outcomes and Child Development Effects of SARS-CoV-2 Infection. *Neuropsychomotor Development of Children Exposed to SARS-CoV-2 in Utero During COVID-19 Pandemic*. *Biomedicines*. 2025 Sep 12;13(9):2256. doi: 10.3390/biomedicines13092256.

## 9. APÊNDICES

### APÊNDICE 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

#### 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 SAKI, 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 faz 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 garantimos que todos os dados serão tratados em segredo. A coleta de sangue para exames laboratoriais será realizada em uma veia do seu braço, com agulha e seringa esterilizadas, mas pode haver o risco de equimose (mancha roxa) ou sangramento local. Para reduzir esse risco, a coleta será realizada por uma pessoa com experiência. Além do sangue, a placenta e o sangue do cordão umbilical também serão encaminhados para estudos no laboratório. Caso você ou seu bebê precisem fazer uma anestesia ou punção na coluna por outro motivo, o líquido também será estudado. No caso da criança ela será submetida a uma ressonância magnética de crânio ainda na maternidade, o exame é indolor, será realizado com a criança dormindo, não será realizado se for necessária sedação. Não serão solicitados exames de sangue da criança que forem diferentes da rotina clínica habitual, exceto para pesquisa da presença do corona vírus 19 ou anticorpos anti-corona vírus 19 no sangue. A criança também terá risco de hematoma (mancha roxa) e sangramento no local da coleta que é habitualmente no dorso da mão. Para diminuir estes eventos a coleta desta amostra de sangue será feita junto com coletas de sangue que já seriam necessárias, como o teste do pezinho. Caso você ou a criança venha a apresentar as alterações relacionadas à coleta de sangue, você deverá fazer compressas de água quente em casa e se não melhorar, deve procurar o responsável por esta pesquisa no hospital ou através do telefone listado acima (pode fazer ligações a cobrar).

Rubrica Pesquisadores \_\_\_\_\_

Rubrica Participante \_\_\_\_\_

## APÊNDICE 2 – Planilha de Dados do Estudo



**PROUDEST**

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



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



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

Artigo publicado em *Frontiers in Immunology* - FI (2025): 3.8 - Qualis A1



### OPEN ACCESS

EDITED BY  
Stella Liang,  
MIT University, Australia

REVIEWED BY  
Soumya Panigrahi,  
Case Western Reserve University,  
United States  
Olukemi Amodu,  
University of Ibadan, Nigeria

\*CORRESPONDENCE  
Maria Eduarda Canellas-de-Castro  
[✉ maria.castro@unb.br](mailto:maria.castro@unb.br)  
Olindo Assis Martins-Filho  
[✉ olindo.filho@fiocruz.br](mailto:olindo.filho@fiocruz.br)

†These authors have contributed equally to this work

‡These authors share senior authorship

RECEIVED 05 April 2025

ACCEPTED 18 June 2025

PUBLISHED 31 July 2025

### CITATION

Canellas-de-Castro ME, Sasaki LMP, Fernandes GM, Motta F, Alves de Araújo Júnior D, Schulte HL, Silva AP, Alves CO, Tristão RM, Jesus JAL, Costa KN, Castro LCG, Nóbrega OT, Espindola LS, Coelho-dos-Reis JGA, Brito-de-Sousa JP, Costa-Rocha IA, Miranda VHS, Campi-Azevedo AC, Peruhype-Magalhães V, Teixeira-Carvalho A, Gomes CM, Zaconeta ACM, Albuquerque CP, Mota LMH, Martins-Filho OA and Soares AASM (2025) The dialog between mother and newborn: insights from immune mediator crosstalk elicited by antenatal SARS-COV-2 exposure. *Front. Immunol.* 16:1606582. doi: 10.3389/fimmu.2025.1606582

### COPYRIGHT

© 2025 Canellas-de-Castro, Sasaki, Fernandes, Motta, Alves de Araújo Júnior, Schulte, Silva, Alves, Tristão, Jesus, Costa, Castro, Nóbrega, Espindola, Coelho-dos-Reis, Brito-de-Sousa, Costa-Rocha, Miranda, Campi-Azevedo, Peruhype-Magalhães, Teixeira-Carvalho, Gomes, Zaconeta, Albuquerque, Mota, Martins-Filho and Soares. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# The dialog between mother and newborn: insights from immune mediator crosstalk elicited by antenatal SARS-COV-2 exposure

Maria Eduarda Canellas-de-Castro<sup>1,2,3\*†</sup>,  
Lizandra Moura Paravidine Sasaki<sup>1,2†</sup>,  
Geraldo Magela Fernandes<sup>1,3,4</sup>, Felipe Motta<sup>1</sup>,  
David Alves de Araújo Júnior<sup>1</sup>, Heidi Luise Schulte<sup>1</sup>,  
Ângelo Pereira da Silva<sup>2</sup>, Caroline de Oliveira Alves<sup>3</sup>,  
Rosana Maria Tristão<sup>3</sup>, José Alfredo Lacerda de Jesus<sup>3</sup>,  
Karina Nascimento Costa<sup>3</sup>, Luiz Claudio Gonçalves de Castro<sup>1,3</sup>,  
Otávio de Toledo Nóbrega<sup>1</sup>, Laila Salmen Espindola<sup>1</sup>,  
Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis<sup>5</sup>,  
Joaquim Pedro Brito-de-Sousa<sup>6</sup>, Ismael Artur da Costa-Rocha<sup>6</sup>,  
Vitor Hugo Simões Miranda<sup>6</sup>, Ana Carolina Campi-Azevedo<sup>6</sup>,  
Vanessa Peruhype-Magalhães<sup>6</sup>, Andréa Teixeira-Carvalho<sup>6</sup>,  
Ciro Martins Gomes<sup>1,3,7</sup>, Alberto Carlos Moreno Zaconeta<sup>3</sup>,  
Cleandro Pires de Albuquerque<sup>1,2</sup>,  
Lícia Maria Henrique da Mota<sup>1,2,7</sup>, Olindo Assis Martins-Filho<sup>6\*‡</sup>  
and Alexandre Anderson de Sousa Munhoz Soares<sup>1,3‡</sup>

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

<sup>2</sup>Hospital Universitário de Brasília, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Brazil, <sup>3</sup>Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Brazil, <sup>4</sup>Neonatologia do Hospital Regional de Sobradinho - Secretaria de Saúde do Distrito Federal (SES/DF), Brasília, Brazil, <sup>5</sup>Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, <sup>6</sup>Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Minas), Belo Horizonte, Brazil, <sup>7</sup>Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Brazil

**Goal:** The present study intended to evaluate whether the profile of soluble immune mediators observed in cord blood samples resembles the pattern identified for mother serum samples.

**Methods:** For this purpose, parallel analysis of chemokines, cytokines, and growth factors was carried out in mother–newborn paired samples from acute and convalescent COVID-19 subgroups (Early, Intermediate, and Late) as well as healthy controls (HC).

**Results:** Data demonstrated that increased levels of CCL11, IFN- $\gamma$ , IL1-Ra, and G-CSF were observed in cord blood samples from most COVID-19 subgroups, with fold change magnitude from 1.6x to 8.2x as compared with HC. Comparative analysis of mother–newborn pairs demonstrated that several immune mediators (CCL11, CCL4, IFN- $\gamma$ , PDGF, and G-CSF) exhibited high increment magnitude in cord blood as compared with mother serum, reaching values up to 15.7x, mainly at convalescent COVID-19 infection. The signatures of soluble immune mediators revealed distinct waveforms for cord blood and mother serum, with a waning of immune mediators in

the latter, contrasting with the increasing set of molecules in the former from acute toward convalescent COVID-19. Integrative network analysis of immune mediators in mother–newborn pairs showed an increase of neighborhood connectivity both in microenvironments and in their interplay from acute toward late convalescent COVID-19. Our results support the hypothesis of the interplay between mother serum and cord blood microenvironment that may impact the fetus development.

**Conclusion:** Together, this evidence regarding the maternal–fetal crosstalk can ultimately subsidize the improvement of clinical practice and public health policies for management of prenatal exposure to SARS-CoV-2 infection.

#### KEYWORDS

COVID-19, maternal-fetal communication, immunological mediators, umbilical cord blood, maternal serum, prenatal exposure

## Introduction

Since declared a global pandemic in, 2020, the COVID-19 caused by the SARS-CoV-2 virus has significantly disrupted the global public health systems, representing unique challenges to vulnerable populations such as children, elderly, and pregnant women (1, 2).

Although the frequency of vertical transmission of SARS-CoV-2 is still debatable, previous studies have provided evidence that viral infection during pregnancy leads to several intrauterine and fetal effects of transplacental transfer of soluble immune mediators, including virus-specific antibodies and cytokines, in response to maternal infections, including SARS-CoV-2 (3–5).

Infections during pregnancy not only pose a risk to maternal health but also have potential implications for the fetal development (6–8). The maternal immune system transition during pregnancy from a pro-inflammatory state at pregnancy onset to an anti-inflammatory profile toward mid-late pregnancy stages can contribute to higher vulnerability to infections (9, 10). The dynamic interplay between pro-inflammatory and anti-inflammatory immunological responses that occur at distinct gestational phases is crucial to safeguarding maternal health and ensuring a successful gestation (11).

The study of immune mediator profiles in maternal and neonatal contexts has garnered significant attention due to its implications for understanding the prenatal immune environment and fetal outcomes elicited by maternal–fetal immune interaction (12). The immunological changes during pregnancy have significant implications for the soluble mediator networks at the maternal–fetal interface orchestrating the fetal development and newborn health (13). The SARS-CoV-2 infection during pregnancy poses increased risks of adverse maternal and newborn outcomes (14).

Understanding the dynamics between maternal infection and fetal immune responses is crucial for assessing how prenatal exposure to SARS-CoV-2 might affect children health. The comprehensive impact of SARS-CoV-2 infection on the maternal–fetal immune interface is still poorly understood. In this line, the present study aimed to investigate the changes of soluble immune mediators in mothers with acute or convalescent COVID-19 and their impact in the umbilical cord blood immunological microenvironment. Our findings provided evidence regarding the maternal–fetal crosstalk that can ultimately subsidize the improvement of clinical practice and public health policies for management of prenatal exposure to SARS-CoV-2 infection.

