

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

DAVID ALVES DE ARAUJO JUNIOR

**AVALIAÇÃO POR IMAGEM DAS ALTERAÇÕES CEREBRAIS
PEDIÁTRICAS RELACIONADAS À INFECÇÃO POR SARS-CoV-2
DURANTE A GESTAÇÃO**

BRASÍLIA

2024

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

DAVID ALVES DE ARAUJO JUNIOR

AVALIAÇÃO POR IMAGEM DAS ALTERAÇÕES CEREBRAIS
PEDIÁTRICAS RELACIONADAS À INFECÇÃO POR SARS-CoV-2
DURANTE A GESTAÇÃO

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

Orientadora: Profa. Dra. Licia Maria Henrique da Mota

BRASÍLIA

2024

AA474a" ALVES DE ARAUJO JUNIOR, DAVID
"AVALIAÇÃO POR IMAGEM DAS ALTERAÇÕES CEREBRAIS
PEDIÁTRICAS RELACIONADAS A INFECCÃO POR SARS-CoV-2 DURANTE A
GESTAÇÃO" / DAVID ALVES DE ARAUJÓ JUNIOR; orientador Licia
Maria Henrique da Mota. -- Brasília, 2024.
169 p.

Tese (Doutorado em Ciências Médicas) -- Universidade de
Brasília, 2024.

1. COVID-19. 2. Gestação. 3. Ultrassonografia. 4.
Elastografia. 5. Neuroimagem. I. Henrique da Mota, Licia
Maria, orient. II. Título.

DAVID ALVES DE ARAUJO JUNIOR

**AVALIAÇÃO POR IMAGEM DAS ALTERAÇÕES CEREBRAIS
PEDIÁTRICAS RELACIONADAS À INFECÇÃO POR SARS-CoV-2
DURANTE A GESTAÇÃO**

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

BANCA EXAMINADORA

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

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

Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo

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

Profa. Dra. Norma Selma Santos Costa

Coordenadora do Centro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem do Hospital Dr. Carlos
Alberto Studart Gomes (SESA-CE). Doutorado pela Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo (USP-SP).

Prof. Dr. Francisco Abaeté das Chagas Neto

Preceptor dos serviços de Radiologia e Diagnóstico por Imagem, Ortopedia e Reumatologia
do Hospital Geral de Fortaleza (HGF). Doutor em Ciências da Saúde pela Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (USP-RP).

Prof. Dra. Natália Torres Giacomini Pitman

Professora do curso de graduação em Medicina da Universidade Federal do Maranhão
(UFMA). Doutorado pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP-SP).

Dedico este trabalho à minha família,
com gratidão inestimável por todo o apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Licia Maria Henrique da Mota, por seu constante estímulo e apoio. Gratidão por ter compartilhado de sua extensa experiência acadêmica, bem como de sua expertise na obtenção, análise e apresentação de dados científicos. Sou grato por cada discussão, revisão e orientação que me proporcionou ao longo deste processo. Sua capacidade de inspirar e motivar foi fundamental para superarmos os desafios encontrados ao longo do caminho.

Agradeço ao Dr. Cleandro Pires de Albuquerque pela concepção inicial do projeto e análise crítica das diferentes técnicas estatísticas aplicáveis aos múltiplos contextos clínicos do nosso projeto. Suas orientações foram essenciais para o tratamento dos dados obtidos e construção dos modelos de análise estatística.

Agradeço a todos os colegas pediatras do ambulatório PROUDEST-BORN que colaboraram com este trabalho, pelo auxílio no delineamento do projeto, viabilização das consultas e coleta dos dados.

Agradeço a toda a equipe multidisciplinar do nosso ambulatório, enfermeiras, fonoaudiólogas, terapeutas ocupacionais e psicólogas, sua experiência com pacientes pediátricos e constante colaboração foram de grande importância para o sucesso deste projeto.

Agradeço ao Prof. Dr. Ciro Martins Gomes e Profa. Dra. Laila Salmen Espíndola pelo incondicional apoio institucional e financeiro na execução do estudo.

Agradeço aos professores membros da banca examinadora Profa. Dra. Juliana, Profa. Dra. Norma Selma, Prof. Dra. Natalia Giacomini e Prof. Dr. Francisco Abaeté por suas valiosas contribuições ao trabalho.

“Seja a mudança que você deseja ver no mundo.”

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

Fundamentos: As consequências neurológicas da infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez e no período perinatal ainda não estão completamente caracterizadas. No entanto, há evidências recentes de comprometimento da substância branca e prejuízo do neurodesenvolvimento em crianças após infecção materna por SARS-CoV-2. Esses parecem ocorrer como consequência de efeitos virais diretos e de uma resposta inflamatória sistêmica, que pode danificar as células gliais e a mielina, bem como interromper o fluxo sanguíneo regional. Este estudo buscou caracterizar as consequências da condição inflamatória materna e fetal no sistema nervoso central de lactentes após infecção materna por SARS-CoV-2.

Metodologia: Foi realizado um estudo de coorte longitudinal prospectivo, no período de junho de 2020 a dezembro de 2021, com acompanhamento de filhos de mães expostas ou não expostas à infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez. A análise cerebral incluiu dados de ultrassom craniano (US) com escala de cinza, estudos Doppler (colorido e espectral) e elastografia cerebral baseada em ultrassom (por ondas de cisalhamento), em regiões de interesse específicas (ROIs): substância branca profunda, substância branca superficial, corpo caloso, gânglios basais e substância cinzenta cortical. A elastografia cerebral foi usada para estimar a rigidez do parênquima cerebral, que é um quantificador indireto do conteúdo cerebral de mielina.

Resultados: Foram incluídas 219 crianças de gravidez unifetal, incluindo 201 de mães expostas à infecção por SARS-CoV-2 e 18 de controles não expostos. A avaliação por neuroimagem foi realizada aos 6 meses de idade cronológica ajustada e demonstrou 18 exames de escala de cinza e 21 exames Doppler anormais. Os achados predominantes foram hiperecogenicidade da substância branca profunda do cérebro e gânglios basais (núcleos caudados/tálamo), bem como redução nos índices de resistência e pulsatilidade do fluxo arterial intracraniano. A circulação cerebral anterior (artérias cerebrais média e pericalosa) apresentou uma gama mais ampla de variação do fluxo quando comparada à circulação posterior (artéria basilar). A análise de elastografia cerebral por onda de cisalhamento demonstrou redução dos valores de Elasticidade (E) no grupo exposto ao SARS-CoV-2 em todas as regiões de interesse analisadas, especialmente nos coeficientes de elasticidade da substância branca profunda ($3,98 \pm 0,62$) em comparação com o grupo controle ($7,76 \pm 0,77$; p-valor $<0,001$).

Conclusão: Esse estudo caracteriza alterações estruturais encefálicas pediátricas associadas à infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez. A infecção materna está associada ao acometimento predominante da substância branca profunda, com hiperecogenicidade regional

e redução dos coeficientes de elasticidade, sugerindo diminuição do conteúdo de mielina nas regiões afetadas. Os achados morfológicos em tais casos podem ser sutis, e estudos funcionais, como Doppler e elastografia, têm-se mostrado ferramenta valiosa para identificar com mais precisão quais crianças possuiriam maior risco para danos neurológicos com potencial repercussão clínica.

Palavras-chave: COVID, SARS-CoV-2, gravidez, neonatologia, ultrassonografia, elastografia, neuroimagem.

ABSTRACT

Background: SARS-CoV-2 infection and perinatal neurological outcomes are still not completely understood. However, there is recent evidence of white matter disease and impaired neurodevelopment in newborns after maternal SARS-CoV-2 infection. These appear to occur as consequence of both direct viral effects and systemic inflammatory response, with glial cells / myelin involvement and regional hypoxia / microvasculature disruption. We sought to characterize consequences of the maternal and fetal inflammatory condition in the central nervous system of newborns post SARS-CoV-2 maternal infection.

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

Results: A total of 219 single-pregnancy children were enrolled, including 201 from mothers exposed to SARS-CoV-2 infection and 18 from unexposed controls. Neuroimaging evaluation was performed at 6 months of adjusted chronological age, and it demonstrated 18 grayscale and 21 Doppler abnormal exams. Predominant findings were hyper echogenicity of deep brain white matter and basal ganglia (caudate nuclei / thalamus), and reduction in resistivity and pulsatility index of intracranial arterial flow. Anterior brain circulation (middle cerebral and pericallosal arteries) displayed wider range of flow variation than posterior circulation (basilar artery). Shear-wave US elastography analysis demonstrated reduction of stiffness values in SARS-CoV-2 exposed group at all analyzed regions of interest, especially in the deep white matter elasticity coefficients (3.98 ± 0.62) compared to control group (7.76 ± 0.77); p-value<0.001.

Conclusion: This study further characterizes pediatric structural encephalic changes associated with SARS-CoV-2 infection during pregnancy. Maternal infection has shown to be related to cerebral deep white matter predominant involvement, with regional hyper echogenicity and reduction of elasticity coefficients, suggesting zonal impairment of myelin content. Morphological findings may be subtle, and functional studies such as Doppler and

elastography may be a valuable tool for identifying more accurately which infants are at risk of neurological damage.

Keywords: COVID, SARS-CoV-2, pregnancy, neonatology, ultrasound, elastography, neuroimaging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia Normal (a-d). Imagem ultrassonográfica de alta resolução do encéfalo em secção coronal, demonstrando a aparência normal dos sulcos corticais e giros.....	39
Figura 2 - Anatomia Normal (e-h). Imagem ultrassonográfica de alta resolução do encéfalo em secção sagital, demonstrando a aparência normal dos sulcos corticais e giros	42
Figura 3 - Leucomalácia periventricular (LPV) em neonato pré-termo com 21 dias de vida e idade gestacional de 28 semanas ao nascimento. As imagens coronais (a) e sagitais (b) exemplificando lesões hiperecóticas dispersas e bem definidas na substância branca periventricular, compatível com LPV aguda/subaguda. Duas semanas após - ultrassonografia cerebral de acompanhamento (c, d) evidencia áreas correspondentes com redução da ecogenicidade, consistentes com a evolução da LPV nos planos coronal (c) e sagital (d)	44
Figura 4 -Encefalopatia hipóxico-isquêmica com padrão de lesão central. Recém-nascido a termo com descolamento completo da placenta. Imagens coronais (a) e parasagitais (b, c) através da fontanela anterior. Ultrassonografia cerebral de acompanhamento realizada em 48 horas (c-f) demonstra evolução/maturação intervalar da isquemia, agora estabelecida em todos os gânglios basais e tálamos, novamente de maneira bilateral e simétrica (d,e)	46
Figura 5.1 - Ultrassonografia e ressonância magnética (RM) demonstrando diferentes graus de HMG-IV (hemorragia no leito vascular germinal-intraventricular). (a) Ultrassonografia cerebral parasagital através dos ventrículos laterais - hemorragia de grau I. (b) Imagem axial ponderada em T2 por ressonância magnética - hemorragia de grau I nos dois ventrículos laterais. (c) Ultrassonografia cerebral parasagital através dos ventrículos laterais - hemorragia de grau II. (d) Imagem axial ponderada em T2 por ressonância magnética - hemorragia de grau II no ventrículo lateral esquerdo.....	47
Figura 5.2 - (e) Ultrassonografia cerebral parasagital através dos ventrículos laterais - hemorragia de grau III. (f) Imagem axial ponderada em T2 por ressonância magnética - hemorragia de grau III no ventrículo lateral esquerdo e hemorragia de grau II no ventrículo lateral direito. (g) Ultrassonografia cerebral coronal - hemorragia de grau IV ou infarto hemorrágico periventricular. (h) Desenho representando a classificação por ultrassonografia da hemorragia no leito vascular germinal-intraventricular (HMG-IV)	48

Figura 6. - (a e b) Seio sagital superior. Visão sagital através da fontanela anterior mostra a aparência normal do seio sagital superior	49
Figura 7 - (a e b) Seio sagital superior. Visão coronal através da fontanela anterior mostra a aparência normal do seio sagital superior	50
Figura 8 - Polígono de Willis. Corte coronal através da fontanela anterior, demonstrando a anatomia normal do polígono de Willis	50
Figura 9 - Avaliação por Doppler das artérias cerebrais médias. Visão coronal através da fontanela anterior mostra o padrão de onda normal da artéria cerebral média esquerda.....	51
Figura 10 - Imagem de onda de cisalhamento bidimensional em cortes coronais do cérebro neonatal. As imagens por onda de cisalhamento (SWE – shear wave elastography) foram realizadas nos núcleos da base, e o módulo de elasticidade de Young e a velocidade da onda de cisalhamento foram medidos. (a-c): medidas adequadas na substância branca, tálamo, e núcleo caudado, respectivamente. (d) amostra insuficiente na escala de cores da elastografia, com dados artefatuais. (e) medida inadequada com transição abrupta de cores na mesma região de interesse.....	55
Figura 11 - Elastografia de US por onda de cisalhamento com mapa de cores na região dos gânglios da base e substância branca profunda, demonstrando a aquisição de medidas em seis regiões de interesse (ROIs circulares), no plano coronal	59
Figura 12 - Elastografia de US por onda de cisalhamento com mapa de cores na região do tálamo e núcleos caudados, demonstrando a aquisição de medidas em quatro regiões de interesse (ROIs circulares), no plano coronal	67
Figura 13 - Elastografia US por onda de cisalhamento com mapa de cores na região do córtex, substância branca subcortical, núcleo caudado e tálamo, demonstrando a aquisição de medidas em quatro regiões de interesse (ROIs circulares), no plano sagital. Medições do módulo elástico nas regiões de interesse expressas em quilopascals (kPa).....	68
Figura 14 - Elastografia de US por onda de cisalhamento com mapa de cores na região da interface córtico-subcortical, incluindo substância cinzenta cortical frontal, substância branca justacortical e substância branca profunda, demonstrando a aquisição de medidas em três regiões de interesse (ROIs circulares), no plano coronal.	69
Figura 15 - Elastografia US modo onda de cisalhamento com mapa de cores na região de interface cortical-subcortical, incluindo substância cinzenta cortical frontal, substância branca justacortical, substância branca profunda e gânglios da base, mostrando a variação do mapa de cores de acordo com o módulo de elasticidade de (E) numa paciente cuja mãe foi exposta à infecção por SARS-Cov-2 durante a gravidez.....	70

Figura 16 - Imagens de ultrassonografia transcraniana em modo B (escala de cinza) corte coronal para avaliação da substância branca profunda via fontanela anterior; e Dopplerfluxometria das principais artérias intracranianas	76
Figura 17 - Imagens de ultrassonografia transcraniana em modo B (escala de cinza) coronal sobre a fontanela anterior, com Doppler colorido e espectral para avaliação de índices hemodinâmicos na artéria cerebral média.	77
Figura 18 - Imagens de ultrassonografia transcraniana em modo B (escala de cinza) sagital sobre a fontanela anterior, com Doppler colorido e espectral para avaliação dos índices hemodinâmicos na artéria pericalosa.	77
Figura 19- Imagens de ultrassonografia transcraniana em modo B (escala de cinza) coronal sobre a fontanela anterior, com Doppler colorido e espectral para avaliação dos índices hemodinâmicos da artéria basilar.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de imagem avaliados em lactentes, distribuídos entre grupos exposto (casos) e não-exposto (controle) ao SARS-CoV-2 durante a gestação, distribuídos de acordo com a gravidade da infecção materna (categorias de gravidade COVID-19 de acordo com a classificação da OMS)	79
Tabela 2. Parâmetros de neuroimagem (ultrassonografia modo-B e Doppler espectral) avaliados em lactentes, distribuídos entre grupos exposto (casos) e não-exposto (controle) ao SARS-CoV-2 durante a gestação, distribuídos de acordo com a Escala de gravidade da COVID-19 materna segundo a classificação da OMS	80
Tabela 3. Parâmetros de neuroimagem (ultrassonografia modo-B e Doppler espectral) avaliados em lactentes, distribuídos entre grupos exposto (casos) e não-exposto (controle) ao SARS-CoV-2 durante a gestação	81
Tabela 4. Parâmetros de neuroimagem avaliados nos lactentes, distribuídos entre grupos exposto (casos) e não-exposto (controle) ao SARS-CoV-2 durante a gestação, de acordo com as regiões de interesse (ROIs) para análise elastográfica: substância branca profunda (DWM), substância branca frontal subcortical (FWM), núcleos caudados e tálamos, corpo caloso, e córtex frontal	83
Tabela 5. Parâmetros de neuroimagem avaliados em lactentes, distribuídos entre grupos exposto (casos) e não-exposto (controle) ao SARS-CoV-2 durante a gestação, controlados para GA (idade gestacional) e BW (peso ao nascimento), de acordo com as regiões de interesse (ROIs) para análise por Elastografia: substância branca profunda (DWM), substância branca frontal subcortical (FWM), núcleos caudados e tálamos, corpo caloso, e córtex frontal	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACA: Artéria cerebral anterior

ACE2: Enzima Conversora da Angiotensina-2 (do inglês *Angiotensin Converting Enzyme-2*)

ACM: Artéria cerebral média

ADEM: Encefalomielite disseminada aguda (do inglês *Acute Disseminated Encephalomyelitis*)

AGT: Amnésia global transitória

AINE: Anti-Inflamatório Não Esteroidal

Ang II: Angiotensina II

Anti- β 2GPI: Anti-beta 2 Glicoproteína I

APTEM: Teste confirmatório contendo antifibrinolítico que confirma a presença de fibrinólise

ARDS: Síndrome Respiratória Aguda (do inglês *Acute Respiratory Distress Syndrome*)

AST: Aspartato aminotransferase

AT1R: Receptor tipo 1 da Angiotensina II (do inglês *Angiotensin II type 1 receptor*)

AT2R: Receptor tipo 2 da Angiotensina II (do inglês *Angiotensin II type 2 receptor*)

ATP: Adenosinatrifosfato (do inglês *Adenosine TriPhosphate*)

AVC: Acidente vascular cerebral

AUC: Área sob a Curva (do inglês *Area Under the Curve*)

BATF: Gene transcricional (do inglês *Basic leucine zipper Transcription Factor*)

BNP: Peptídeo Natriurético Cerebral (do inglês *Brain Natriuretic Peptide*)

BCoV: Coronavírus Bovino (do inglês *Bovine CoronaVirus*)

C3: Componente 3 do Complemento (do inglês *Complement Component 3*)

CAHA: Anormalidades Hemostáticas Associadas à COVID-19 (do inglês *COVID-19 Associated Hemostatic Abnormalities*)

CART Cell therapy: Terapia com Células T com Receptores de Antígeno Quimérico (do inglês *Chimeric antigen receptor T cell therapy*)

CK: Creatina quinase (do inglês *creatine kinase*)

COVID-19: Doença por coronavírus 2019

DWM: Substância branca profunda (do inglês *Deep White Matter*)

ECMO: Oxigenação por membrana extracorpórea (do inglês *Extracorporeal Membrane Oxygenation*)

FDG-PET: Tomografia por emissão de pósitrons com fluorodesoxiglicose

FLAIR: do inglês *Fluid attenuated inversion recovery*

FWM: Substância branca frontal subcortical (do inglês *Frontal White Matter*)

HMG-IV: Hemorragia de matriz germinativa e intra-ventricular

IC: Intervalo de confiança

IIQ: Intervalo interquartil

IR: Índice de resistência

IP: Índice de pulsatilidade

LCR: Líquido cefalorraquidiano

LPV: Leucomalácia periventricular

MISC: Síndrome inflamatória multissistêmica em crianças

OMS: Organização Mundial de Saúde

RCVS: Síndrome de vasoconstricção cerebral reversível (do inglês *Reversible Cerebral Vasoconstriction Syndrome*)

RM / MRI: Ressonância magnética (do inglês *Magnetic Resonance Imaging*)

ROI: Região de interesse para amostra (do inglês *Region of Interest*)

SARS: Síndrome Respiratória Aguda Grave (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*)

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

SARS-CoV-2: Síndrome Respiratória Aguda Grave por Coronavírus 2

SDRA: Síndrome do desconforto respiratório agudo

SGB: Síndrome de Guillain-Barré

SLPR: Síndrome de Leucoencefalopatia Posterior Reversível (do inglês *Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome*)

SWE: Elastografia por onda de cisalhamento (do inglês *Shear Wave Elastography*)

TC: Tomografia Computadorizada

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TEP: Tromboembolismo pulmonar

TVC: Trombose venosa cerebral

US: Ultrassonografia

USTF: Ultrassonografia transfontanelar (craniana)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1.Revisão de literatura.....	21
1.2.COVID-19 e sintomas neurológicos em crianças.....	21
1.3.Avaliação Encefálica por Ultrassonografia modo B e Doppler Intracraniano.....	33
1.4.Avaliação Encefálica por Elastografia.....	57
2. JUSTIFICATIVA.....	60
3. OBJETIVOS.....	61
3.1.Objetivo primário.....	61
3.2.Objetivos secundários.....	61
4. METODOLOGIA.....	62
4.1.Desenho do estudo.....	62
4.2.Estimativa do tamanho da amostra.....	62
4.3.População.....	63
4.4.Coleta de Dados.....	64
4.5.Dados de neuroimagem.....	64
4.6.Armazenamento de Dados.....	71
4.7.Análise Estatística.....	71
4.8.Ética em pesquisa.....	72
5. RESULTADOS.....	73
5.1.Perfil da amostra avaliada.....	73
5.2.Achados de imagem por modalidade.....	74
6. DISCUSSÃO.....	87
6.1.Evidências gerais.....	87
6.2.Achados ultrassonográficos (escala de cinza)	88
6.3.Achados hemodinâmicos (avaliação Doppler)	89
6.4.achados de elastografia encefálica.....	89
6.5.Limitações.....	93
7. CONCLUSÃO.....	94
8. PERSPECTIVAS.....	95
9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA (artigos publicados)	96
10. REFERÊNCIAS.....	97

APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL COM DADOS DE NEUROIMAGEM Qualis Capes A2–FI 3,24	114
APÊNDICE B – PROTOCOLO PROUDEST - Qualis Capes A4 – FI 1,25	131
APÊNDICE C - QUALIS CAPES A1 – FI 7.30	142
ANEXO A – PARECER DO CEP	157
ANEXO B – FICHA CLÍNICA	162
ANEXO C – TCLE	167

1. INTRODUÇÃO

1.1 Revisão da literatura

SARS-CoV-2 e COVID-19

Os coronavírus são importantes patógenos em humanos e animais. No final de 2019, um novo coronavírus foi identificado como causa de um surto de casos de pneumonia em Wuhan, uma cidade na província de Hubei, na China. O vírus rapidamente se espalhou, resultando em uma epidemia em todo o país, seguida por uma pandemia global. Em fevereiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) designou a doença como COVID-19, que significa doença por coronavírus 2019 [1]. O vírus que causa a COVID-19 é designado coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2); anteriormente referido como 2019-nCoV [2]. Em maio de 2023, a OMS declarou o fim da emergência global de saúde da COVID-19, mais de três anos após seu surgimento.

Os coronavírus (CoV) pertencem à família Coronaviridae, ordem dos Nidovirales. Esses vírus são envelopados, possuem um genoma de RNA de fita simples de sentido positivo e são classificados em quatro gêneros: alfa, beta, gama e delta. Os CoV alfa, beta e delta infectam mamíferos. No entanto, todos eles possuem a capacidade de se intercambiar entre as espécies, levando ao surgimento de síndromes respiratórias graves em humanos, como a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) causada por MERS-CoV, a síndrome respiratória aguda grave (SARS) causada pela SARS-CoV e, mais recentemente, COVID-19, causado pelo SARS-CoV-2 [3]. O conhecimento sobre as consequências da infecção pelo vírus SARS-CoV-2 e a síndrome clínica multisistêmica COVID-19 se amplia gradualmente à medida que novos estudos clínicos são concluídos. Pouco se conhece sobre a totalidade de seus efeitos na gestação, puerpério e na saúde da mãe e do feto, assim como sobre o impacto no desenvolvimento em longo prazo dos filhos de mães contaminadas durante a gestação.

Com base nos dados descritos até o momento, o quadro clínico da COVID-19 no recém-nascido e em pacientes pediátricos não parece diferir do observado fora desse período. Em uma maior proporção dos casos, os sintomas da COVID-19 são clinicamente indistinguíveis dos sintomas da gripe comum. Uma proporção menor de casos graves apresenta doença mais intensa do trato respiratório inferior, muitas vezes necessitando de suporte respiratório. Dados iniciais de estudos prospectivos sugerem, ainda, que uma proporção substancial de pacientes

desenvolve complicações neurológicas associadas à COVID-19 [4].

Dados de uma série de pacientes de Wuhan, na China, indicam que anormalidades neurológicas são encontradas em 36,4% dos pacientes hospitalizados [5]. É provável que esse número possa variar dependendo de vários fatores, como contexto clínico (pacientes ambulatoriais versus pacientes internados), características demográficas (idade, sexo, etnia) e metodologia de avaliação neurológica. O mecanismo de acometimento neurológico na COVID-19 ainda precisa ser determinado, mas é provavelmente heterogêneo e multifatorial, incluindo efeitos direto e indiretos no encéfalo devido ao SARS-CoV-2, fatores autoimunes, inflamação ("tempestade de citocinas"), drogas e seus efeitos colaterais, distúrbios metabólicos e neuropatia de cuidados intensivos [6]. Os dados de Wuhan mostram que a maioria das complicações tem início precoce, sugerindo que a rápida evolução da reação inflamatória sistêmica com consequente envolvimento do sistema nervoso pode ser um fator relevante. Alguns estudos preliminares com análise histopatológica de tecido encefálico também evidenciaram infecção direta de neurônios e células da glia pelo vírus SARS-CoV-2 [5]. A infecção materna por SARS-CoV-2 não expõe o feto e neonato apenas aos possíveis efeitos causados diretamente pelo vírus. As consequências da resposta inflamatória materna e fetal, com produção de citocinas potencialmente citotóxicas, assim como o efeito do uso de medicações antivirais não foram amplamente estudadas até o presente. Tampouco ainda se conhecem as consequências de longo prazo no período pós-natal, sobretudo no que concerne às possíveis alterações neuroestruturais e ao processo de desenvolvimento neuropsicomotor após o período de infecção aguda. Há evidências de que complicações vasculares podem surgir, em sua maioria, devido à reconhecida tempestade inflamatória, que reflete uma hiperativação de fatores inflamatórios e disfunção do sistema de coagulação, especialmente dímero-D e anormalidades plaquetárias. Aumenta-se, assim, o risco de doenças cerebrovasculares, meningoencefalite e encefalopatia hipóxico-isquêmica, com alterações na dinâmica de fluxo sanguíneo intracraniano e hipóxia cerebral mediada por síndrome inflamatória sistêmica, ainda pouco estudadas em crianças [7,8].

Em relação às sequelas de longo prazo sobre o sistema nervoso na faixa pediátrica, muito ainda se necessita esclarecer em termos de alterações morfológicas e funcionais. Tais alterações podem, potencialmente, ocasionar desfechos adversos sobre o neurodesenvolvimento na faixa etária pediátrica, sendo essenciais estudos de seguimento clínico longitudinal aliados à análise morfoestrutural por neuroimagem.

COVID-19 e Neuropatogênese

Os mecanismos subjacentes das complicações neurológicas em pacientes com COVID-19 são diversos e, em alguns casos, multifatoriais. Complicações neurológicas agudas frequentemente são resultado de resposta sistêmica à infecção ou disfunção imunológica [9,10]. Complicações neurológicas tardias ou crônicas podem estar relacionadas a uma resposta inflamatória persistente, disfunção imunológica ou susceptibilidade genética. Mecanismos neuropatológicos distintos, mas provavelmente sobrepostos, incluem:

-Lesão neurológica devido à disfunção sistêmica: Pacientes com COVID-19 grave que são hospitalizados devido a comprometimento respiratório e/ou falência de outros órgãos podem desenvolver encefalopatia ou outros sintomas neurológicos devido à hipoxemia. A doença grave também pode levar a lesões neurológicas agudas causadas por distúrbios metabólicos associados ou efeito de medicamentos. Em uma série de casos de pacientes que faleceram devido a infecção grave por COVID-19, danos hipóxico-isquêmicos agudos estavam presentes em quase todos os pacientes, bem como a presença de infartos cerebrais com ou sem complicação hemorrágica foram achados frequentes [10]. A ativação microglial com nódulos microgliais e neuronofagia foi identificada em séries de autópsias [11,12]. Em outras séries, os achados de neuroimagem pareciam consistentes com uma leucoencefalopatia pós-hipóxica tardia e foram semelhantes aos descritos em pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) não relacionada à COVID-19 [13].