## Population, materials and methods

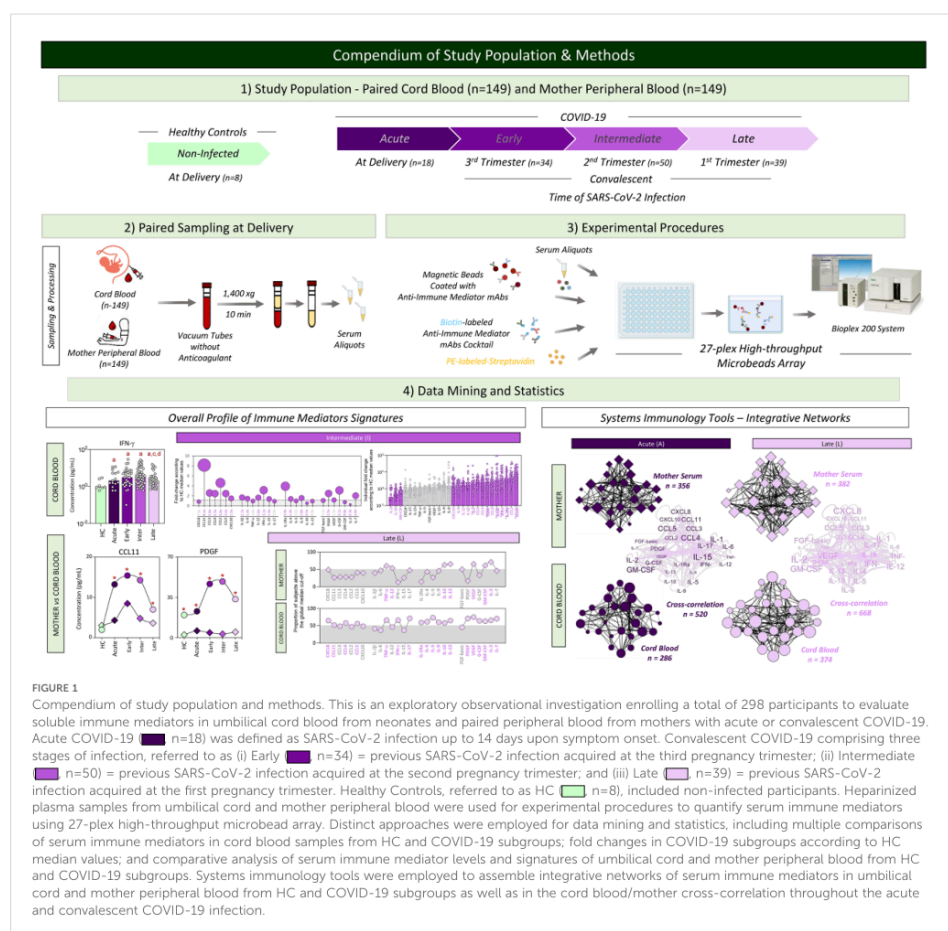
### Study population

This study is part of a larger prospective observational investigation, named PROUDEST Project (Pregnancy Outcomes and Child Development Effects of SARS-CoV-2 Infection Study) (15), carried out between July, 2020 and December, 2021 in the Federal District of Brazil, during the circulation of the B.1.1.28 and B.1.1.33 SARS-COV-2 variants. The study protocol was submitted and approved by the ethical committee at Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, and by the National Ethical Committee - CONEP (CAAE, 32359620.0.0000.5558) and registered at the Brazilian Clinical Trials Platform – REBEC (<https://ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-65qxs2>). The study has followed the ethical principles stated by the Helsinki Declaration for research involving human beings. A total of 149 parturients were invited to participate in this cross-sectional study, as a non-probability convenience sampling from two Public Reference

Centers for COVID-19 (Hospital Universitário de Brasília and Hospital Regional da Asa Norte, Brasília, DF, Brazil). All parturients, hereafter referred as “mother,” have provided a written informed consent prior inclusion in the study. The study population comprised paired samples of mother peripheral blood (n=149) and umbilical cord blood from their offsprings (n=149), collected at delivery. The study population was categorized into five groups, based on the mother status for COVID-19, referred to as (i) “Acute”—acute SARS-CoV-2 infection (up to 14 days of symptoms onset at delivery); (ii) “Early”—convalescent SARS-CoV-2 infection acquired at the third pregnancy trimester (28 to 41 weeks); (iii) “Intermediate”—convalescent SARS-CoV-2 infection acquired at the second pregnancy trimester (14 to 27 weeks); (iv) “Late”—convalescent SARS-CoV-2 infection acquired at the first pregnancy

trimester (4 to 13 weeks); and (v) “HC”—reference control group comprising non-infected healthy subjects with no clinical history of COVID-19, with negative serology for SARS-CoV-2 infection at delivery and no further diagnosis confirmed up to 30 days after delivery. The exclusion criteria are as follows: mothers vaccinated for COVID-19 before or during pregnancy, and mothers with confirmed diagnosis of toxoplasmosis, syphilis, rubella, herpes, Chagas disease, cytomegalovirus, Zika virus, or human immunodeficiency virus during pregnancy. In addition, smokers and excessive alcohol/illicit drug users were also excluded.

The COVID-19 diagnosis was based on at least one of the following criteria: (a) positive serology for anti-SARS-CoV-2 IgM or IgG by rapid test (Biomanguinhos, Fiocruz, Brazil); (b) positive SARS-CoV-2 quantitative real-time polymerase chain reaction



(qRT-PCR) on nasopharyngeal swab specimens; or (c) clinical symptoms suggestive of COVID-19 and a chest computed tomography compatible with COVID 19.

A compendium of the study population and methods is provided in [Figure 1](#).

## Serum and umbilical cord blood processing and storage

Peripheral blood samples from a total of 149 mothers were collected by venipuncture, at delivery, using vacuum tubes without anticoagulant (HC, n=8; Acute, n=18; Early, n=34; Intermediate, n=50; and Late, n=39). A total of 149 newborn venous cord blood paired samples (5 mL) were collected from the placental part, immediately after clamping using vacuum tubes without anticoagulant. Mother peripheral blood and cord blood specimens were submitted to centrifugation at 1,400 × g, 10 min, 4°C within 6 h after collection, aliquoted, and stored at -80°C until processing for quantification of soluble immune mediators.

## Quantification of soluble immune mediators

The levels of soluble immune mediators were quantified in cord blood and mother serum samples by high-throughput microbead multiplex assay (Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The concentrations of chemokines (CXCL8; CCL11; CCL3; CCL4; CCL2; CCL5; CXCL10), pro-inflammatory (IL-1β; 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) along with growth factors (FGF-basic; PDGF; VEGF; G-CSF; GM-CSF; IL-2; IL-7) were measured in parallel batches carried out by a trained technician using a Bio-Plex 200 System (Hercules, CA, USA) at the flow cytometry facility at Fiocruz Minas. The final concentrations of cord blood and mother serum soluble immune mediators were expressed in pg/mL, according to a five-parameter logistic curve fit regression of standard curves.

## Statistical analysis

Descriptive statistics were carried out using the GraphPad Prism 8.0.2 software (GraphPad Software, San Diego, USA). Data normality was assessed by the Shapiro-Wilk test. Considering the non-parametric distribution of all data sets, multiple comparative analysis among HC and COVID-19 subgroups (Acute, Early, Intermediate, and Late) was carried out by Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-test. The statistical analysis between cord blood and mother serum paired samples was performed by Wilcoxon test. In all cases, statistical significance was considered at  $p < 0.05$ .

The analysis of fold change magnitude in the soluble immune mediator was assessed as the ratio between serum and cord blood

concentrations in COVID-19 subgroups divided by the median levels observed in healthy controls. Additionally, the fold change magnitude in soluble immune mediators was calculated as the ratio of cord blood concentrations divided by the median values observed in mother serum. Fold changes  $\leq 0.8\times$  and  $\geq 1.5\times$  were included in the set of parameters considered for Venn diagram analysis (available at <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) to identify common and selective attributes among subgroups.

Soluble immune mediator signatures were further assessed to chemokines, cytokines, and growth factors from cord blood and mother serum. For this purpose, the original data of soluble mediators, from cord blood and mother serum samples, expressed as continuous variables (pg/mL) were converted into categorical data presented as proportion (%) of subjects with levels above the cut-off values defined as the overall global median concentration of each soluble mediator (CXCL8 = 3.1; CCL11 = 6.9; CCL3 = 0.8; CCL4 = 5.4; CCL2 = 10.2; CCL5 = 244.5; CXCL10 = 43.3; IL-1β=0.2; IL-6 = 0.6; TNF-α=4.0; IL-12 = 0.3; IFN-γ=1.5; IL-15 = 31.8; IL-17 = 1.5; IL-1Ra=98.4; IL-4 = 0.2; IL-5 = 8.3; IL-9 = 2.8; IL-10 = 2.2; IL-13 = 0.6; FGF-basic=1.7; PDGF=12.2; VEGF=8.0; G-CSF=4.1; GM-CSF=0.4; IL-2 = 0.8 and IL-7 = 2.5 pg/mL). The signatures of cord blood, and mother serum soluble immune mediators were analyzed considering the 50<sup>th</sup> percentile as a gray zone to identify the set of immune mediators with increased levels in each study group and further assemble as ascendant signature profiles.