-Disfunção imunológica: a resposta imunológica desregulada ao vírus SARS-CoV-2 tem sido implicada na gênese de sintomas neurológicos [14,15]. Pacientes gravemente enfermos com COVID-19 podem desenvolver sinais de inflamação sistêmica grave consistente com uma apresentação semelhante à síndrome de liberação de citocinas, que se manifesta com febre persistente e evidências laboratoriais de marcadores inflamatórios elevados (por exemplo, D-dímero, ferritina) e citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, fator de necrose tumoral periférico [TNF], TNF-alfa e interleucina 6 [IL-6]) [16,17]. Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes podem causar confusão e alteração da consciência [18,19]. A liberação de citocinas também pode levar a lesões cerebrais por ativação microglial e resposta inflamatória sistêmica. Em séries de casos e relatos clínico-patológicos, foram encontrados nódulos microgliais, neuronofagia e expressão neuronal aumentada de citocinas (IL-1 beta e IL-6) em tecido cerebral, sem evidência de invasão viral direta [20,21]. A ativação microglial para fagocitar neurônios submetidos a hipoxia também foi observada em outras infecções virais.

O estado pró-inflamatório também pode estar associado à trombofilia

("tromboinflamação"), aumentando o risco de acidente vascular cerebral e outros eventos trombóticos [22]. O SARS-CoV-2 utiliza a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2), uma proteína ligada à membrana celular, como seu ponto de entrada nas células. Ao se ligar à ACE-2, o vírus SARS-CoV-2 pode danificar células endoteliais vasculares, inibindo a função mitocondrial e a atividade da NOS (óxido nítrico sintetase) endotelial, resultando em dano vascular endotelial, complicações cardíacas e cerebrovasculares [23]. A ativação do complemento também pode levar a lesões microvasculares trombóticas em pacientes com COVID-19 grave [24]. Uma resposta imunológica exacerbada também pode persistir após a infecção aguda e contribuir para uma recuperação tardia. Um estudo que avaliou o líquido cefalorraquidiano (LCR) de participantes com sintomas cognitivos persistentes 9 meses após a infecção por COVID-19 encontrou que os pacientes com sintomas cognitivos persistentes tinham maior probabilidade de apresentar anormalidades no LCR do que os controles (77% [10 de 13 pacientes] versus nenhum [0 de 4 pacientes]) [25].

Sintomas agudos e crônicos têm sido relacionados à presença de marcadores autoimunes em alguns estudos [26], incluindo autoanticorpos contra proteínas imunomodulatórias [27]. A COVID-19 tem sido implicada como gatilho para complicações mediadas por autoimunidade, incluindo a síndrome de Guillain-Barré (GBS), mielite transversa e encefalite autoimune. A evolução temporal dos sintomas neurológicos em comparação aos sintomas iniciais da infecção por COVID-19 sugere que a síndrome de Guillain-Barré ocorre como uma complicação parainfecciosa na maioria dos pacientes, em vez de uma complicação pós-infecciosa. Em um caso, a fraqueza precedeu o início da febre e dos sintomas respiratórios [28]. Outros relatos de caso descrevem um intervalo mais longo entre o início da doença viral e a fraqueza, consistente com sua ocorrência como uma complicação pós-infecciosa. A ligação do SARS-CoV-2 ao receptor ACE-2 nas células endoteliais também pode levar a lesões mediadas por imunidade com a geração de imunocomplexos [12].

-Invasão viral direta do sistema nervoso - Poucos relatos fornecem evidências de invasão viral direta do sistema nervoso [29-31]. Em séries de casos post-mortem, o SARS-CoV-2 foi detectado em algumas amostras encefálicas, porém a detecção do vírus nessas amostras não demonstrou relação com a gravidade dos achados neuropatológicos, e pode representar contaminação hematogênica durante a autópsia [27,28]. Isso sugere que a lesão neural pode ser devida a uma resposta inflamatória sistêmica desencadeada pelo vírus SARS-CoV-2, em vez de infecção tecidual direta. É incerto, todavia, se o SARS-CoV-2 infecta diretamente os vasos cerebrais. Estudos de autópsia com pequena amostragem relataram potenciais evidências de invasão endotelial direta pelo vírus SARS-CoV-2, com uma possível endotelite associada no

pulmão, coração, rim, fígado e intestino delgado [32,33]. No entanto, tais achados permanecem controversos, uma vez que estruturas na microscopia eletrônica consideradas como partículas virais no endotélio de vasos sanguíneos no rim podem na verdade ser estruturas normais ou artefatos [34,35]. Estudos neuropatológicos não confirmaram uma vasculite cerebral franca por SARS-CoV-2 [14].

-Neurodegeneração – Alterações neuronais em regiões límbicas e outras áreas cerebrais foram relatadas em pacientes com infecção prévia por COVID-19. Entre 785 participantes do estudo do Biobanco do Reino Unido com imagens de base e acompanhamento, as alterações estruturais foram mais comuns naqueles que haviam tido infecção por COVID-19 [36]. As imagens de acompanhamento foram realizadas em média 141 dias após a infecção por COVID-19. Pacientes com infecção por COVID-19 apresentaram maiores reduções na conectividade funcional e domínios estruturais (espessura da substância cinzenta nos córtex orbitofrontal e parahipocampal, e tamanho global do cérebro) em comparação com os controles. Em outro estudo, níveis elevados de biomarcadores associados à disfunção neuronal foram relatados em pacientes com sintomas neurológicos persistentes após infecção por COVID-19 leve ou grave [37]. Não está claro se essas mudanças estruturais são devidas a efeitos de longo prazo da infecção por COVID-19 ou ao impacto funcional da anosmia no córtex. A persistência desses achados e seu significado funcional a longo prazo também são incertos. Marcadores de doenças neurodegenerativas podem estar elevados em alguns pacientes com infecção por COVID-19. Em um estudo com 251 pacientes hospitalizados com COVID-19 (sem relato prévio de demência ou comprometimento cognitivo leve), aqueles com novos eventos neurológicos durante a hospitalização tinham mais chances de apresentar elevações em marcadores de neurodegeneração (por exemplo, proteína Tau, cadeia leve de neurofilamento, ubiquitina) [38]. Em outro estudo, níveis elevados de biomarcadores associados à disfunção neuronal foram relatados em pacientes com sintomas neurológicos persistentes após infecção por COVID-19 leve ou grave [37]. No entanto, os marcadores de neurodegeneração também podem estar elevados em outras infecções, e os efeitos a longo prazo desses achados em pacientes com infecção por COVID-19 permanecem incertos. São necessários mais estudos para avaliar o papel dessas descobertas em pacientes com sintomas neurológicos pós-COVID.

Complicações Neurológicas agudas

As manifestações neurológicas podem ocorrer em aproximadamente metade dos pacientes hospitalizados com COVID-19. No entanto, a frequência e gravidade das complicações neurológicas da COVID-19 identificadas no início da pandemia diminuíram devido à vacinação, à imunidade natural e às estratégias de distanciamento social, bem como devido ao efeito das formas variantes do SARS-CoV-2 que predominam em cada comunidade. Tipicamente, a fadiga, mialgias, disfunção do olfato/paladar e cefaleia parecem ser os sintomas mais comuns [6,9].

-Distúrbios do olfato e paladar - Anosmia e disgeusia têm sido relatadas como sintomas comuns em pacientes com COVID-19. Em uma meta-análise de 83 estudos envolvendo mais de 27.000 pacientes, a disfunção olfativa foi relatada em 48% (IC 95% 41,2-54,5) [39]. Esses sintomas podem ser uma manifestação inicial da COVID-19 e podem ocorrer na ausência de coriza ou congestão nasal; no entanto, raramente são as únicas manifestações clínicas da COVID-19.

A anosmia transitória pode estar relacionada a alterações inflamatórias nas células do epitélio nasal, em vez de lesão direta dos neurônios olfativos [40]. Alterações no sinal de ressonância magnética (MRI) em um ou ambos os bulbos olfativos foram descritas em pacientes com COVID-19, com frequente resolução nos exames de acompanhamento. [41-45]. Em um estudo baseado em MRI com 20 pacientes apresentando anosmia, foi identificada obstrução edematosa no segmento olfatório da cavidade nasal como possível fator causal para a perda olfativa [46,47]. Após acompanhamento por um mês, a recuperação da função olfativa se correlacionou com a melhora da obstrução.

Apesar das evidências obtidas até o momento, faltam dados robustos sobre o prognóstico a longo prazo. Em uma série de casos, entre os 33% dos pacientes afetados que recuperaram a função olfativa, a duração média dos sintomas foi de 8 dias [48]. Em uma pesquisa de pacientes não hospitalizados com disfunção olfativa na Itália, 83% relataram recuperação completa em média 37 dias após o início dos sintomas [49]. Entre 51 pacientes com anosmia que passaram por testes objetivos de olfato, a recuperação completa em 4 meses e 8 meses foi relatada em 84% e 96%, respectivamente [50]. Em alguns pacientes, a anosmia e disgeusia podem persistir por vários meses, juntamente com outros sintomas neurológicos ou sistêmicos após a infecção aguda por COVID-19 [51].

-Encefalopatia - A encefalopatia é comum em pacientes gravemente enfermos com COVID-19. A encefalopatia parece ser mais comum na COVID-19 do que em outras doenças respiratórias graves [52]. Em um estudo de coorte com 2.088 pacientes com COVID-19 admitidos em uma unidade de terapia intensiva, delirium foi o achado mais comum, ocorrendo em 55% dos pacientes [53]. Pacientes gravemente enfermos, incluindo aqueles com COVID-19, estão sujeitos a pelo menos as mesmas causas de encefalopatia que outros pacientes gravemente enfermos. Causas comuns de delírio agitado ou hipoativo são variadas e incluem encefalopatia metabólica tóxica, efeitos de medicamentos, doenças cerebrovasculares, e convulsões, dentre outras. A encefalopatia pode constituir parte da apresentação clínica inicial da COVID-19, ou componente clínico de outras condições neurológicas previamente existentes e potencialmente exacerbadas pela doença atual. Outras complicações neurológicas da COVID-19 que também podem causar encefalopatia incluem: acidente vascular cerebral isquêmico ou hemorrágico, encefalite, síndrome de leucoencefalopatia posterior reversível (SLPR), síndrome inflamatória multissistêmica, e doença desmielinizante pós-infecciosa [53]. A infecção grave por COVID-19 e comorbidades clínicas são fatores de risco comuns para encefalopatia. Em um estudo com 509 pacientes hospitalizados com COVID-19, 32% apresentavam encefalopatia, e esses pacientes eram mais velhos do que aqueles sem encefalopatia (66 versus 55 anos), tiveram menos tempo desde o início dos sintomas até a hospitalização (seis versus sete dias), e possuíam mais comorbidades (incluindo história de transtorno neurológico, câncer, doença cerebrovascular, doença renal crônica, diabetes, dislipidemia, insuficiência cardíaca, hipertensão ou tabagismo). Fatores associados a maior risco de delírio entre pacientes com COVID-19 internados em uma unidade de terapia intensiva incluíram ventilação mecânica, uso de vasopressores, uso de contenção, infusões contínuas de medicamentos benzodiazepínicos ou opioides, e falta de visita familiar [53].

Pacientes com COVID-19 podem desenvolver delírio e agitação proeminentes que requerem sedação; outros pacientes, de modo oposto, manifestam encefalopatia com sonolência e diminuição do nível de consciência [54,55]. Sinais do trato corticoespinal (por exemplo, hiperreflexia e reflexo plantar extensor) são comuns; convulsões focais ou generalizadas são descritas juntamente com encefalopatia em pacientes com COVID-19, assim como podem ocorrer na encefalopatia toxico-metabólica em outros cenários [56,57]. Na maioria dos casos, a encefalopatia se desenvolve em pacientes que ficam gravemente enfermos. Em casos excepcionais, o delírio pode ser uma característica da apresentação inicial da COVID-19, abrindo o quadro clínico, especialmente em pacientes idosos [58-61]. Também foram relatados casos de amnésia global transitória (AGT) associados a COVID-19, com lesões hipocampais

bilaterais, alguns casos de AGT ocorrendo inclusive como manifestação inicial da COVID-19 [62,63].

Achados de Neuroimagem - Um espectro de anormalidades de neuroimagem foi descrito em pacientes com encefalopatia relacionada à COVID-19; sendo que algumas dessas anormalidades indicam um diagnóstico subjacente alternativo (e/ou adicional) para o estado mental do paciente, como acidente vascular cerebral, encefalite, SLPR e outros [64-66]. Aproximadamente metade dos estudos de neuroimagem em pacientes com encefalopatia relacionada à COVID-19 demonstram uma anormalidade aguda, sendo as mais comuns a anormalidade do sinal cortical na sequência FLAIR, acidente vascular cerebral isquêmico agudo, realce leptomeningeo (geralmente sutil) e outras manifestações de encefalite [55,64,66-68]. Uma série de casos relatou achados de avaliação encefálica por ressonância magnética em 190 pacientes com COVID-19 grave, a maioria dos quais apresentavam sintomas consistentes com encefalopatia [64]. Após excluir pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico ou lesões crônicas não relacionadas, achados radiológicos anormais foram relatados em 37 pacientes. Os padrões de anormalidade na ressonância magnética incluíram lesões hiperintensas multifocais nas sequências ponderadas em T2 e difusão na substância branca ou no lobo temporal medial, frequentemente com micro-hemorragias associadas. Lesões hiperintensas na ressonância magnética foram relatadas no esplênio do corpo caloso em pacientes adultos com encefalopatia relacionada à COVID-19 [64,66,69,70], bem como em algumas crianças com síndrome inflamatória multissistêmica na COVID-19 [65].

-Doença cerebrovascular - Eventos cerebrovasculares parecem ser pouco frequentes durante infecções agudas por COVID-19, e sua incidência, categorizada por subtipo de acidente vascular cerebral (AVC), foi estudada em diversas séries retrospectivas, conforme mencionado a seguir:

- Acidente vascular cerebral isquêmico: apresenta taxas de incidência variando de 0,4% a 2,4% [71-76].
- Hemorragia intracraniana: revela incidências de 0,2% a 0,9% [74,75].
- Trombose venosa cerebral (TVC): apresenta uma incidência de 0,08% [76,77].

O risco de AVC, por sua vez, demonstra relação com a gravidade clínica da COVID-19. Inicialmente, estudos de casos indicaram que para pacientes com doença leve, o risco seria inferior a 1%, enquanto que para aqueles em estado grave, especialmente em terapia intensiva, o risco poderia alcançar até 6% [54]. Em termos de evolução temporal, o AVC ocorre predominantemente entre uma e três semanas após o início dos sintomas da COVID-19.