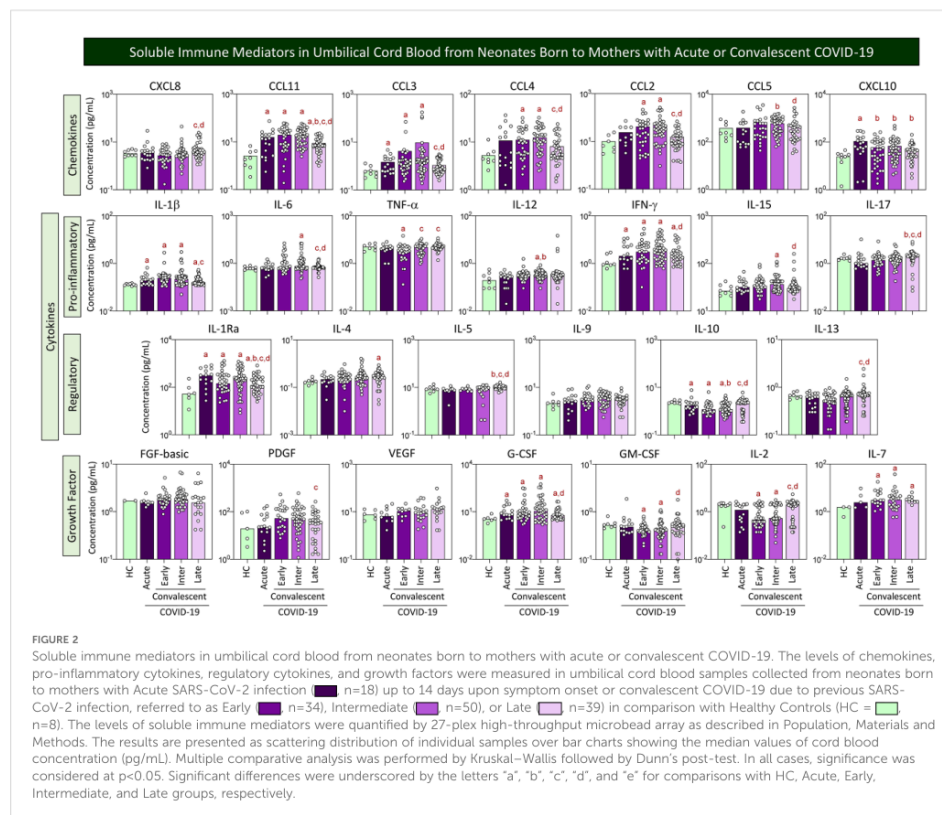
Integrative networks of cord blood and mother serum immune mediators were built based on Spearman rank correlation analysis. Cross-correlation between immune mediators from cord blood and mother serum compartments was assessed using the Spearman rank tests. Significant correlations ( $p < 0.05$ ) were employed to construct cluster networks (chemokines; pro-inflammatory cytokines; regulatory cytokines, and growth factors) using the open-source Cytoscape software (available at <https://cytoscape.org>). Comparative analysis among subgroups was carried out considering the number of correlations observed for each soluble mediator cluster and the total number of correlations computed for each subgroup.

Additional analysis of soluble immune mediators was further performed to compare and summarize the major changes observed in the cord blood and mother serum compartments. For this purpose, Z-score normalization ( $Z\text{-scores} = (\text{original value} - \bar{x})/SD$ ) was applied to construct colormaps. The number of soluble mediators with  $Z\text{-score} \geq 4$  on each compartment was identified and subsided in comparative analysis among groups.

## Results

### Soluble immune mediators in umbilical cord blood from neonates born to mothers with acute or convalescent COVID-19

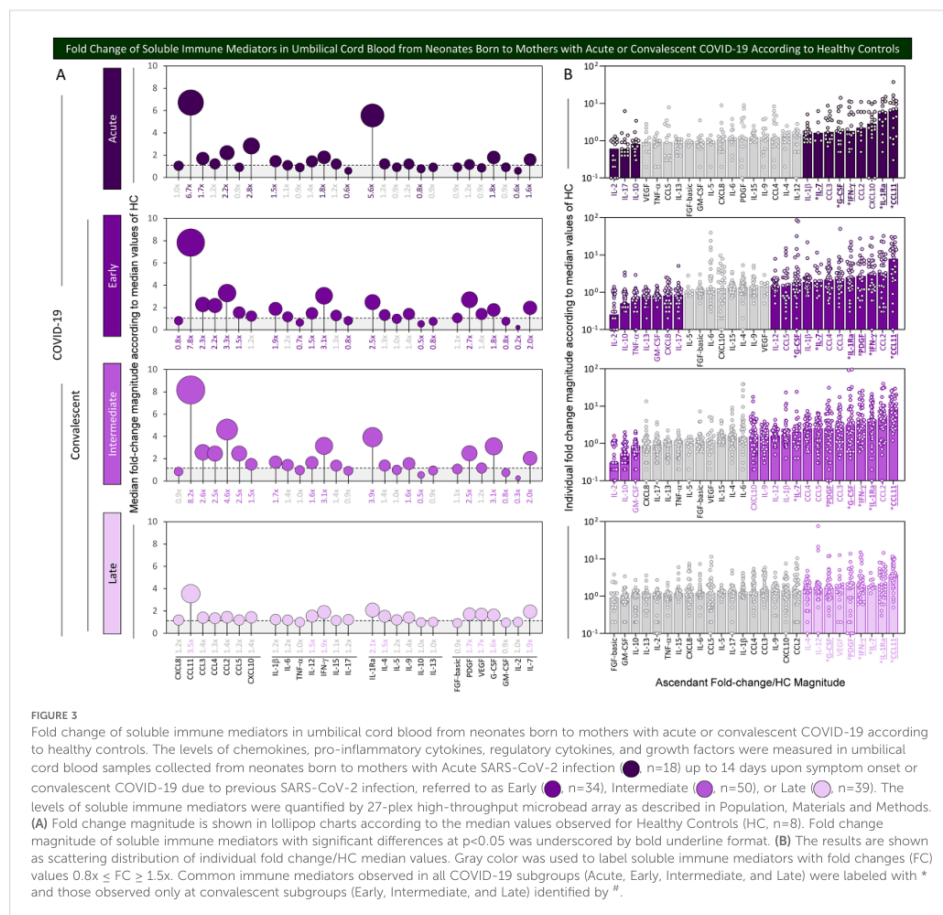
The levels of chemokines, pro-inflammatory cytokines, regulatory cytokines, and growth factors were measured in



umbilical cord blood samples from neonates born to mothers with acute or convalescent COVID-19, and the results are presented in **Figure 2**. Data analysis demonstrated an increase of CCL11, CCL3, CXCL10, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1Ra, and G-CSF and a decrease of IL-10 in cord blood samples from neonates born to mothers with Acute SARS-CoV-2 infection as compared with Healthy Controls (HC). The analysis of cord blood samples at Early and Intermediate convalescent COVID-19 showed increased levels of CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1Ra, G-CSF, and IL-7 and a decrease of IL-10 and IL-2 as compared with HC. Overall, cord blood samples from the Late convalescent subgroup exhibited few differences as compared with HC, comprising higher levels of CCL11, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-7. However, the Late subgroup presented distinct levels of several immune mediators as compared with Early and/or Intermediate subgroups, including increased levels of CXCL8, TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-5, IL-10, IL-13, and GM-CSF along with decrease levels of CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-1Ra, PDGF, G-CSF, and IL-2 (**Figure 2**).

### Fold change of soluble immune mediators in umbilical cord blood from neonates born to mothers with acute or convalescent COVID-19 according to healthy controls

Aiming at further characterizing the profile of chemokines, cytokines, and growth factors in umbilical cord blood samples from neonates born to mothers with acute or convalescent COVID-19, the magnitude order of fold changes in soluble immune mediator concentrations was calculated according to HC median values. The results are shown in **Figure 3**. Data analysis demonstrated that cord blood from the Acute subgroup presented a range of soluble immune mediators with fold change magnitudes over 1.5 $\times$  reaching values as high as 6.7 $\times$ , with CCL11 > IL1Ra > CXCL10 > CCL2 > IFN- $\gamma$  ~ G-CSF > CCL3 > IL-7 > IL-1 $\beta$ . Cord blood from Early and Intermediate subgroups exhibited a large set of soluble immune mediators with fold change magnitudes higher than 1.5 $\times$  toward 7.2 $\times$  and 8.2 $\times$ ,



respectively. Overall, data demonstrated a magnitude order of CCL11 > CCL2 > IFN- $\gamma$  > PDGF > IL-1Ra > CCL3 > CCL4 > IL-7 > IL-1 $\beta$  > G-CSF > CCL5 ~ IL-12 in the Early subgroup and CCL11 > CCL2 > IL-1Ra > IFN- $\gamma$  ~ G-CSF > CCL3 > PDGF ~ CCL5 ~ CCL4 > IL-7 > IL-1 $\beta$  > IL-12 ~ IL-9 > CXCL10 in the Intermediate subgroup (Figure 3, bar charts). Cord blood from the Late subgroup showed a small set of soluble mediators with increased fold changes higher than 1.5 $\times$  up to 3.5 $\times$  CCL11 > IL-1Ra > IL-7 ~ IFN- $\gamma$  > PDGF ~ VEGF > G-CSF > IL-12 ~ IL-4. Conversely, decreased fold change magnitudes below 0.8 $\times$  were observed in Acute (IL-2 ~ IL-17 < IL-10), Early (IL-2 < IL-10 < TNF- $\alpha$  < IL-13 ~ GM-CSF ~ CXCL8 ~ IL-17), and Intermediate (IL-2 < IL-10 < GM-CSF) with no values below 0.8 $\times$  observed in the Late subgroup (Figure 3, bar charts).