Entretanto, é relevante notar que em alguns casos o AVC pode ser o sintoma inaugural que conduz à hospitalização, embora isso ocorra em uma porção minoritária de pacientes [78-80]. A análise demográfica revela que a idade média dos pacientes com COVID-19 e AVC assemelha-se à daqueles sem COVID-19. Em uma revisão sistemática de 10 estudos com 160 pacientes de COVID-19 e AVC isquêmico, a média de idade encontrada foi de 65 anos [81]. Um registro nacional de AVC nos Estados Unidos, incluindo 1.143 pacientes com COVID-19 e AVC agudo, mostrou uma média de idade na apresentação de 68 anos, comparada a 71 anos para pacientes sem COVID-19 durante o mesmo período [82]. A persistência do risco cerebrovascular além do período agudo foi observada em um estudo abrangente, com cerca de 5,8 milhões de veteranos nos Estados Unidos. Esse estudo revela uma incidência maior de AVC após um ano em pacientes com histórico de infecção por COVID-19 em comparação com controles (risco relativo 1,52, IC 95% 1,4-1,6) [83]. Pacientes hospitalizados com COVID-19 apresentam um risco cerebrovascular mais elevado do que aqueles com sintomas menos graves. A etiologia desse achado é incerta, podendo envolver um estado pró-inflamatório generalizado, disfunção endotelial após a infecção viral ou um manejo insuficiente dos fatores de risco vasculares durante a pandemia. Em relação aos fatores de risco para evento cerebrovascular em pacientes com infecção por SARS-CoV-2 ou COVID-19 estabelecida, estudo demonstraram que fatores de risco tradicionais para AVC, como hipertensão e diabetes, são predominantes em pacientes com AVC isquêmico associado à COVID-19 [84].

A hipercoagulabilidade e o estado pró-inflamatório associados à infecção parecem desempenhar um papel crucial. Marcadores elevados de hipercoagulabilidade e inflamação, incluindo níveis significativos de D-dímero, foram observados em pacientes com COVID-19 grave, especialmente naqueles com AVC isquêmico. [85-87]. Níveis de D-dímero superiores a 10.000 ng/mL foram sugeridos como um indicativo de AVC criptogênico potencialmente atribuível à hipercoagulabilidade induzida pela COVID-19 [88]. Evidências indicam que infecções graves, incluindo COVID-19, podem desencadear AVC agudo, possivelmente devido ao aumento da inflamação e trombose associados [89-91]. A COVID-19 parece apresentar um risco maior de AVC isquêmico em comparação com a influenza [92].

A coagulopatia e a anticoagulação estão associadas a hemorragias intracranianas, incluindo casos de hemorragia intraparenquimatosa e hemorragia subaracnoide espontâneas. Um estudo com 278 pacientes hospitalizados com COVID-19 e neuroimagem disponível identificou hemorragia intracerebral em 10 pacientes, a maioria tratada com anticoagulação em dose plena [45]. Algumas hemorragias podem representar eventos isquêmicos não

reconhecidos com subsequente conversão hemorrágica. Em um estudo com 3.824 pacientes hospitalizados com COVID-19, a hemorragia intracerebral foi relatada em 33 pacientes (0,9%) [93]. Com base na aparência radiológica, aproximadamente 75% dessas hemorragias parenquimatosas podem ter resultado de transformação hemorrágica do AVC isquêmico. A hemorragia intracraniana em pacientes com COVID-19 também tem sido associada ao uso de oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO) [94-96]. Em um registro internacional, 145 dos 2346 (6%) pacientes em ECMO com COVID-19 apresentaram hemorragia intracraniana. Pacientes em ECMO também possuem um risco aumentado de isquemia cerebral, incluindo isquemia causada por embolia gasosa [95].

A abordagem diagnóstica e conduta inicial devem seguir princípios semelhantes aos usualmente empregados para todos os pacientes com suspeita de AVC, com precauções adicionais relacionadas ao controle de infecções [97-99]. Terapias trombolíticas e de reperfusão devem ser consideradas para pacientes com AVC agudo, com ou sem COVID-19. Embora alguns dados observacionais sugiram um risco aumentado de hemorragia com trombólise e trombectomia em pacientes com infecção aguda por COVID-19 [100], é importante avaliarmos os riscos e benefícios. Além disso, pode haver um risco aumentado de reoclusão após a recanalização inicial em pacientes com COVID-19, possivelmente relacionado à hipercoagulabilidade associada à infecção por SARS-CoV-2. A terapia antitrombótica aguda deve ser adaptada ao perfil de risco do paciente. Pacientes com AVC isquêmico e uma indicação inequívoca para anticoagulação em dose completa podem iniciar o tratamento precocemente, desde que o risco de sangramento seja tolerável. Para outros pacientes com AVC isquêmico, o uso precoce de aspirina é geralmente indicado, independentemente do status de infecção por COVID-19 [100].

-Doenças neuromusculares e Síndrome de Guillain-Barré — Foram relatados casos raros de síndrome de Guillain-Barré (SGB) após infecção por COVID-19 [101-108]. No entanto, uma associação causal potencial entre a COVID-19 e o risco de SGB permanece incerta. Um estudo de coorte realizado no Reino Unido não demonstrou uma associação específica entre o SGB e a infecção por COVID-19 [109]. Nesse estudo, a incidência de SGB foi menor entre março e maio de 2020 do que nos mesmos meses dos quatro anos anteriores. Essa redução foi atribuída à redução da transmissão de outros gatilhos infecciosos devido às medidas de bloqueio social durante esse período. Dentre aproximadamente 1.200 pacientes com COVID-19 admitidos ao longo de um mês, em três hospitais do norte da Itália, foram identificados apenas cinco casos de SGB [101]. A maioria dos pacientes com SGB e COVID-19 apresentou fraqueza muscular progressiva ascendente que evoluiu ao longo de 1 a 4 dias [101]. O intervalo entre o início da

doença viral e o desenvolvimento da fraqueza muscular é de 5 a 16 dias, semelhante ao observado em outras infecções virais associadas a SGB [110]. Em um estudo de coorte prospectivo internacional, dentre 11 pacientes que desenvolveram SGB após infecção por COVID-19, 73% apresentaram alterações sensoriais e motoras, incluindo paralisia facial em 64% dos casos [106]. Em outras séries, a síndrome de Miller Fisher e outras formas variantes de SGB também foram descritas em pacientes com COVID-19 [111,112].

Outras síndromes neurológicas e neuromusculares agudas encontradas em quadros de COVID-19:

-Meningoencefalite — A meningoencefalite viral foi relatada em pacientes que apresentaram encefalopatia ou convulsões e COVID-19. A análise do líquido cefalorraquidiano identificou o SARS-CoV-2 em alguns pacientes, mas não em todos os casos. [113-117]. Outros casos de encefalite do tronco cerebral ou cerebelite isolada foram relatados em adultos e crianças com infecção por COVID-19 [118-122]. Nesses casos, uma causa inflamatória parainfecciosa foi sugerida como fator adicional na gênese dos sintomas. Alguns pacientes com doença fulminante e compressão do tronco cerebral receberam drenagem ventricular externa para hidrocefalia [120]. Um mecanismo autoimune foi postulado para alguns casos, posto que alguns pacientes desenvolvem síndromes clínicas e achados de ressonância magnética que parecem semelhantes à encefalite autoimune [123].

-Encefalomielite disseminada aguda (ADEM) e encefalopatia necrotizante hemorrágica aguda— Alguns relatos de casos descreveram pacientes com achados clínicos e de ressonância magnética consistentes com ADEM. Alguns pacientes tiveram mielite com ou sem envolvimento cerebral. Outros pacientes apresentam achados hemorrágicos consistentes com a variante de leucoencefalite hemorrágica da ADEM [124-127].

-Mielite transversa aguda — A paraparesia ou quadriparesia devido à mielite transversa aguda é uma complicação incomum, geralmente ocorrendo em adultos ou crianças sintomáticas dias a semanas após o início da infecção por COVID-19. Alguns pacientes também apresentam características clínicas e evidências diagnósticas de coexistência de ADEM ou neuropatias motoras agudas. [128-130].

-Mioclonia generalizada — A mioclonia generalizada pode ocorrer como uma complicação rara aparentemente pós-infecciosa da COVID-19. Em um estudo, a mioclonia generalizada desenvolveu-se em pacientes sintomáticos que não estavam gravemente doentes na época [131]. A mioclonia não pôde ser explicada pela hipóxia, causa metabólica ou efeito de drogas. Os pacientes foram tratados sintomaticamente com levotiracetam, valproato, clonazepam e/ou sedação com propofol e pareceram se recuperar gradualmente com imunoterapia, como

metilprednisolona e/ou plasmaférese.

-Síndrome de leucoencefalopatia posterior reversível (SLPR) — A SLPR foi relatada em pacientes com COVID-19 e pode ser devida à hipertensão e insuficiência renal em alguns casos. Em séries de casos de neuroimagem no início da pandemia, achados consistentes com RPLS foram observados em mais de 1% dos pacientes hospitalizados. [132-136].

-Síndrome de vasoconstrição cerebral reversível (RCVS) — A RCVS foi relatada em adultos e crianças com infecção por COVID-19. Características correspondentes na imagem cerebral de pacientes com apresentação clínica mais grave dessa síndrome incluíram hemorragia subaracnóidea, hemorragia intracerebral e acidente vascular cerebral isquêmico. [137-139].

-Convulsões e estado epiléptico — Novas convulsões e estado epiléptico podem ocorrer em pacientes com infecção grave por COVID-19. [140,141]. Em uma série de 32 pacientes com COVID-19 que foram hospitalizados com convulsões, 40% não possuíam histórico de epilepsia ou outros diagnósticos do sistema nervoso central. [142]. Em casos raros, as convulsões foram o sintoma de apresentação em pacientes sem sinais de infecção que testaram positivo para COVID-19. [142,143]. Uma revisão sistemática de séries de casos e relatos identificou 47 pacientes com COVID-19 que desenvolveram estado epiléptico. A maioria dos pacientes tinha sintomas respiratórios precedentes e nenhum histórico de convulsões anteriores. A neuroimagem foi anormal em aproximadamente metade dos pacientes e quatro pacientes tinham um teste positivo de SARS-CoV-2 no líquido cefalorraquidiano. [144].

-Miosite – Mialgia e fadiga são sintomas comuns na COVID-19, no entanto, a miosite parece ser rara. Três relatos de casos descreveram rabdomiólise com CK >12.000 unidades/L. [145-147]. Em um caso, a biópsia muscular de um paciente com COVID-19 e miopatia mostrou inflamação perivascular e deposição de proteína A de resistência a mixovírus, uma proteína induzida por interferon tipo I. [147].

-Neuropatias focais e multifocais – Várias síndromes de nervos periféricos e plexos foram relatadas em pacientes com COVID-19, incluindo paralisia do nervo facial, neuropatias dos músculos oculares, neuropatias dos nervos cranianos inferiores (por exemplo, vago, acessório espinhal, hipoglosso, síndrome de Tapia), neuropatias de múltiplos nervos cranianos, amiotrofia neurálgica, neuropatia autonômica ou disautonomia [148,154].

-Neuropatia e miopatia da doença crítica — Essa complicação ocorre em pacientes hospitalizados com doença grave, geralmente naqueles que são ventilados mecanicamente por vários dias. As características clínicas incluem fraqueza muscular flácida, muitas vezes com falha no desmame do suporte ventilatório. A neuropatia e miopatia da doença crítica tendem a se desenvolver tardiamente no curso da infecção por COVID-19 [155,156].

Sintomas Neurológicos persistentes / COVID longo

Pacientes em recuperação por formas graves da doença ou após hospitalização podem relatar sintomas neurológicos prolongados. Da mesma forma, alguns pacientes que foram hospitalizados com COVID-19 relatam sintomas que persistem por semanas a anos após a infecção aguda [157,158]. Além disso, pacientes com sintomas agudos mais leves de COVID-19 que nunca necessitaram de hospitalização devido a pneumonia ou hipoxemia também podem relatar sintomas neurológicos e sistêmicos prolongados [159-161].

Sintomas neurológicos comuns que podem interferir nas atividades diárias incluem comprometimento cognitivo, parestesia, dor de cabeça, disgeusia, anosmia, mialgia, tontura, visão turva e zumbido. Sintomas neurológicos persistentes com duração superior a 4 semanas após a infecção inicial podem fazer parte da síndrome de "COVID longa", também chamada de "sequelas pós-agudas da infecção por SARS-CoV-2". [162].

Também foi relatado que a infecção prévia por COVID-19 pode revelar sintomas de doença neurodegenerativa em indivíduos até então assintomáticos. Um estudo nacional na Suécia relatou que a demência, assim como muitas outras doenças crônicas, foi subdiagnosticada e subtratada durante a pandemia. [165]. A neuroimagem com ressonância magnética cerebral geralmente é normal em pacientes com sintomas neurológicos persistentes após a infecção por COVID-19. No entanto, estudos que utilizaram neuroimagem funcional com tomografia por emissão de pósitrons de fluorodesoxiglicose (FDG-PET) identificaram múltiplas áreas de redução no metabolismo da glicose em alguns pacientes com sintomas persistentes, incluindo regiões de interesse no giro orbitofrontal, hipocampo, amígdala, tálamo e córtex insular. [166-169].

1.2. COVID-19 e sintomas neurológicos em crianças

Exposição ao SARS-CoV-2 durante a gestação

O potencial para distúrbios no neurodesenvolvimento de crianças expostas intraútero ao SARS-CoV-2 é motivo de grande preocupação. Dada a grande quantidade de indivíduos expostos, mesmo um pequeno aumento no risco para o desenvolvimento neuropsicomotor adverso ainda teria um impacto significativo em termos de saúde pública. [170–176]. Mais de 59 milhões de pessoas nos Estados Unidos e 300 milhões em todo o mundo foram

diagnosticadas com a doença coronavírus 2019 (COVID-19), incluindo mais de 155.500 mulheres grávidas nos Estados Unidos. [176]. Com aproximadamente 140 milhões de nascimentos vivos ocorrendo anualmente em todo o mundo e a prevalência de positividade para o SARS-CoV-2 em mulheres grávidas chegando a 15% nos grandes centros urbanos, [177], o número de crianças expostas à infecção materna por COVID-19 in utero em todo o mundo poderia chegar a até 20 milhões por ano, especialmente diante da baixa adesão à vacina contra a COVID-19 em populações de grávidas inicialmente. [178,179]. De fato, um acompanhamento por 12 meses de mais de 7.000 partos em um grande sistema hospitalar, incluindo mais de 200 gestações expostas à COVID-19, sugeriu que a infecção pré-natal pelo SARS-CoV-2 está associada a um aumento no risco de diagnósticos neurodesenvolvimentais na prole. [180]. Existem várias vias potenciais pelas quais a infecção materna pelo SARS-CoV-2 pode afetar o cérebro fetal em desenvolvimento: [181–183] (a) via ativação imune materna durante janelas neurodesenvolvimentais chave na gravidez; (b) via infecção fetal direta de tecidos neurológicos por meio da transmissão transplacentária do vírus; ou (c) através de comprometimento da função placentária resultando em resultados adversos na gravidez associados a um aumento no risco de lesões neurológicas (por exemplo, restrição de crescimento fetal, descolamento / hematoma retroplacentário, e parto prematuro).