Venn diagram analysis identified a set of common soluble immune mediators with increased levels in all COVID-19

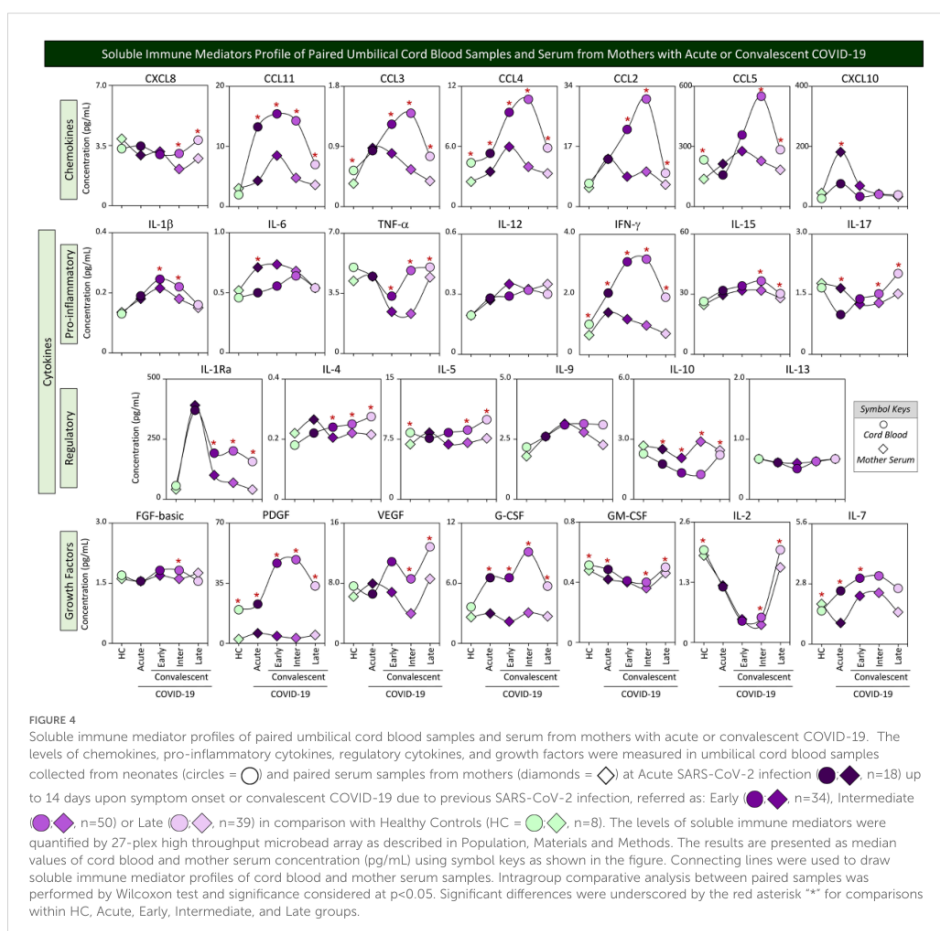
subgroups (from 1.6 $\times$  up to 8.2 $\times$ ), comprising CCL11, IFN- $\gamma$ , IL-1Ra, and G-CSF (Figure 3, \* below bar charts). Moreover, increased fold changes of PDGF were commonly observed only in convalescent COVID-19 (Early, Intermediate, and Late subgroups) (Figure 3, # below bar charts).

### Soluble immune mediator profiles of paired umbilical cord blood samples and serum from mothers with acute or convalescent COVID-19

Although transplacental transfer of most soluble mediators is believed to not occur in humans, the maternal immunological profile may interfere in the fetal immune response and impact the

cord blood microenvironment. In order to evaluate whether the profile of mother serum immune mediators resembles the pattern observed in cord blood samples from their offsprings, parallel analysis of chemokines, cytokines, and growth factors was performed in mother–newborn pairs from Acute, Early, Intermediate, and Late COVID-19 subgroups as well as healthy controls. The results are presented in Figure 4. Data from paired umbilical cord blood (circles) and mother serum samples (diamonds) were compared for each COVID-19 subgroups as well as healthy controls. Connecting lines were used to draw soluble immune mediator profiles. Comparative analysis demonstrated that most soluble immune mediators in mother serum and cord blood paired samples from healthy controls presented similar median values, except for 8 out of 27 molecules (30%), comprising higher levels of CCL3, CCL4, CCL5, IFN- $\gamma$ , IL-5,

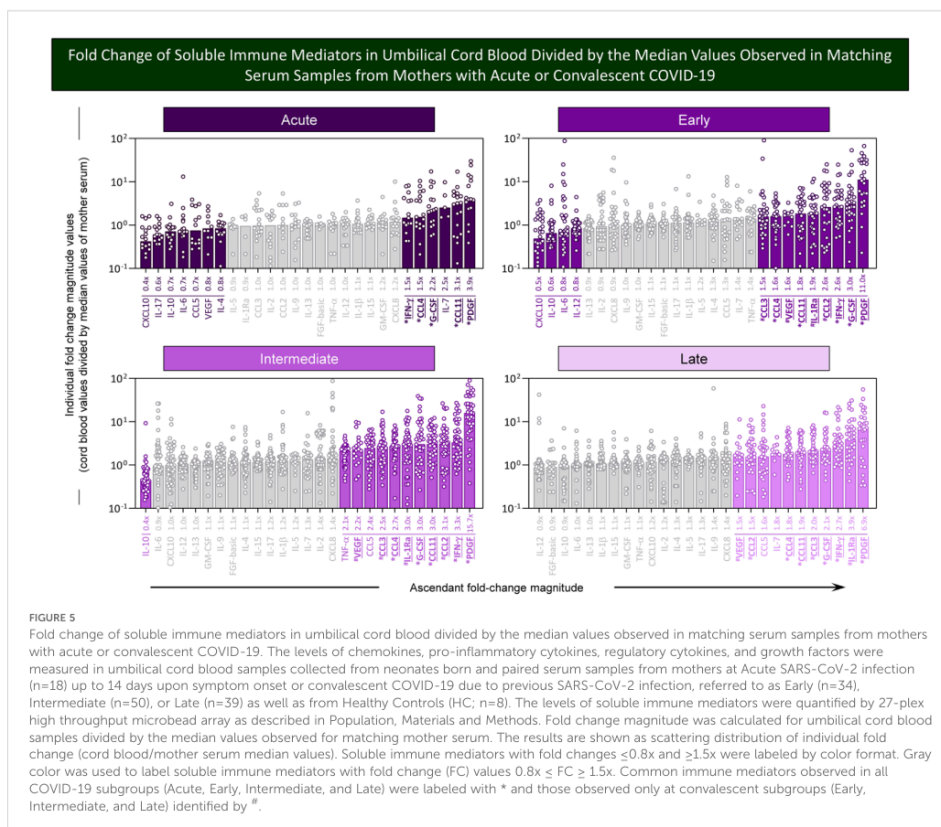
PDGF, GM-CSF, and IL-2 and lower levels of IL-7 observed in cord blood as compared with mother serum (Figure 4, green symbols). Distinct profiles of soluble immune mediators were identified in the paired analysis of mother–newborn Acute subgroups for 11 out of 27 analytes (41%), comprising increased levels of CCL11, CCL4, IFN- $\gamma$ , PDGF, G-CSF, GM-CSF, and IL-7 and decreased levels of CXCL10, IL-6, IL-17, and IL-10 in cord blood samples as compared with mother serum (Figure 4, dark-purple symbols). Of note were the increased levels of a larger set of soluble immune mediators observed in cord blood samples from convalescent COVID-19 subgroups (Early = 11/27, 41%; Inter = 20/27, 74%; and Late = 18/27, 67%) as compared with mother serum (Figure 4). IL-10 was the single parameters presenting lower median levels in cord blood as compared with mother serum throughout convalescent COVID-19 (Figure 4).



Aiming at identifying soluble immune mediators with higher magnitude to differentiate cord blood samples from mother serum, the fold change values were calculated for each soluble immune mediator in cord blood samples from COVID-19 subgroups divided by the median values of matching mother serum. The results are presented in Figure 5. Data analysis demonstrated that a range of soluble immune mediators from cord blood from the Acute subgroup presented fold change magnitudes over 1.5x reaching values as high as 3.9x, with PDGF > CCL11 > IL-7 > G-CSF > CCL-4 ~ IFN-γ. Moreover, a larger set of soluble immune mediators from cord blood from convalescent COVID-19 subgroups (Early, Intermediate, and Late) exhibited fold change magnitudes up to 11.0x, 15.7x, and 6.9x, respectively. Overall, data from the Early subgroup demonstrated high fold change magnitude order for PDGF > G-CSF > IFN-γ ~ CCL-2 > IL-1Ra > CCL-11 > VEGF ~ CCL4 > CCL3. Data from the Intermediate subgroup showed high fold change magnitude order for PDGF > IFN-γ

> CCL2 > CCL11 ~ G-CSF ~ IL-1Ra > CCL4 > CCL3 > CCL5 > VEGF > TNF-α. The results from the Late subgroup showed high fold change magnitude order for PDGF > IL-1Ra > IFN-γ > G-CSF > CCL3 > CCL11 > CCL4 ~ IL-7 > CCL5 > CCL2 ~ VEGF. Conversely, decreased fold change magnitudes (below 0.8x) were observed in Acute (CXCL10 < IL-17 < IL-10 ~ IL-6 ~ CCL5 < VEGF < IL-4), Early (CXCL10 < IL-10 < IL-6 ~ IL-12), and Intermediate (IL-10) with no value below 0.8x observed in the Late subgroup (Figure 5).

Venn diagram analysis identified a set of common soluble immune mediators with fold change magnitude over 1.5x up to 15.7x in cord blood samples according to mother serum in all COVID-19 subgroups, comprising CCL11, CCL4, IFN-γ, PDGF, and G-CSF (Figure 5, \* below bar charts). Moreover, increased fold changes of CCL2, CCL3, IL-1Ra, and VEGF were commonly observed only in convalescent COVID-19 (Early, Intermediate, and Late subgroups) (Figure 5, \* below bar charts).



**FIGURE 5**  
 Fold change of soluble immune mediators in umbilical cord blood divided by the median values observed in matching serum samples from mothers with acute or convalescent COVID-19. The levels of chemokines, pro-inflammatory cytokines, regulatory cytokines, and growth factors were measured in umbilical cord blood samples collected from neonates born and paired serum samples from mothers at Acute SARS-CoV-2 infection (n=18) up to 14 days upon symptom onset or convalescent COVID-19 due to previous SARS-CoV-2 infection, referred to as Early (n=34), Intermediate (n=50), or Late (n=39) as well as from Healthy Controls (HC; n=8). The levels of soluble immune mediators were quantified by 27-plex high throughput microbead array as described in Population, Materials and Methods. Fold change magnitude was calculated for umbilical cord blood samples divided by the median values observed for matching mother serum. The results are shown as scattering distribution of individual fold change (cord blood/mother serum median values). Soluble immune mediators with fold changes <0.8x and >=1.5x were labeled by color format. Gray color was used to label soluble immune mediators with fold change (FC) values 0.8x ≤ FC < 1.5x. Common immune mediators observed in all COVID-19 subgroups (Acute, Early, Intermediate, and Late) were labeled with \* and those observed only at convalescent subgroups (Early, Intermediate, and Late) identified by †.