Evidências iniciais de desfechos adversos no neurodesenvolvimento em crianças expostas ao SARS-CoV-2 durante a gestação

Um conjunto crescente de evidências sugere que a infecção pelo SARS-CoV-2 pode causar sequelas neurológicas agudas e crônicas em populações pediátricas. Um estudo recente no Reino Unido sugere que 3,8% das crianças hospitalizadas com COVID-19 apresentam complicação neurológica com possíveis consequências a longo prazo, abrangendo desde alterações comportamentais, alucinações e encefalopatia até estado epilético, encefalite, síndromes de Guillain-Barré/desmielinização aguda, coreia e psicose. [184]. Achados precoces de desfechos neurodesenvolvimentais adversos aos 3–6 meses, 1 ano e 1,5 anos em bebês e crianças expostos ao SARS-CoV-2 intraútero, e/ou nascidos durante a pandemia de COVID-19 têm sido descritos. [185–189]. Um estudo de coorte longitudinal com 57 bebês expostos no período pré-natal ao SARS-CoV-2 na China identificou déficits no domínio sócio-emocional nos testes neurodesenvolvimentais aos 3 meses de idade. [188]. Um relatório preliminar de 298 bebês nascidos de mulheres com infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez encontrou evidências de atraso no desenvolvimento em 10% dos bebês aos 12 meses de idade, embora nenhum dos estudos incluísse um grupo controle não infectado [189]. Outro estudo preliminar de mais de 7.000 bebês nascidos durante a pandemia de COVID-19 de mães infectadas e não

infectadas pelo SARS-CoV-2 identificou uma associação entre a exposição materna ao SARS-CoV-2 e um alteração no neurodesenvolvimento aos 12 meses [180]. Importante destacar que esse estudo constatou que, embora a associação entre a exposição materna ao SARS-CoV-2 e atraso do neurodesenvolvimento na prole tenha sido agravada pelo parto prematuro, a presença de distúrbio do neurodesenvolvimento não foi totalmente explicada pela prematuridade, sugerindo um mecanismo de efeito mais específico do que simplesmente o SARS-CoV-2 contribuindo para complicações na gravidez. Ainda não sabemos se existe, de fato, uma conexão definitiva existe entre exposição pré-natal ao SARS-CoV-2 e distúrbios do neurodesenvolvimento na prole; em parte porque a maioria das crianças nascidas de mulheres infectadas ainda é muito jovem para um diagnóstico confiável de muitas condições patológicas do neurodesenvolvimento. Apesar das limitações significativas de conjuntos de dados epidemiológicos e clínicos na definição de causalidade ou mecanismo, esses dados preliminares demonstram o potencial da exposição pré-natal ao SARS-CoV-2 para impactar os desfechos precoces de neurodesenvolvimento.

Manifestações neurológicas da COVID-19 no período pós-natal

Manifestações neurológicas têm sido descritas em crianças hospitalizadas com COVID-19 aguda e podem representar risco de vida. [190-192].

Em um estudo multicêntrico transversal envolvendo 15.137 crianças hospitalizadas com COVID-19, 7% apresentaram uma ou mais complicações neurológicas, incluindo convulsões febris em 3,8%, convulsões não febris em 2,3% e encefalopatia em 2,2%; complicações neurológicas menos comuns incluíram abscesso cerebral, meningite bacteriana e infarto cerebral [190]. Outras manifestações neurológicas relatadas em estudos diversos incluem acidente vascular cerebral, infecção/desmielinização do sistema nervoso central, síndrome de Guillain-Barré/variantes, edema cerebral agudo fulminante, dor de cabeça, fraqueza, anosmia, ageusia e delírio. [191-194].

Embora a maioria das crianças com infecção sintomática aguda não-grave pelo SARS-CoV-2 se recupere dentro de uma a duas semanas a partir do início da doença, a deterioração clínica pode ocorrer subitamente após aproximadamente uma semana de sintomas, e tais casos requerem uma reavaliação clínica urgente, idealmente em um centro médico com experiência no cuidado de crianças com COVID-19. [195]. Em um estudo de coorte prospectivo com relato voluntário de sintomas por aplicativo móvel por um adulto responsável, a duração média da doença em 1.734 crianças que testaram positivo para o SARS-CoV-2 foi de seis dias (intervalo

interquartil [IIQ] de 3 a 11 dias), em comparação com três dias (IIQ de 2 a 7 dias) em uma coorte pareada de crianças que testaram negativo para o vírus; [196]. aproximadamente 2% dos pacientes de cada grupo procuraram um pronto-socorro ou foram hospitalizados. A duração média da doença pelo SARS-CoV-2 foi menor em crianças de 5 a 11 anos do que em crianças de 12 a 17 anos (5 versus 7 dias).

Um problema persistente na interpretação desses dados é a escassez de estudos com controles pareados - por exemplo, para entender se essas sequelas refletem efeitos diretos do SARS-CoV-2, ou simplesmente as consequências de qualquer doença grave que exija hospitalização. A análise de algumas casuísticas utilizando avaliações neurocognitivas sugeriu que o padrão de déficits encontrados foi inespecífico, consistente com um contexto clínico multifatorial em hospitalizações complicadas. Ainda assim, em conjunto, esses resultados sugerem pelo menos a possibilidade de que o SARS-CoV-2 - seja por meio de mecanismos inflamatórios ou imunomediados ou por meio de infecção direta do sistema nervoso central - possa ter um impacto prolongado ou permanente no cérebro desenvolvido (e, portanto, provavelmente também no cérebro em desenvolvimento).

Algumas complicações peculiares da COVID-19 em crianças têm sido descritas, tais como:

-Síndrome inflamatória multissistêmica em crianças (MISC) — A síndrome inflamatória multissistêmica em crianças (MISC) é uma condição rara, mas grave, associada à COVID-19. As características clínicas da MISC podem ser semelhantes às da doença de Kawasaki, síndrome de choque da doença de Kawasaki e síndrome do choque tóxico. Elas incluem febre persistente, hipotensão, sintomas gastrointestinais, erupção cutânea, miocardite e achados laboratoriais associados à inflamação aumentada; os sintomas respiratórios podem estar ausentes.

-Condição pós-COVID-19 ("COVID longa") em crianças

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), a Academia Americana de Pediatria e a Organização Mundial da Saúde (OMS) utilizam o termo abrangente "condição pós-COVID-19" para a ampla gama de sintomas e condições físicas e mentais persistentes, recorrentes ou novos que estão presentes além de 4 semanas após a infecção pelo SARS-CoV-2 (de qualquer gravidade); essa condição também é chamada de "COVID longa" ou "sequelas pós-agudas da infecção por SARS-CoV-2". [197-199].

A OMS fornece uma definição clínica consensual que pode ser aplicada a crianças de todas as idades e inclui: [199]

- Infecção pelo SARS-CoV-2 confirmada ou provável.

- Sintomas com duração maior ou igual a 2 meses, e que ocorreram inicialmente dentro de três meses após a COVID-19 aguda. Dentre o conjunto de sintomas, fadiga, alteração do olfato/anosmia e ansiedade foram mais frequentes entre as crianças com condição pós-COVID-19 do que entre os controles (sem condição pós-COVID-19); uma ampla gama de outros sintomas potenciais podem ocorrer (por exemplo, tosse, dificuldade cognitiva, diarreia). Os sintomas podem ser de início recente ou persistentes, e podem recorrer ao longo do tempo.
- Os sintomas afetam a função diária (por exemplo, hábitos alimentares, atividade física, interação com amigos e familiares, desempenho escolar).
- A coexistência de outros diagnósticos não exclui o diagnóstico de condição pós-COVID-19. A definição da OMS pode mudar com o tempo à medida que mais informações se tornem disponíveis. [199]

Dada a diversidade de apresentações clínicas e o potencial para dano neurológico significativo em crianças, faz-se necessária uma abordagem abrangente que atue na prevenção de sequelas e sobretudo no diagnóstico precoce, baseado em elementos clínicos, laboratoriais e em exames complementares de neuroimagem pediátrica.

1.3. Avaliação Encefálica por Ultrassonografia modo B e Doppler Intracraniano

A ultrassonografia transcraniana continua desempenhando um papel fundamental nos métodos diagnósticos em pediatria. Benefícios que a tornam praticamente indispensável para o atendimento de rotina de recém-nascidos incluem fácil acesso, baixo custo, portabilidade, ausência de radiações ionizantes e isenção de sedação ou anestesia. A ultrasonografia transcraniana constitui ferramenta essencial em neonatos suspeitos de meningite e suas complicações; isquemia perinatal, especialmente a leucomalácia periventricular (LPV); hidrocefalia resultante de uma série de causas e hemorragia [200]. Não obstante, a ultrasonografia transcraniana tem produzido resultados acurados para uma variedade de indicações. A abordagem à ultrasonografia craniana envolve o conhecimento da anatomia de desenvolvimento normal do parênquima cerebral para uma interpretação correta. A técnica correta, aproveitando as várias janelas acústicas e frequências variáveis das sondas de ultrassom, permite um exame detalhado e abrangente do parênquima cerebral.

Técnica de Imagem

A obtenção de imagens cranianas de alta qualidade requer o uso de transdutores de alta frequência, geralmente variando de 5 a 7,5 MHz. Para um campo de visão mais amplo, os transdutores setoriais são preferidos. Os transdutores de matriz linear com frequências mais

altas (7–12 MHz) são especialmente valiosos para a insonação de curto alcance. Eles são recomendados para avaliar condições como coleções extra-axiais, trombose do seio sagital superior, edema cerebral e anatomia giro-sulcal, especialmente em casos suspeitos para anomalias de migração neuronal. Esses transdutores de alta frequência também são adequados para a insonação através da fontanela posterior, fontanela mastoidea e para acessar o forame magno. Para obter imagens de alta qualidade, é essencial segurar o transdutor firmemente entre o polegar e o indicador, com a parte lateral da mão apoiada na cabeça do bebê para garantir estabilidade. Garantir a manutenção da temperatura corporal do neonato é de extrema importância. Manter condições assépticas é igualmente crítico, por meio de lavagem das mãos e limpeza cuidadosa do transdutor entre as avaliações com solução aprovada pelo fabricante.

Janelas de Exame

A maioria das avaliações sonográficas cranianas são realizadas nos planos coronal e sagital, principalmente através da fontanela anterior, que é adequada como janela acústica até a idade de 12–14 meses [201]. As fontanelas posterior e mastoidea oferecem uma melhor visão para avaliação das estruturas da fossa posterior. No entanto, elas proporcionam uma visão útil apenas por um período limitado, ou seja, até 6 meses de idade. Essas visualizações são, porém, de grande utilidade ao se avaliar malformações da fossa posterior, pois fornecem imagens altamente detalhadas do cerebelo, quarto ventrículo, cisterna magna e canal medular superior.

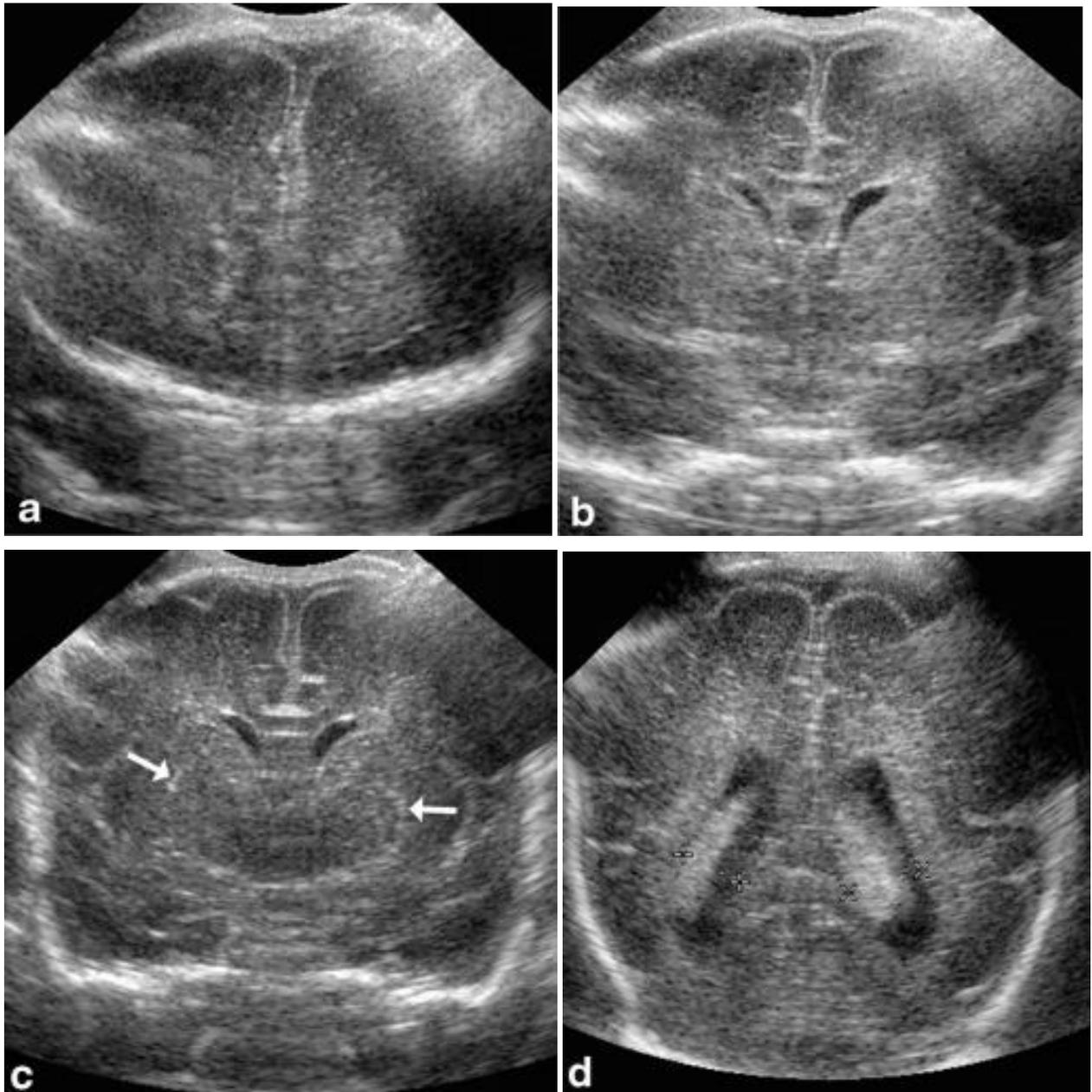


Figura 1. Anatomia Normal (a-d) Imagem ultrassonográfica de alta resolução do encéfalo em secção coronal, demonstrando a aparência normal dos sulcos corticais e giros. Hiperecogenicidade incidental dos vasos lenticuloestriados (setas). Fonte: Hwang M, Tierradentro-García LO, Hussaini SH, Cajigas-Loyola SC, Kaplan SL, Otero HJ, Bellah RD. Ultrasound imaging of preterm brain injury: fundamentals and updates. *Pediatr Radiol.* 2022 Apr;52(4):817-836.