## Soluble immune mediator signatures of paired umbilical cord blood samples from neonates and serum from mothers with acute or convalescent COVID-19

In order to take a panoramic snapshot of soluble immune mediators in mother serum and in the cord blood from their offsprings, the signatures of chemokines, cytokines, and growth factors were assembled for mother–newborn pairs from Acute, Early, Intermediate, and Late subgroups as well as healthy controls. The signatures of soluble immune mediators in mother serum and cord blood were built as categorical data, reported as the proportion of samples with levels above the global median cut-off values determined for mother serum and cord blood samples. The results are presented in Figure 6. Signatures from paired mother serum samples (diamonds) and umbilical cord blood (circles) were

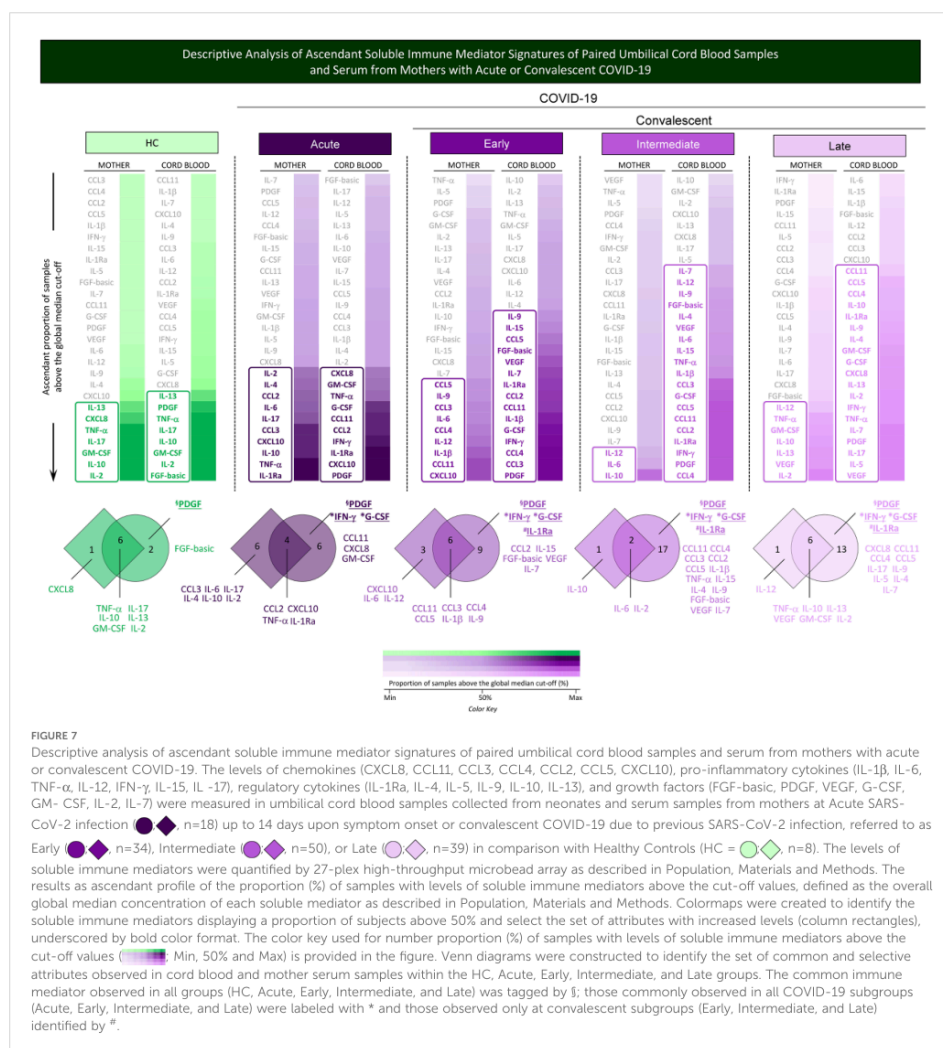
compared for each COVID-19 subgroups as well as healthy controls. Connecting lines were used to draw the signatures of distinct categories of soluble immune mediator profiles (chemokines, pro-inflammatory and regulatory cytokines, and growth factors). Comparative analysis was carried out to select the set of immune mediators outside the gray zone equivalent to the 50<sup>th</sup> percentile. In healthy controls, a small set of immune mediators with increased levels were observed for mother serum (7/27, 26%—CXCL8, TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-10, IL-13, GM-CSF, IL-2) and cord blood samples (8/27, 30%—TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-10, IL-13, FGF-basic, PDGF, GM-CSF, IL-2). In the Acute subgroup, a total of 10 out of 27 immune mediators (37%) were increased in mother serum (CCL3, CCL2, CXCL10, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-1Ra, IL-4, IL-10, and IL-2) and cord blood samples (CXCL8, CCL11, CCL2, CXCL10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1Ra, PDGF, G-CSF, and GM-CSF) (Figure 6).



Distinct profiles of soluble mediators were identified in mother serum and cord blood from convalescent subgroups. Waning in the set of immune mediators was observed for mother serum from the Early (9/27, 33%), Intermediate (3/27, 11%), and Late subgroups (7/27, 26%). On the other hand, a higher number of immune mediators remained with increased levels in cord blood samples in the convalescent subgroups (Early = 15/27, 56%; Intermediate = 19/27, 70%, and Late = 19/27, 70%) (Figure 6).

Additional analysis of soluble immune mediator signatures was performed to identify common and selective molecules with increased levels in mother serum and cord blood pairs in healthy

controls and during acute or convalescent COVID-19. For this purpose, the soluble immune mediators were ranked considering the ascendant proportion of samples with levels above the global median and data presented in Figure 7. Venn diagram analysis allowed the identification of common and selective immune mediators observed in mother–newborn pairs. Descriptive analysis of selective immune mediators pointed out that PDGF was universally increased in cord blood samples from all study groups (HC, Acute, Early, Intermediate, and Late). IFN- $\gamma$  and G-CSF were increased in cord blood samples of all COVID-19 subgroups (Figure 7, \* underscored attributes). IL-1Ra was

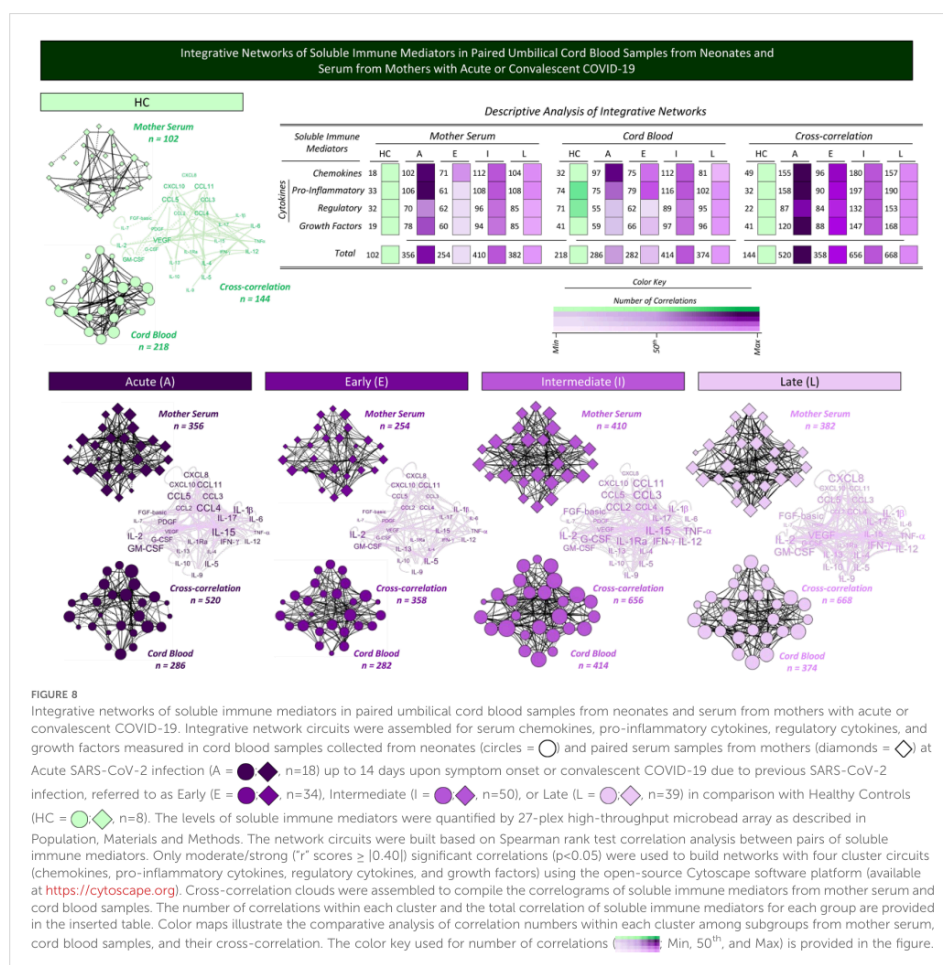


selectively increased in cord blood from convalescent subgroups (Early; Intermediate; Late) (Figure 7, # underscored attributes).

### Integrative networks of soluble immune mediators in paired umbilical cord blood samples from neonates and serum from mothers with acute or convalescent COVID-19

A complementary landscape of interplay between soluble immune mediators from mother serum and cord blood samples was explored by correlation and cross-correlation analysis. The

results are presented in Figure 8. Correlation analysis between chemokines, cytokines, and growth factors was performed to assess the neighborhood connectivity in mother serum and cord blood microenvironments. Additionally, cross-correlation analysis between mother serum and cord blood soluble mediators was calculated to characterize the interplay of soluble immune mediators between these compartments. Data analysis demonstrated that overall, the number of correlations in mother serum and cord blood, as well as the cross-correlation between mother/cord blood pairs, increased in Acute COVID-19 as compared with HC (n=102 and 356; n=218 and 286; n=144 and 520, respectively). Increased correlation numbers in cord blood (n=414 and 374) along with higher cross-correlation between

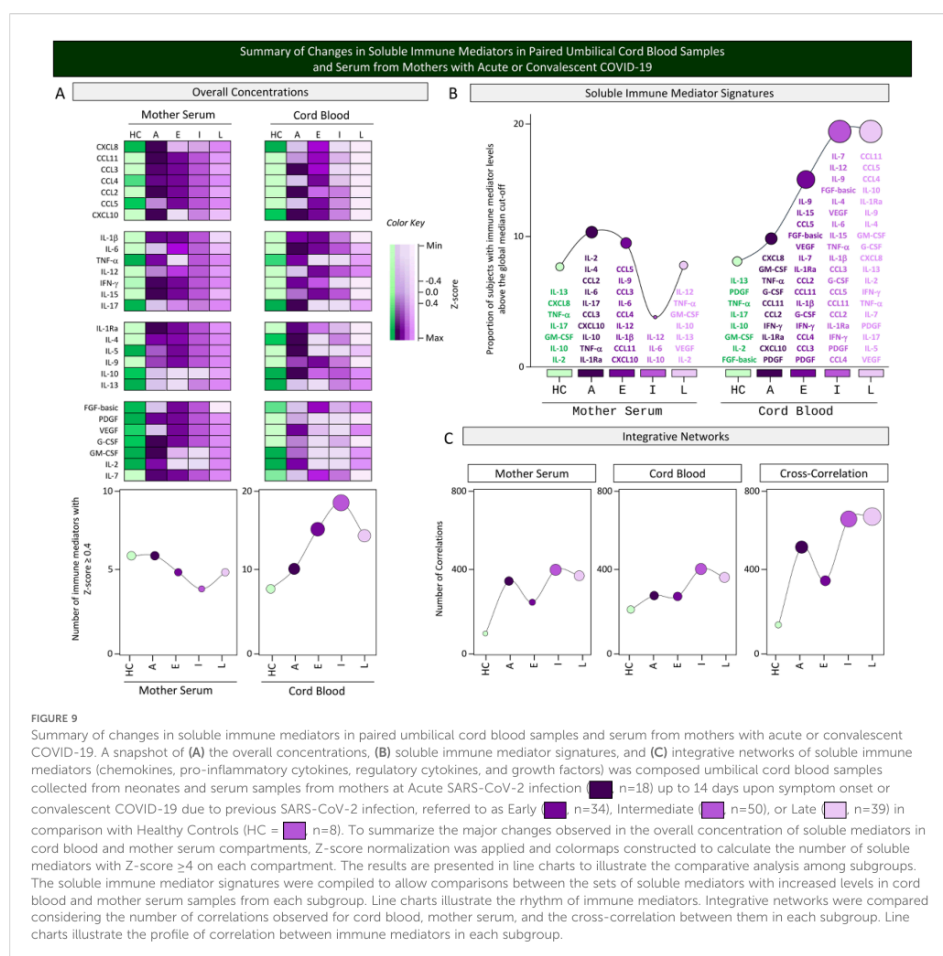


mother/cord blood pairs (n=656 and 668) were observed from acute infection toward Intermediate and Late convalescent subgroups (Figure 8).

### Summary of changes in soluble immune mediators in paired umbilical cord blood samples and serum from mothers with acute or convalescent COVID-19

A panoramic snapshot of changes in the overall concentrations, signatures, and integrative networks of soluble immune mediators was taken for comparative analysis between cord blood samples and serum from mothers with acute or convalescent COVID-19. The

results are presented in Figure 9. Colormap constructs were assembled for comparative analysis of soluble immune mediator concentrations between the two compartments. Data demonstrated an inverted profile for mother serum and cord blood samples. While a decline in soluble mediator was observed in the mother serum compartment from acute toward convalescent COVID-19 subgroups, an increase of soluble mediators was observed in cord blood samples from acute to convalescent COVID-19. The analysis of soluble mediator signatures further confirmed these findings. An increase in correlation numbers was observed in mother serum and cord blood samples and in the cross-correlation interplay from HC toward Late convalescent COVID-19. However, the waveforms revealed that during acute infection, a more pronounced upregulation was observed in the correlation numbers in mother



serum and in the cross-correlation interplay as compared with cord blood samples (Figure 9).

## Discussion

The emergence of newly identified pathogens or previously known pathogens that are spreading to new geographic areas or populations presents significant challenges to global health. The understanding of the pathogenesis of these emerging infectious diseases, particularly in a vulnerable population such as pregnant women, besides the identification of potential biomarkers in the maternal–fetal interface are extremely important for proposing clinical interventions. The present study attempts to characterize the profile of soluble immune mediators in serum samples from mother with acute and convalescent COVID-19 and in the umbilical cord blood microenvironment of their offsprings, in comparison to healthy controls, employing distinct statistical approaches for data analysis. The unique aspect of this study lies in the measurement of immune mediator signatures in mother/newborn dyads and the observation that these signatures differ significantly, highlighting the importance of evaluating distinct microenvironments independently while monitoring COVID-19-affected pregnancies.

The understanding of the immune response to SARS-CoV-2 infection has rapidly expanded from extensive basic research toward clinical applications (16–18). The scientific literature on COVID-19 immunity during pregnancy remains limited (4, 19, 20). The physiological changes in the immune system observed during pregnancy make the pregnant women and their offsprings a risk group for adverse outcomes of SARS-CoV-2 infection (1, 6–8). Although the maternal–fetal transmission of the SARS-CoV-2 infection is rare, the immunological changes during pregnancy can increase the risk for complications in COVID-19-affected pregnancies (21, 22).

The interplay between the maternal–fetal interface comprises complex physiological changes and undergoes modifications along the pregnancy trimesters (11). Therefore, the analysis of the maternal–fetal interface during acute and convalescent COVID-19 is relevant for assessing the dynamics of changes in the immune responses of mothers and the impact in the umbilical cord blood microenvironment. Regardless of the relevance of this topic, the effect of SARS-CoV-2 during pregnancy, as well as the long-term impact on infant development, remains to be elucidated.

In this line, the present study aimed to investigate whether the profile of soluble immune mediators in cord blood mirrors that observed in serum from mothers with acute (at delivery) and Early/Intermediate/Late convalescent SARS-CoV-2 infection (3<sup>rd</sup>, 2<sup>nd</sup>, and 1<sup>st</sup> Trimesters, respectively). For this purpose, paired samples of mother serum and umbilical cord blood from their neonates were obtained at delivery and categorized according to the time SARS-CoV-2 infection during pregnancy. It has been shown that perinatal acquired viral infections may lead to relevant neonatal

complications, and the pregnancy trimester of SARS-CoV-2 infection is crucial to determining the risk of adverse outcomes (23–26).

Our results demonstrated that during Acute infection, cord blood samples presented an increase of several soluble immune mediators, including CCL11, CCL3, CXCL10, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1Ra, and G-CSF and a decrease of IL-10, resembling the classically reported cytokine storm elicited by SARS-CoV-2 infection. The upregulation in CXCL10 has been previously reported during SARS-CoV-2 infection acquired at the 3<sup>rd</sup> pregnancy trimester, aligning with our observation (27, 28).

Our findings showed that as maternal infection progresses from acute toward the convalescent phase, the changes in cord blood immune mediators did not mirror the mother serum profile. These findings suggested that the impact of SARS-CoV-2 infection during pregnancy triggers compartmentalized changes in the immunological profile of mother serum and cord blood, with a long-term effect in the latter contrasting with the typical waning observed for mother serum. Some studies have reported the endothelial dysfunction and placental vascular flow changes due to COVID-19 infection favoring the passage of soluble mediators and other components of the immune system into the cord blood (29, 30). The precise mechanism underlying the crosstalk between systemic and compartmentalized microenvironments, such as mother serum and cord blood dyad, as well as mother serum and cerebrospinal fluid, still remains to be elucidated. In this context, the existence of a divergent landscape of soluble immune mediators in serum and cerebrospinal fluid has been demonstrated, emphasizing the relevance of understanding the systemic and compartmentalized immune response elicited by SARS-CoV-2 infection during pregnancy (31). Therefore, the immunological response during pregnancy is the result of the combination and specificities from the maternal immune system and the fetal–placental microenvironment, leading to a unique immunological response (32).

The COVID-19 infection during pregnancy elicits a maternal systemic inflammatory response leading to changes in the placenta microenvironment. These changes can incite an immune dysregulation in the fetus that ultimately portrays short- and long-term effects in offspring (33). Our findings support the hypothesis of active fetal–placental participation in immune responses. As demonstrated by Taglauer and colleagues (27), whereas some cytokines and chemokines were elevated in the neonate compartment, their presence was not simply a result of passive transfer from maternal circulation. These findings align with previous observations that changes in the cord blood immune mediators do not represent a passive transfer from mother serum but rather indicate independent mechanisms that occur within the placental–fetal dyad (11, 27).

The analysis of the mother–cord blood dyad allowed the characterization of the immune response dialog in the maternal–fetal interface across acute and convalescent COVID-19 acquired during pregnancy. Regardless of the COVID-19 stage, cord blood samples from neonates born to mothers with COVID-19 exhibited higher levels of CCL11, IFN- $\gamma$ , IL-1Ra, and G-CSF as compared

with healthy controls. Of note, it is important to mention that CCL4 displayed an increase in convalescent subgroups, and PDGF was also increased in cord blood among all the subgroups, including HC. These data are consistent with the known effects of SARS-CoV-2, which can trigger a polyfunctional systemic immune activation even in neonatal compartments. Moreover, these findings are in agreement with the hypothesis that changes in the cord blood immune mediators represent an independent mechanism within the placental–fetal interface (11, 27, 34). In this context, this phenomenon, referred to as utero priming, even in the absence of congenital bacterial and virus infection, is characterized by changes in fetal cytokines, chemokines, and other cellular and humoral factors that do not resemble the maternal response (35, 36). The knowledge of this distinct fetal microenvironment as compared with the maternal immune response brings about novel insights regarding the compartmentalized immune response induced by gestational COVID-19.