Planos de Aquisição

Os planos coronal e sagital são os planos de imagem mais valiosos para a sonografia craniana, permitindo uma avaliação abrangente do cérebro. É recomendável realizar imagens em ambos esses planos básicos. Se um dos planos for negligenciado, há o risco de se perderem achados patológicos ou oferecer diagnósticos incorretos. Por exemplo, sem a imagem coronal, um aumento de ecogenicidade na região peritrigonal, localizado posterior e superior aos trígono ventriculares em vistas parasagittais, pode ser interpretado erroneamente como leucomalácia periventricular precoce. Da mesma forma, hemorragias na fossa posterior podem não ser visualizadas caso o estudo não inclua avaliação em cortes sagittais.

Anatomia Normal

Imagem Coronal

Para demonstrar a anatomia no plano coronal, são obtidas no mínimo quatro imagens ao mover suavemente a sonda de anterior para posterior. [201]. A imagem mais anterior demonstra os polos frontais, logo à frente dos cornos frontais dos ventrículos laterais, possibilitando ainda avaliação do córtex cerebral frontobasal e visualização das órbitas [Figura 1a].

Uma imagem posterior a essa mostra os cornos frontais dos ventrículos laterais [Figura 1b]. Os cornos frontais são indentados lateralmente pela cabeça do núcleo caudado. O sulco cíngulo, o giro e o corpo anterior do corpo caloso, e o septo pelúcido são observados nesse nível, de cima para baixo na linha média. As estruturas observadas lateralmente são o putâmen, separado do caudado pela cápsula interna. Mais lateralmente, a fissura de Sylvius é encontrada como uma estrutura linear ecogênica que separa o lobo frontal do lobo temporal. Abaixo dessa região, as artérias carótidas internas se bifurcam em artérias cerebrais anterior e média (ACMs), vistas como estruturas ecogênicas [Figura 1c].

Mais posteriormente, as estruturas visualizadas de cima para baixo na linha média são o corpo dos ventrículos laterais (de ambos os lados do cavum septi pellucidi [CSP]), os tálamos (de ambos os lados do terceiro ventrículo) e o tronco cerebral. Lateralmente, o caudado e o putâmen são vistos separados dos tálamos pela cápsula interna. Mais lateralmente ainda está o centrum semiovale, a substância branca profunda dos hemisférios cerebrais.

As imagens posteriores ao forame de Monro são utilizadas para demonstrar o sulco cíngulo, o corpo posterior do corpo caloso, o terceiro ventrículo entre as porções anteriores dos tálamos e o cerebelo. Nesse nível, o corpo do ventrículo lateral é arredondado e demonstra o plexo coroide ecogênico em seu interior.

O trígono dos ventrículos laterais e os cornos occipitais são visualizados em imagens mais posteriores, preenchidos quase que inteiramente pelo plexo coroide [Figura 1d]. A parte do corpo caloso visualizada nesse nível é o esplênio. O tentório cerebelar é visto como estruturas ecogênicas de ambos os lados, separando o cerebelo das estruturas supratentoriais. Na imagem mais posterior, o lobo occipital, juntamente com a parte mais posterior dos cornos occipitais, é visualizado.

Imagem Sagital

O transdutor é colocado longitudinalmente através da fontanela anterior e angulado para um dos lados. A fissura inter-hemisférica identifica o plano médio-sagital [Figura2]. Nesse nível, o ventrículo lateral é visualizado com o núcleo caudado e o tálamo adjacentes ao seu curso, de anterior para posterior. A junção do caudado e do tálamo marca uma área importante, o sulco caudo-talâmico, o local mais comum de hemorragia da matriz germinal (GMH). As imagens parasagitais demonstram um aspecto periférico dos ventrículos e do hemisfério cerebral, incluindo os lobos temporais. Um foco hiperecogênico posterossuperior aos trígonos ventriculares é um achado normal nas imagens parasagitais, e não deve ser interpretado erroneamente como sugestivo de leucomalácia periventricular (PVL) [202].

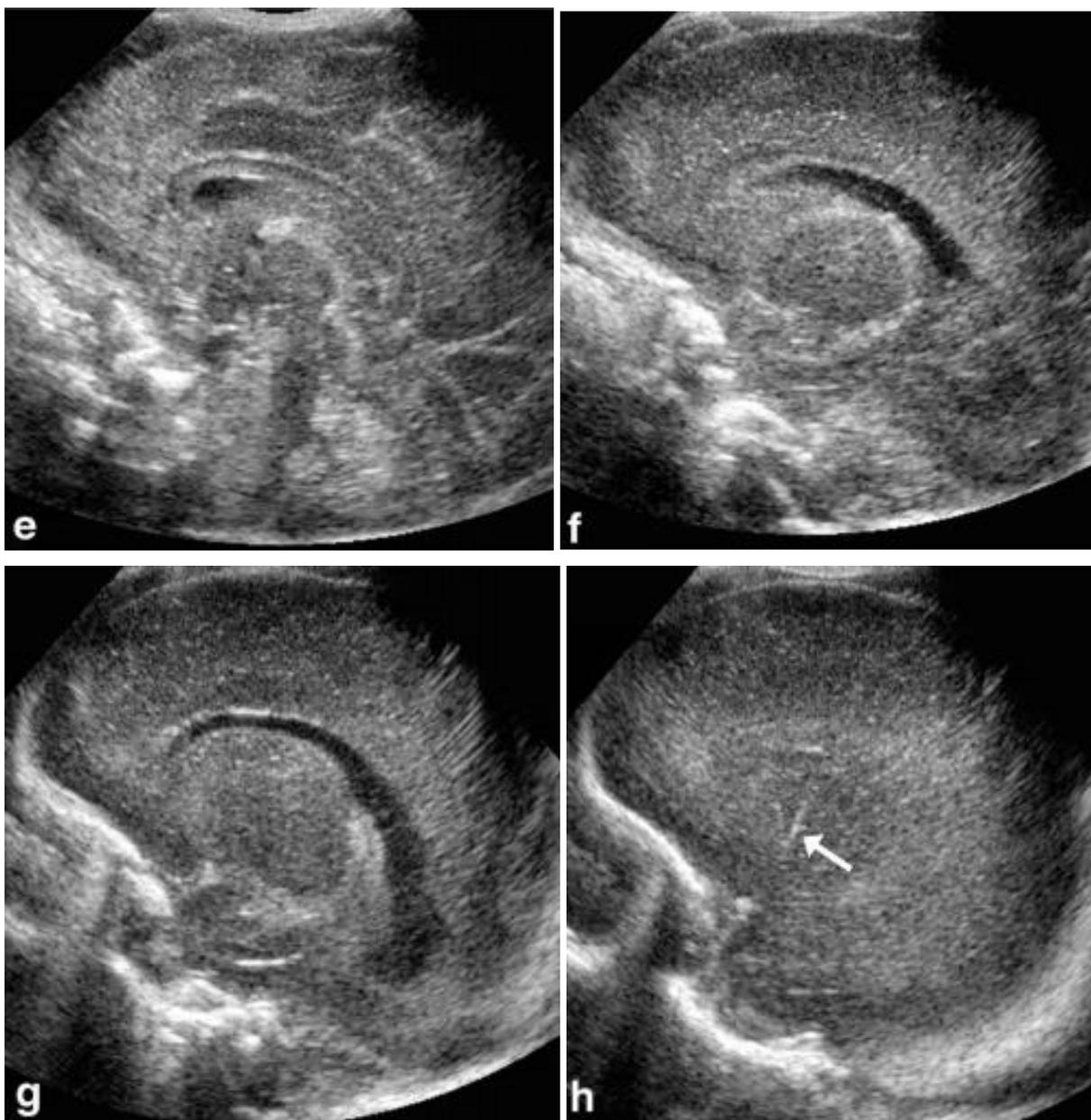


Figura 2. Anatomia Normal (e-h) Imagem ultrassonográfica de alta resolução do encéfalo em secção sagital, demonstrando a aparência normal dos sulcos corticais e giros. Hiperecogenicidade incidental dos vasos lenticuloestriados (setas). Fonte: Hwang M, Tierradentro-García LO, Hussaini SH, Cajigas-Loyola SC, Kaplan SL, Otero HJ, Bellah RD. Ultrasound imaging of preterm brain injury: fundamentals and updates. *Pediatr Radiol.* 2022 Apr;52(4):817-836.

Achados Patológicos – hipóxia e hemorragia

As lesões hipóxicas neonatais e lesões hemorrágicas intracranianas são classificadas de acordo com sua ocorrência em bebês prematuros e neonatos a termo. No primeiro grupo, essas

lesões incluem hemorragia no leito vascular germinal (HMG), hemorragia intraventricular e leucomalácia periventricular (LPV) [203]. Em bebês a termo, a encefalopatia hipóxico-isquêmica e a hemorragia intracraniana são as principais manifestações de imagem. A ultrassonografia é altamente precisa na detecção de hemorragias e na demonstração da dilatação ventricular resultante. Da mesma forma, é a técnica de escolha na triagem e acompanhamento de neonatos prematuros quanto à LPV. Exames sequenciais múltiplos são necessários e a ultrassonografia é ideal nesse contexto.

A LPV representa uma lesão isquêmica que envolve a área de fronteira vascular no cérebro de bebês prematuros, ou seja, a substância branca periventricular. Não existe uma maneira precisa de diagnosticar a LPV na fase aguda. A ultrassonografia é a melhor modalidade de imagem disponível, embora também permaneça relativamente pouco sensível em casos iniciais. Os achados incluem áreas focais de aumento da ecogenicidade nas áreas periventriculares superolaterais, mais proeminentes no nível dos átrios [Figura 3].

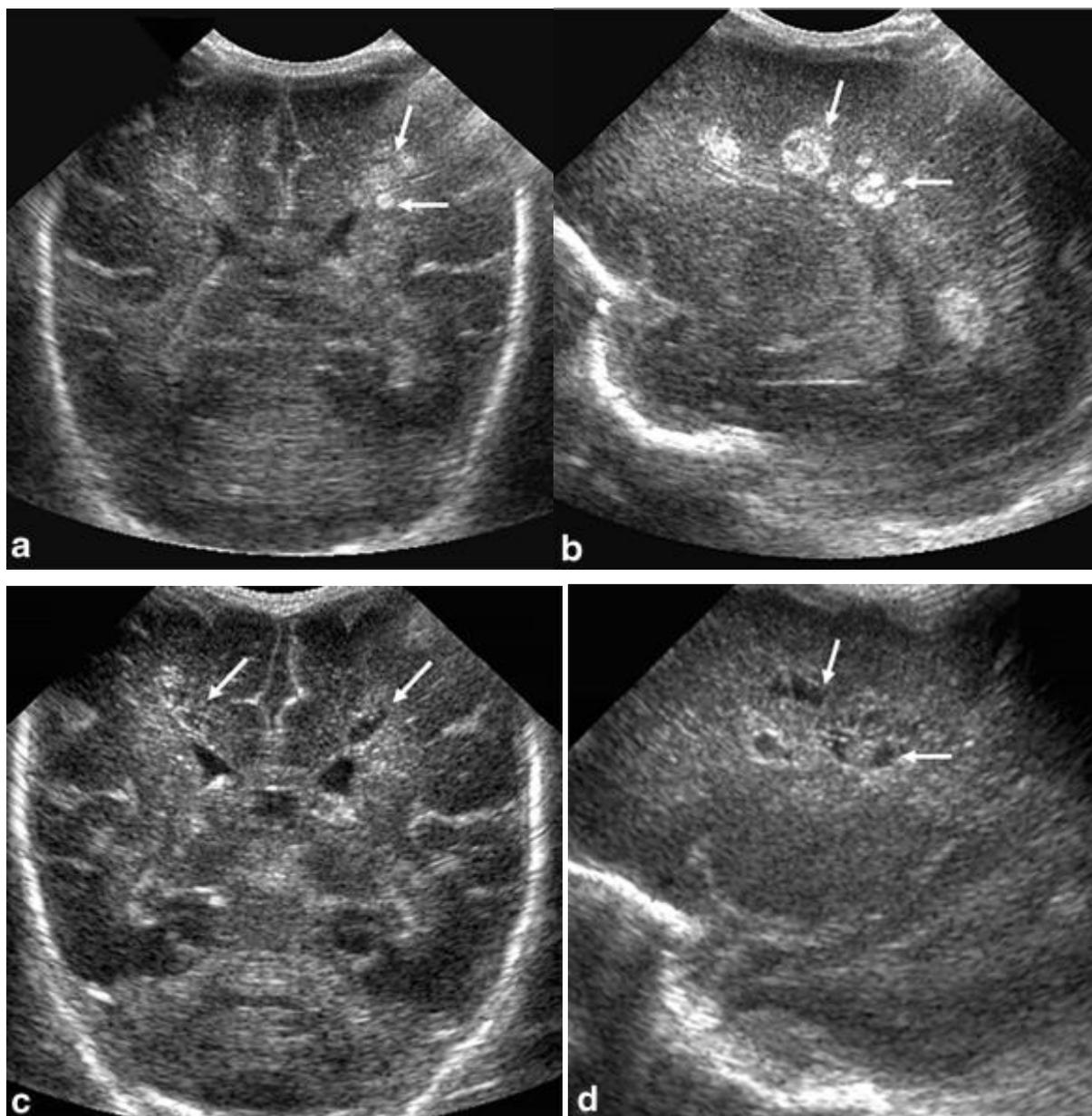


Figura 3. Leucomalácia periventricular (LPV) em neonato pré-termo com 21 dias de vida e idade gestacional de 28 semanas ao nascimento. As imagens coronais (a) e sagitais (b) mostram lesões hiperecóticas dispersas e bem definidas na substância branca periventricular; a maioria delas com formato ovalado (setas) e algumas de aparência cística, compatível com LPV aguda/subaguda. Duas semanas após, uma ultrassonografia cerebral de acompanhamento (c, d) mostra as áreas correspondentes com redução da ecogenicidade, consistentes com a evolução da LPV nos planos coronal (c) e sagital (d), em que as alterações císticas (setas) são mais evidentes. Fonte: Hwang M, Tierradentro-García LO, Hussaini SH, Cajigas-Loyola SC, Kaplan SL, Otero HJ, Bellah RD. Ultrasound imaging of preterm brain injury: fundamentals and updates. *Pediatr Radiol.* 2022 Apr;52(4):817-836.