Previous studies have demonstrated that SARS-CoV-2 infection during pregnancy induces a proinflammatory state within the amniotic cavity, causing an increase of immune mediators in fetal circulation (37). Our data highlighted the presence of elevated CCL11 and IFN- $\gamma$  levels in cord blood samples that may indicate a heightened state of inflammation at the maternal–fetal interface. Moreover, the higher levels of IL-1Ra, an anti-inflammatory molecule, may play a role as a compensatory mechanism to counteract the pro-inflammatory environment induced by maternal COVID-19, protecting the neonate compartments from excessive inflammation that could disrupt development (38). Previous studies have reported that increased levels of IL-1Ra during SARS-CoV-2 infection may predict patient severe COVID-19 outcomes and might be useful as a prognostic biomarker to guide treatment strategies (39).

The persistence of G-CSF in cord blood samples, due to the acute to convalescent phases, further underscore the complexity of the immune response at the maternal–fetal interface. G-CSF is known to play a role in both immune defense and tissue repair, suggesting that its elevation may reflect an attempt to balance immune activation with tissue homeostasis (38, 40). It is well known that G-CSF increases during pregnancy, encompassing the maps of cytokine landscapes of distinct phases of gestational immune response (11). It has been suggested that G-CSF plays a role as an anti-inflammatory mediator during pregnancy (11).

Our data demonstrated higher levels of CCL4, particularly in the convalescent subgroups, suggesting persistent immune activation even after the resolution of acute infection. CCL4, a chemokine involved in the recruitment of monocytes and lymphocytes, may contribute to the long-term immunological response and some reports that identify this chemokine as a redundant molecule in correlations between other immune system components in the maternal–fetal interface (41). In addition, all cord blood subgroups displayed higher levels of PDGF, regardless of the SARS-CoV-2 maternal infection. In this

context, the role of this molecule can reflect a baseline physiological process that is essential for fetal development. However, its specific role in the context of maternal COVID-19 and the maternal–fetal interface along with their crossing to the fetus compartments warrants further investigation. These observations can reflect a complex and persistent maternal–fetal interface even during the convalescent phase of COVID-19, suggesting that the effects of maternal infection may extend beyond the acute phase, potentially influencing neonatal and childhood health outcomes. Some reports have shown that maternal viral infections, such as influenza and cytomegalovirus, can lead to persistent changes in fetal cytokine profiles, with potential long-term consequences for immune function and disease susceptibility (24). In addition, this type of immunity transfer, called protective immunity, refers to the gradual priming of the fetal immune system for adaptive memory development *in utero*, and there is evidence that fetal inflammation may also be beneficial for immune priming (36).

The comparative analysis of immune mediators in the mother–newborn dyad demonstrated that certain mediators, such as PDGF and G-CSF, were markedly elevated in cord blood relative to maternal serum, especially during convalescence, with fold changes up to 15.7 $\times$ . This differential pattern between maternal serum and cord blood suggests a distinct immune response in the fetal environment compared with the maternal circulation. Integrative network analysis further revealed increased neighborhood connectivity among immune mediators in both microenvironments, particularly in the context of late convalescent COVID-19. It has been postulated that immune response networks can integrate pathways by the engagement of three types of interactions, including cooperation, complementation, and compensation (42). These interactions are relevant to guarantee the redundancy of immune mediator pathways that ensure the robustness of the immune system. In this line, in the present study, we have explored the concept of redundancy and robustness of the immune system using the concept of integrative networks, assembled according to the number of correlations between immune mediators from mother serum and cord blood that can be transposed to the principles of cooperation, complementation, and compensation among functional properties of immune mediators. The analysis of immune mediator interactions is relevant for better understanding the immunological changes associated with SARS-CoV-2 infection during distinct gestational phases. Our data demonstrated that soluble immune mediators in mother–newborn pairs showed an increase of neighborhood connectivity both in microenvironments and in their interplay from acute toward late convalescent COVID-19. We believe that a reasonable biological interpretation for these findings is that SARS-CoV-2 infection acquired in the first pregnancy trimester led to an increased redundancy and robustness of immune interactions in the mother/newborn dyad. As the immune system gains redundancy, the establishment of additional compensatory

mechanisms is observed. In this sense, the analysis of correlations between immune mediators and their variation represents a rational approach to characterize the compartmentalized immune response in the cord blood and mother serum microenvironments. Our findings pave the way for future investigations into the role of specific immunological mediators in modulating neonatal immunity and their impact on child development.

The present study has some limitations. In spite of the large number of mother–newborn paired samples analyzed in this exploratory investigation, the described observational design with multiple comparisons without corrections for comorbidities, clinical manifestations, disease severity, or other confounding variables constituted a study limitation. As the present study was carried out during the circulation of B.1.1.28 and B.1.1.33 SARS-CoV-2 strains, the generalization of our findings to epidemiological scenarios of other SARS-CoV-2 variants is limited since distinct variants of concern may interfere in the immune response. Another limitation is that the present investigation is a single-center study. Moreover, we have not performed a prospective follow-up analysis of the children to monitor their immune response profile.

In summary, this pioneering study investigated the complex immunological interaction between mothers with acute and convalescent COVID-19 and their newborns, revealing distinct immunological signatures in maternal serum and umbilical cord blood. Our findings demonstrated distinct profiles in cord blood as compared with mother serum, bringing about novel insights regarding the potential impact of maternal SARS-CoV-2 infection at distinct gestational phases on neonatal health and development. While acute SARS-CoV-2 infection in the mother induces a systemic inflammatory response in both compartments, the convalescent phase presents a more differentiated immunological pattern in umbilical cord blood, suggesting a long-term effect on the fetal environment. The persistent elevation of mediators such as CCL11, IFN- $\gamma$ , IL-1Ra, and G-CSF in umbilical cord blood, regardless of the stage of maternal COVID-19, underscores the importance of “*in utero* priming” and its potential to modulate neonatal immunity in the long term. The striking differences in the levels of mediators such as PDGF and G-CSF between maternal serum and umbilical cord blood, especially during convalescence, reinforce the need to evaluate the maternal–fetal environment as distinct immunological compartments. Although this study provides valuable insights into the maternal–fetal immune response to SARS-CoV-2 infection, we acknowledge the limitations inherent in its observational design and the specificity of the SARS-CoV-2 variants circulating during data collection. Future studies should focus on longitudinal analyses, with greater sample diversity, to monitor the long-term effects of maternal SARS-CoV-2 exposure on child health. Ultimately, a detailed understanding of the maternal–fetal immunological interface in response to COVID-19 is crucial for developing effective prevention and intervention strategies, aiming to protect the health of mothers and newborns during and after the pandemic. Together, this evidence regarding the maternal–fetal crosstalk can subsidize the improvement of clinical practice and public health policies for management of prenatal exposure to SARS-CoV-2 infection.

## Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## Ethics statement

The studies involving humans were approved by National Ethical Committee - CONEP. The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study.

## Author contributions

MC-d-C: Validation, Writing – review & editing, Formal analysis, Writing – original draft, Software, Investigation, Visualization, Methodology, Conceptualization. LS: Software, Writing – review & editing, Investigation, Visualization, Methodology, Writing – original draft, Conceptualization, Validation, Formal analysis. GF: Conceptualization, Investigation, Validation, Software, Writing – review & editing, Formal analysis, Writing – original draft, Methodology, Visualization. FM: Writing – review & editing, Software, Formal analysis, Visualization, Conceptualization, Validation, Methodology, Investigation. DA: Conceptualization, Investigation, Methodology, Visualization, Formal analysis, Writing – review & editing, Software, Validation. HS: Methodology, Investigation, Visualization, Validation, Formal analysis, Writing – review & editing. APS: Formal analysis, Visualization, Methodology, Validation, Investigation, Writing – review & editing. COA: Supervision, Investigation, Software, Writing – review & editing, Validation, Data curation, Conceptualization, Formal analysis, Visualization, Methodology. RT: Writing – review & editing, Data curation, Supervision, Methodology, Formal analysis, Validation, Visualization, Investigation, Software. JJ: Writing – review & editing, Data curation, Supervision. KC: Supervision, Data curation, Writing – review & editing. LC: Data curation, Writing – review & editing, Supervision. ON: Supervision, Writing – review & editing, Data curation. LE: Project administration, Funding acquisition, Resources, Data curation, Supervision, Writing – review & editing. JC-d-R: Software, Conceptualization, Writing – review & editing, Investigation, Validation, Formal analysis, Visualization, Methodology. JB-d-S: Validation, Writing – review & editing, Formal analysis, Methodology, Software, Investigation, Visualization. IC-R: Software, Writing – original draft, Writing – review & editing, Investigation, Visualization, Methodology, Formal analysis, Validation. VM: Formal analysis, Visualization, Methodology, Validation, Investigation, Writing – review & editing. AC-A: Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing – review & editing. VP-M: Visualization, Formal analysis, Validation, Methodology, Investigation, Writing – review & editing. AT-C: Investigation, Visualization, Validation, Formal analysis, Methodology, Writing – review & editing. CG:

Supervision, Data curation, Writing – review & editing. AZ: Data curation, Writing – review & editing, Supervision, Conceptualization. CPA: Supervision, Methodology, Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Visualization, Data curation, Validation, Writing – review & editing. LM: Supervision, Writing – review & editing, Methodology, Conceptualization, Investigation, Project administration, Visualization, Funding acquisition, Resources, Data curation, Validation, Formal analysis. OM-F: Formal analysis, Data curation, Visualization, Project administration, Resources, Validation, Software, Writing – review & editing, Methodology, Funding acquisition, Supervision, Conceptualization, Writing – original draft, Investigation. AS: Methodology, Visualization, Conceptualization, Project administration, Software, Funding acquisition, Validation, Writing – original draft, Formal analysis, Supervision, Investigation, Resources, Writing – review & editing, Data curation.

## Funding

The author(s) declare that financial support was received for the research and/or publication of this article. This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES – MECC, LMPs, GMF, FM, DAAJ, HLS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – ACCA, VPM, ATC, OAMF), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – OTN, IACR, JGACR, ATC, OAMF), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG-APQ-03113-24 – ATC).

## Acknowledgments

We express our gratitude to all the pregnant women and their families as well as all the students, residents, and healthcare professionals whose support was essential to conducting 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). The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-RPT-FIOCRUZ for using the flow cytometry facilities. OTN, JGACR, 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).

## 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.

## Generative AI statement

The author(s) declare that no Generative AI was used in the creation of this manuscript.