Uma armadilha já mencionada nesse contexto é o “flare” periventricular normal devido ao efeito anisotrópico. Casos leves de LPV podem se resolver na ultrassonografia de acompanhamento. A LPV crônica resulta em ventriculomegalia, alterações císticas periventriculares e perda da substância branca profunda, com os sulcos se aproximando da parede ventricular. A ressonância magnética (RM) tem uma sensibilidade e especificidade melhores na LPV crônica.

A lesão hipóxico-isquêmica no neonato a termo resulta em lesão cerebral focal ou difusa, dependendo da gravidade do insulto. Na lesão hipóxico-isquêmica difusa, a ultrassonografia mostra edema cerebral com ventrículos estreitos e perda da visualização dos sulcos normais, com ecogenicidade anormalmente aumentada do parênquima cerebral. As áreas predispostas a lesões focais são os gânglios da base, os tálamos e o córtex perirolândico [Figura 4].

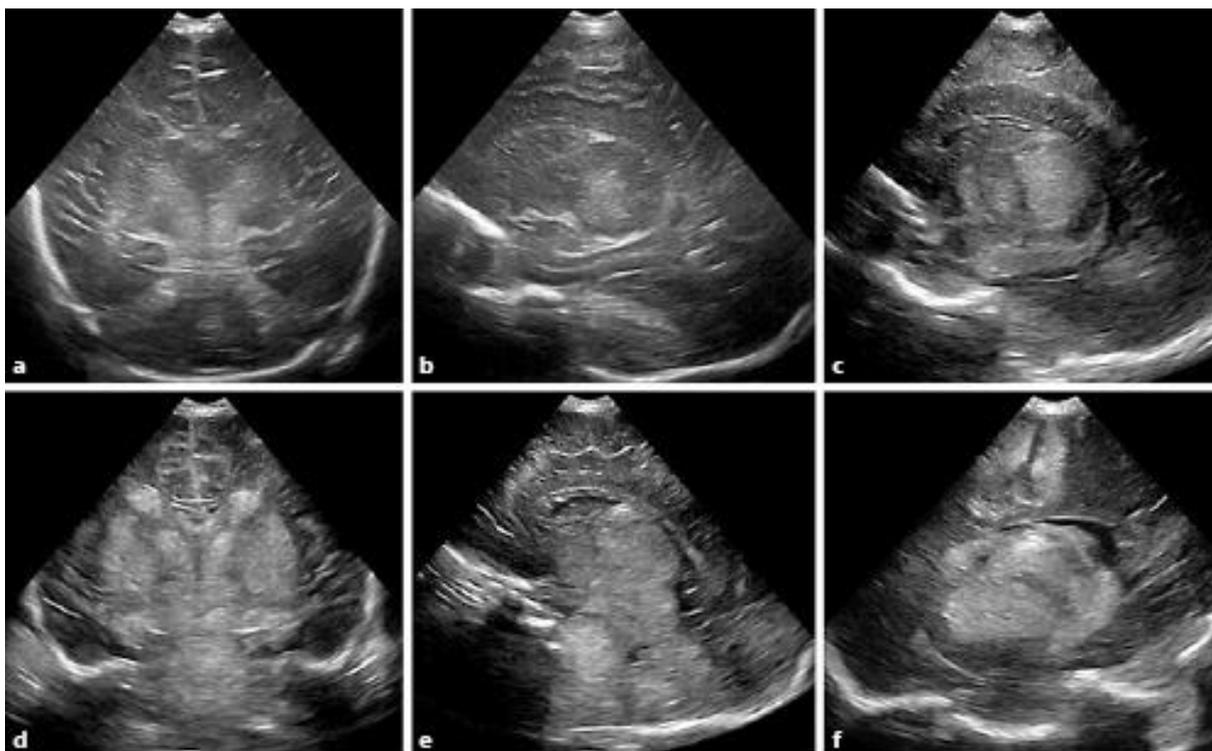


Figura 4. Encefalopatia hipóxico-isquêmica com padrão de lesão central. Recém-nascido a termo com descolamento completo da placenta. Imagens coronais (a) e parasagittais (b, c) através da fontanela anterior. As imagens a e b foram obtidas 2 horas após o nascimento. Observe o aumento simétrico bilateral da ecogenicidade nos tálamos, estendendo-se para os pedúnculos cerebrais, representando uma lesão isquêmica. Os ventrículos estão comprimidos devido ao edema proveniente das estruturas centrais. Ultrassonografia cerebral de acompanhamento realizada em 48 horas (c–f) demonstra evolução/maturação intervalar da isquemia, agora estabelecida em todos os gânglios basais e tálamos, novamente de maneira bilateral e simétrica (d, e). Alguma ecogenicidade pode ser devida a hemorragia após lesão de reperfusão, além da isquemia. Observe a hiperecogenicidade na região peri-rolândica em f. Fonte: Jacqueline Salas, Aylin Tekes, Misun Hwang, Frances J. Northington, Thierry A.G.M. Huisman; Head Ultrasound in Neonatal Hypoxic-Ischemic Injury and Its Mimickers for Clinicians: A Review of the Patterns of Injury and the Evolution of Findings Over Time. *Neonatology* 19 September 2018; 114 (3): 185–197.

O local mais comum de hemorragia cerebral em neonatos prematuros é a matriz germinativa.[204]. As hemorragias de matriz germinativa (HMG) são identificadas na ultrassonografia como áreas hiperecogênicas no sulco caudo-talâmico [Figura 5a]. A hemorragia pode se estender para os ventrículos [Figuras 5c] ou para o parênquima cerebral [Figura 5.2g], sendo que a extensão intraventricular pode ocasionar hidrocefalia obstrutiva.

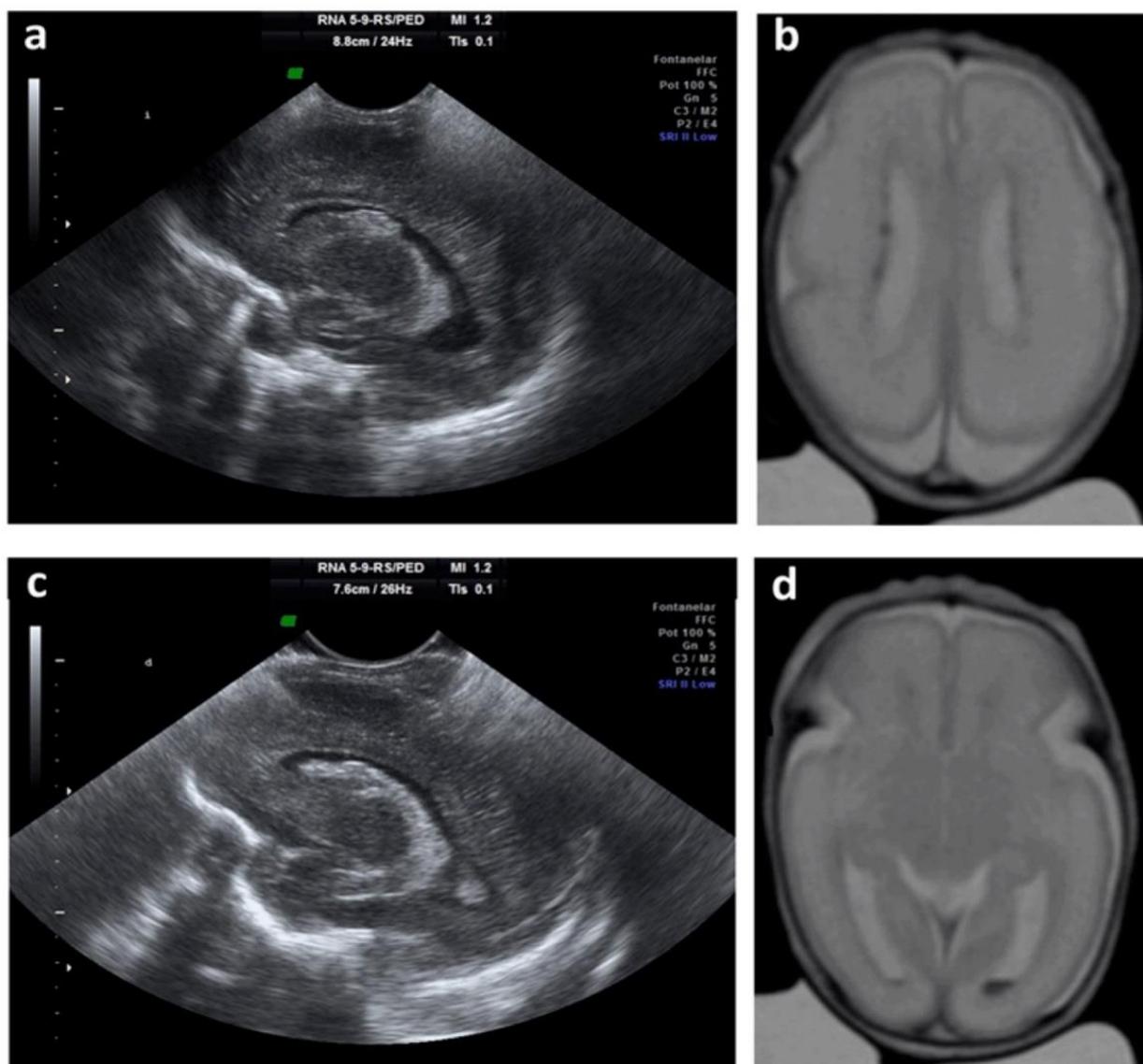


Figura 5.1. "Ultrassonografia e ressonância magnética (RM) mostrando diferentes graus de HMG-IV (hemorragia no leito vascular germinal-intraventricular). (a) Ultrassonografia cerebral parasagital através dos ventrículos laterais mostra hemorragia de grau I; (b) Imagem axial ponderada em T2 por ressonância magnética mostra hemorragia de grau I nos dois ventrículos laterais; (c) Ultrassonografia cerebral parasagital através dos ventrículos laterais mostra hemorragia de grau II; (d) Imagem axial ponderada em T2 por ressonância magnética mostra hemorragia de grau II no ventrículo lateral esquerdo. Fonte: Atienza-Navarro, I.; Alves-Martinez, P.; Lubian-Lopez, S.; Garcia-Alloza, M. Germinal Matrix-Intraventricular Hemorrhage of the Preterm Newborn and Preclinical Models: Inflammatory Considerations. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 8343.

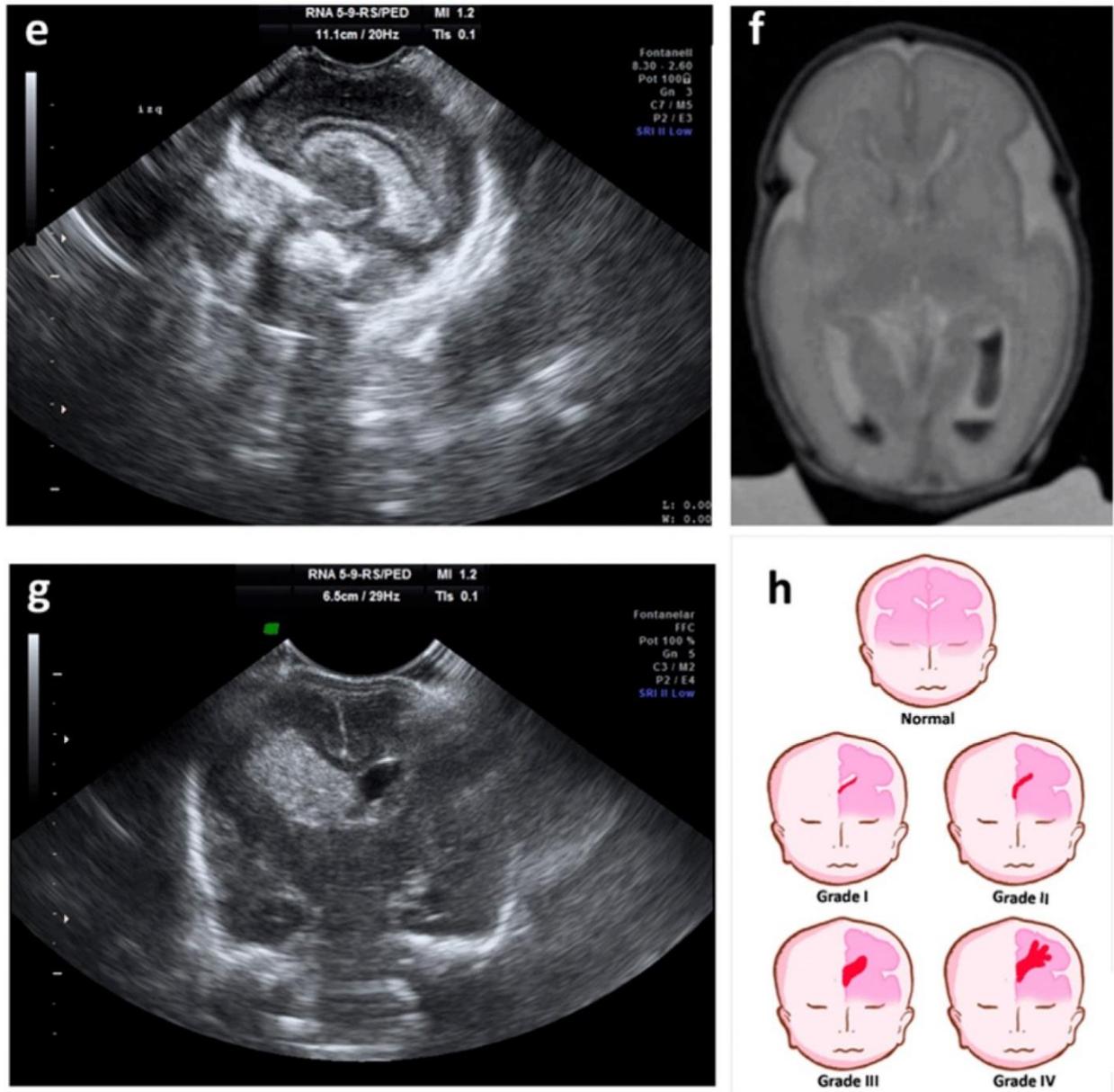


Figura 5.2. (e) Ultrassonografia cerebral parasagital através dos ventrículos laterais mostra hemorragia de grau III; (f) Imagem axial ponderada em T2 por ressonância magnética mostra hemorragia de grau III no ventrículo lateral esquerdo e hemorragia de grau II no ventrículo lateral direito; (g) Ultrassonografia cerebral coronal mostra hemorragia de grau IV ou infarto hemorrágico periventricular; (h) Desenho representando a classificação por ultrassonografia da hemorragia no leito vascular germinal-intraventricular (HMG-IV). Fonte: Atienza-Navarro, I.; Alves-Martinez, P.; Lubian-Lopez, S.; Garcia-Alloza, M. Germinal Matrix-Intraventricular Hemorrhage of the Preterm Newborn and Preclinical Models: Inflammatory Considerations. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 8343.