## 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.

## References

- Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta BioMed.* (2020) 91:157–60. doi: 10.23750/abm.v9i11.9397
- World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard (2024). Available online at: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases> (Accessed January 16, 2025).
- Abu Raya B, Giles ML, Sadarangani M. Vertical transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from the mother to the infant. *JAMA Pediatr.* (2020) 174:1007–8. doi: 10.1001/jamapediatrics.2020.2150
- Edlow AG, Li JZ, Collier AY, Atyeo C, James KE, Boatman AA, et al. Assessment of maternal and neonatal SARS-CoV-2 viral load, transplacental antibody transfer, and placental pathology in pregnancies during the COVID-19 pandemic. *JAMA Netw Open.* (2020) 3:e2030455. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.30455
- Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Albezrah NKA, Bahaa HA, El-Bouseary MM, Alexiou A, et al. Pregnancy and COVID-19: high or low risk of vertical transmission. *Clin Exp Med.* (2023) 23:957–67. doi: 10.1007/s10238-022-00907-z
- Khalil A, von Dadelszen P, Draycott T, Ugwumadu A, O'Brien P, Magee L. Change in the incidence of stillbirth and preterm delivery during the COVID-19 pandemic. *JAMA.* (2020) 324:705–6. doi: 10.1001/jama.2020.12746
- Galang RR, Newton SM, Woodworth KR, Griffin I, Oduyibo T, Sancken CL, et al. Risk factors for illness severity among pregnant women with confirmed severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection-surveillance for emerging threats to mothers and babies network, 22 state, local, and territorial health departments, 29 march 2020–5 march 2021. *Clin Infect Dis.* (2021) 73:S17–23. doi: 10.1093/cid/ciab432
- Wei SQ, Bilodeau-Bertrand M, Liu S, Auger N. The impact of COVID-19 on pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis. *CMAJ.* (2021) 193:E540–8. doi: 10.1503/cmaj.202604
- Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol.* (2010) 63:425–33. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x
- Song D, Prah M, Gaw SL, Narasimhan SR, Rai DS, Huang A, et al. Passive and active immunity in infants born to mothers with SARS-CoV-2 infection during pregnancy: prospective cohort study. *BMJ Open.* (2021) 11:e053036. doi: 10.1136/bmjopen-2021-053036
- Dutta S, Sengupta P, Liew FF. Cytokine landscapes of pregnancy: mapping gestational immune phases. *Gynecol Obstet Clin Med.* (2024) 4:e000011. doi: 10.1136/gocm-2024-000011
- Bernier E, Brien ME, Girard S. Pregnant individuals with uncomplicated pregnancies display pro-inflammatory immune changes when exposed to the COVID-19 pandemic. *Am J Reprod Immunol.* (2024) 91:e13828. doi: 10.1111/aji.13828
- Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol.* (2000) 47:87–103. doi: 10.1016/s0165-0378(00)00060-7

14. McClymont E, Albert AY, Alton GD, Boucoiran I, Castillo E, Fell DB, et al. Association of SARS-CoV-2 infection during pregnancy with maternal and perinatal outcomes. *JAMA*. (2022) 327:1983–91. doi: 10.1001/jama.2022.5906
15. Fernandes GM, Motta F, Sasaki LMP, Silva ÁPD, Miranda AM, Carvalho AO, et al. Pregnancy outcomes and child development effects of SARS-CoV-2 infection (PROUDEST trial): protocol for a multicenter, prospective cohort study. *JMIR Res Protoc*. (2021) 10:e26477. doi: 10.2196/26477
16. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R, et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell*. (2020) 181:1036–1045.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.026
17. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. (2020) 584:463–9. doi: 10.1038/s41586-020-2588-y
18. Stephens DS, McElrath MJ. COVID-19 and the path to immunity. *JAMA*. (2020) 324:1279–81. doi: 10.1001/jama.2020.16656
19. Flannery DD, Gouma S, Dhudasia MB, Mukhopadhyay S, Pfeifer MR, Woodford EC, et al. SARS-CoV-2 seroprevalence among parturient women in Philadelphia. *Sci Immunol*. (2020) 5:eabd5709. doi: 10.1126/sciimmunol.abd5709
20. Atyeo C, Pullen KM, Bordt EA, Fischinger S, Burke J, Michell A, et al. Compromised SARS-CoV-2-specific placental antibody transfer. *Cell*. (2021) 184:628–642.e10. doi: 10.1016/j.cell.2020.12.027
21. 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) 2:591–610.e10. doi: 10.1016/j.medj.2021.04.016
22. Caparros-Gonzalez RA, Pérez-Morente MA, Hueso-Montoro C, Álvarez-Serrano MA, de la Torre-Luque A. Congenital, intrapartum and postnatal maternal-fetal-neonatal SARS-CoV-2 infections: A narrative review. *Nutrients*. (2020) 12:3570. doi: 10.3390/nu12113570
23. de Vries LS. Viral infections and the neonatal brain. *Semin Pediatr Neurol*. (2019) 32:100769. doi: 10.1016/j.spen.2019.08.005
24. Auriti C, De Rose DU, Santisi A, Martini L, Piersigilli F, Bersani I, et al. Pregnancy and viral infections: Mechanisms of fetal damage, diagnosis and prevention of neonatal adverse outcomes from cytomegalovirus to SARS-CoV-2 and Zika virus. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. (2021) 1867:166198. doi: 10.1016/j.bbdis.2021.166198
25. Yates EF, Mulkey SB. Viral infections in pregnancy and impact on offspring neurodevelopment: mechanisms and lessons learned. *Pediatr Res*. (2024) 96:64–72. doi: 10.1038/s41390-024-03145-z
26. Al Beloushi M, Saleh H, Ahmed B, Konje JC. Congenital and perinatal viral infections: consequences for the mother and fetus. *Viruses*. (2024) 16:1698. doi: 10.3390/v16111698
27. Taglauer ES, Dhole Y, Boateng J, Snyder-Cappione J, Parker SE, Clarke K, et al. Evaluation of maternal-infant dyad inflammatory cytokines in pregnancies affected by maternal SARS-CoV-2 infection in early and late gestation. *J Perinatol*. (2022) 42:1319–27. doi: 10.1038/s41372-022-01391-9
28. Jain S, Allen IE, Song D, Piao X. Cytokine responses to SARS-CoV2 infection in mother-infant dyads: a systematic review and meta-analysis. *Front Pediatr*. (2023) 11:1277697. doi: 10.3389/fped.2023.1277697
29. Rad HS, Röhl J, Stylianou N, Allenby MC, Bazaz SR, Warkiani ME, et al. The effects of COVID-19 on the placenta during pregnancy. *Front Immunol*. (2021) 12:743022. doi: 10.3389/fimmu.2021.743022
30. González-Mesa E, García-Fuentes E, Carvia-Pontasiac R, Lavado-Fernández AI, Cuenca-Marin C, Suárez-Arana M, et al. Transmitted fetal immune response in cases of SARS-CoV-2 infections during pregnancy. *Diagnostics (Basel)*. (2022) 12:245. doi: 10.3390/diagnostics12020245
31. Sasaki LMP, Canellas-de-Castro ME, Fernandes GM, Motta F, Araújo Júnior DA, Schulte HL, et al. Systemic and cerebrospinal fluid immune mediators coordinate a dichotomous microenvironment in parturients with acute or convalescent phases of COVID-19. *Immunol Lett*. (2025) 274:106979. doi: 10.1016/j.imlet.2025.106979
32. Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nat Rev Immunol*. (2017) 17:469–82. doi: 10.1038/nri.2017.64
33. Gayen Nee B, Urday P, Al-Kouatly HB, Solarin K, Chan JSY, Addya S, et al. COVID-19 infection during pregnancy induces differential gene expression in human cord blood cells from term neonates. *Front Pediatr*. (2022) 10:834771. doi: 10.3389/fped.2022.834771
34. Foo SS, Cambou MC, Mok T, Fajardo VM, Jung KL, Fuller T, et al. The systemic inflammatory landscape of COVID-19 in pregnancy: Extensive serum proteomic profiling of mother-infant dyads with in utero SARS-CoV-2. *Cell Rep Med*. (2021) 2:100453. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100453
35. Cardenas I, Means RE, Aldo P, Koga K, Lang SM, Booth CJ, et al. Viral infection of the placenta leads to fetal inflammation and sensitization to bacterial products predisposing to preterm labor. *J Immunol*. (2010) 185:1248–57. doi: 10.4049/jimmunol.1000289
36. Vidal MS Jr, Menon R. In utero priming of fetal immune activation: Myths and mechanisms. *J Reprod Immunol*. (2023) 157:103922. doi: 10.1016/j.jjri.2023.103922
37. Kosińska-Kaczyńska K, Rebizant B, Czeszko-Paprocka H, Bojdo A, Przybylski M, Chaberek K, et al. Maternal SARS-CoV-2 infection at delivery increases IL-6 concentration in umbilical cord blood. *J Clin Med*. (2023) 12:5672. doi: 10.3390/jcm12175672
38. Rosen DB, Murphy EA, Gejman RS, Capili A, Friedlander RL, Rand S, et al. Cytokine response over the course of COVID-19 infection in pregnant women. *Cytokine*. (2022) 154:155894. doi: 10.1016/j.cyto.2022.155894
39. Zhao Y, Qin L, Zhang P, Li K, Liang L, Sun J, et al. Longitudinal COVID-19 profiling associates IL-1RA and IL-10 with disease severity and RANTES with mild disease. *JCI Insight*. (2020) 5:e139834. doi: 10.1172/jci.insight.139834
40. Baillie KE, Irvine AE, Bridges JM, McClure BG. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in cord and maternal serum at delivery. *Pediatr Res*. (1994) 35:164–8. doi: 10.1203/00006450-199402000-00007
41. Hamilton SA, Tower CL, Jones RL. Identification of chemokines associated with the recruitment of decidual leukocytes in human labour: potential novel targets for preterm labour. *PLoS One*. (2013) 8:e56946. doi: 10.1371/journal.pone.0056946
42. Nish S, Medzhitov R. Host defense pathways: role of redundancy and compensation in infectious disease phenotypes. *Immunity*. (2011) 34:629–36. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.009