Papel do Doppler transfontanelar

O estudo ultrassonográfico com Doppler desempenha um papel importante no diagnóstico e acompanhamento de lesões cerebrais secundárias a isquemia, hemorragia, infecção, distúrbios do desenvolvimento e tumores. Além disso, é usado para diferenciar entre coleções líquidas subaracnóidea e subdural, e diagnosticar trombose venosa.

A abordagem pela fontanela anterior é a janela acústica mais comumente utilizada para avaliação por Doppler. Estruturas vasculares rotineiramente visualizadas na varredura sagital incluem as artérias basilar, carótida interna e cerebral anterior, bem como as veias cerebrais internas, veia de Galeno e os seios sagitais superior e reto [Figuras 6 e 7]. Varreduras coronais permitem a avaliação das artérias carótidas internas supraclinóides, segmentos M1 das artérias cerebrais médias, artérias talamoestriadas, segmentos A1 das artérias cerebrais anteriores e o seio cavernoso [Figura 8]. A insonação via osso temporal é a melhor para a artéria cerebral média (ACM) porque é paralela ao fluxo. O índice de resistência das principais artérias intracranianas varia de 0,6 a 0,8 [Figura 9] [205].

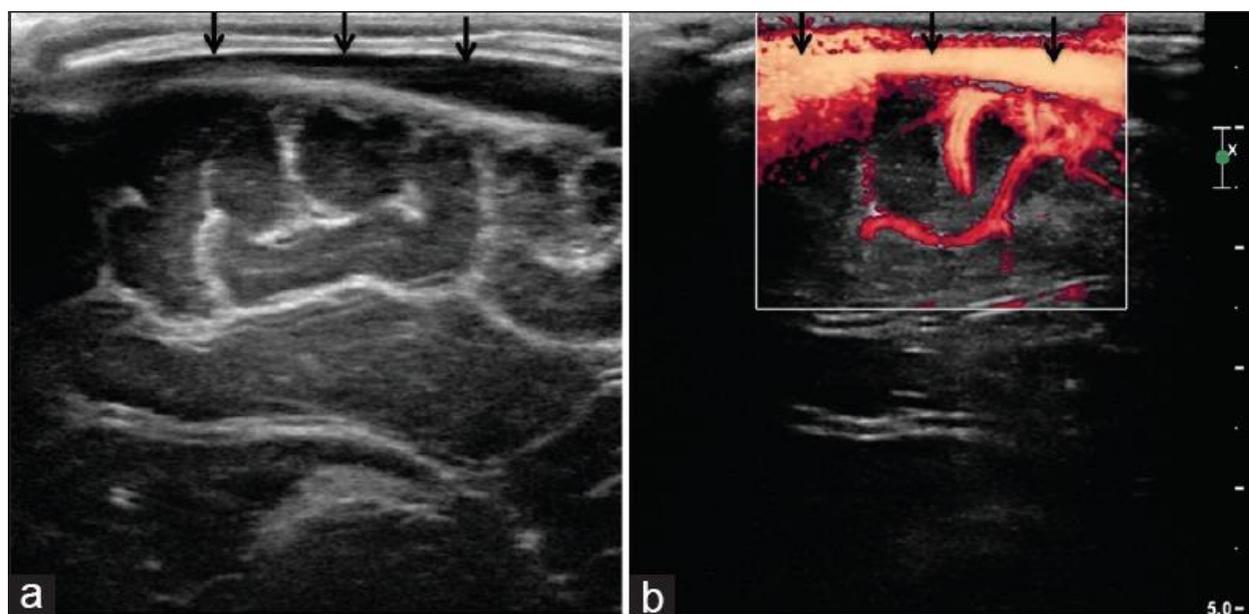


Figura 6. (a e b) Seio sagital superior. Visão sagital através da fontanela anterior mostra a aparência normal do seio sagital superior (setas). Fonte: Gupta P, Sodhi KS, Saxena AK, Khandelwal N, Singhi P. Neonatal cranial sonography: A concise review for clinicians. *J Pediatr Neurosci*. 2016 Jan-Mar;11(1):7-13.

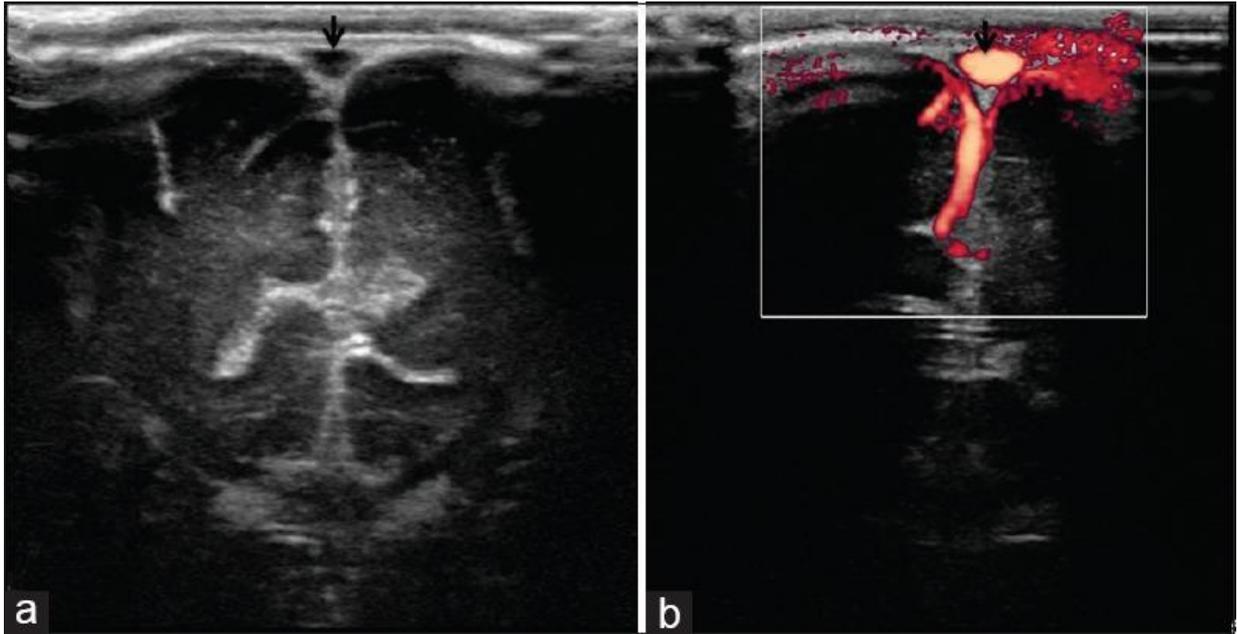


Figura 7. (a e b) Seio sagital superior. Visão coronal através da fontanela anterior mostra a aparência normal do seio sagital superior (setas). Fonte: Gupta P, Sodhi KS, Saxena AK, Khandelwal N, Singhi P. Neonatal cranial sonography: A concise review for clinicians. *J Pediatr Neurosci.* 2016 Jan-Mar;11(1):7-13.

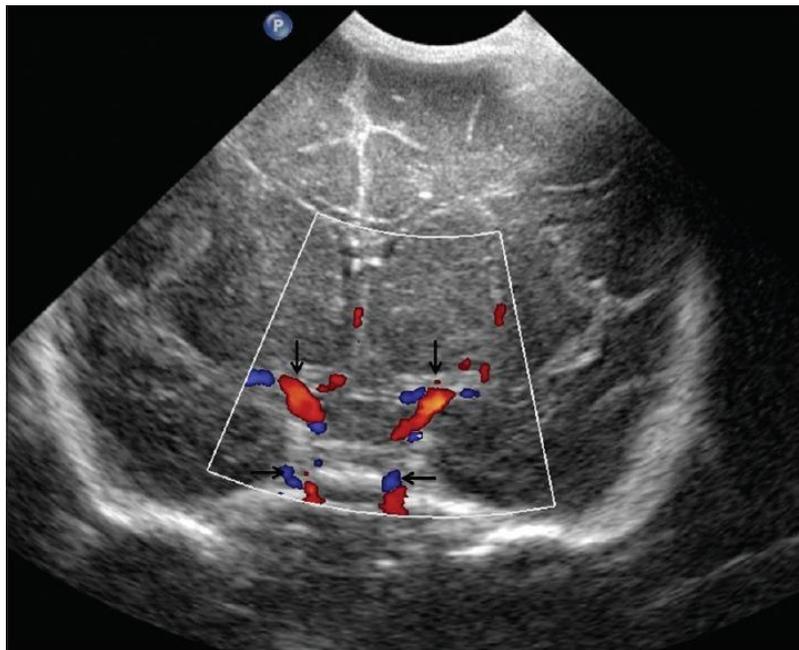


Figura 8. Polígono de Willis. Corte coronal através da fontanela anterior, demonstrando a anatomia normal do polígono de Willis (setas). Fonte: Gupta P, Sodhi KS, Saxena AK, Khandelwal N, Singhi P. Neonatal cranial sonography: A concise review for clinicians. *J Pediatr Neurosci.* 2016 Jan-Mar;11(1):7-13.

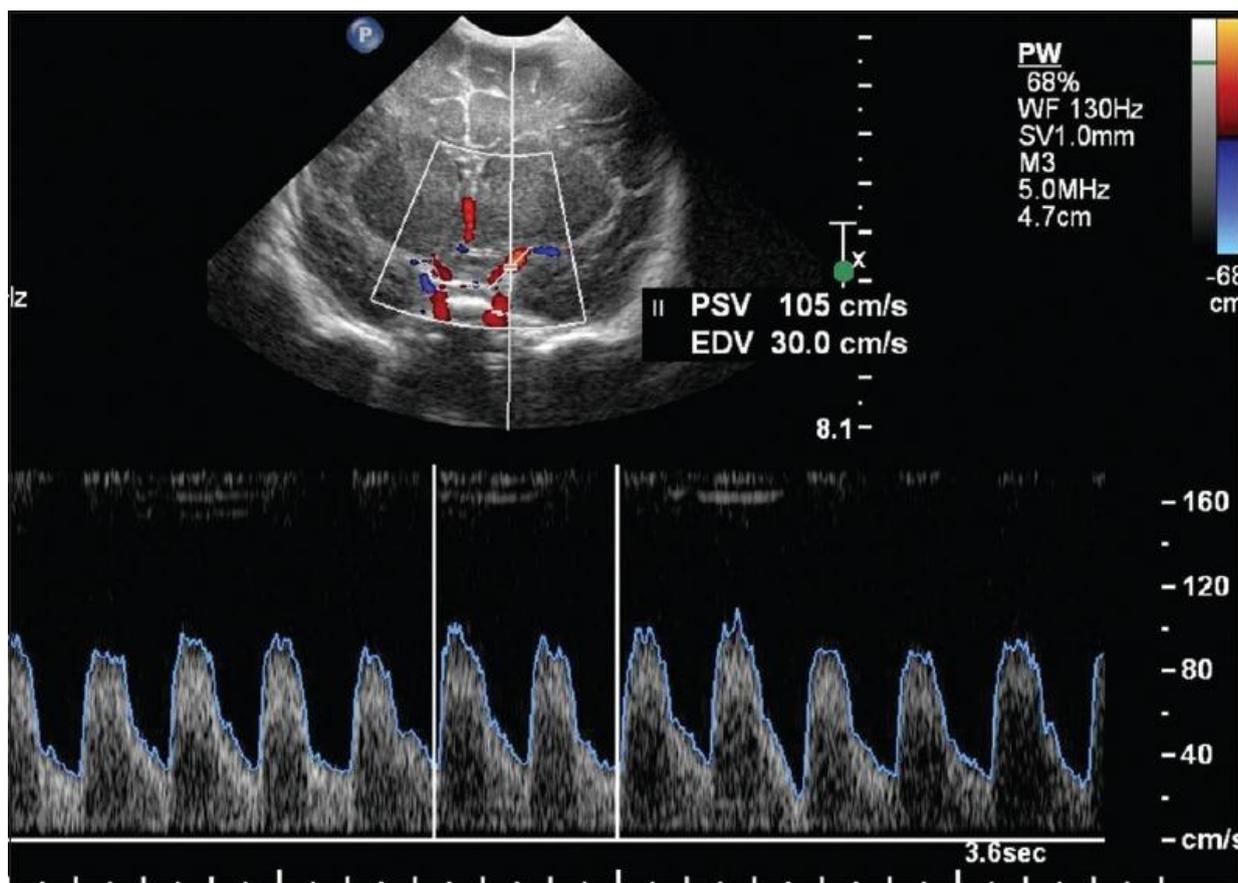


Figura 9. Avaliação por Doppler das artérias cerebrais médias. Visão coronal através da fontanela anterior mostra o padrão de onda normal da artéria cerebral média esquerda. Fonte: Gupta P, Sodhi KS, Saxena AK, Khandelwal N, Singhi P. Neonatal cranial sonography: A concise review for clinicians. *J Pediatr Neurosci.* 2016 Jan-Mar;11(1):7-13. doi: 10.4103/1817-1745.181261.

1.4. Avaliação Encefálica por Elastografia

O método de análise eletrográfica por ultrassonografia é uma modalidade de imagem que avalia a elasticidade e a rigidez dos tecidos moles. Dado que a elasticidade é uma característica fisiológica importante, a distribuição do módulo de elasticidade interna está intimamente relacionada às características biológicas de um organismo. O valor elástico do tecido reflete a rigidez tecidual, que está relacionada à composição molecular do tecido e às estruturas que o compõem com diferentes densidades. Em comparação com as modalidades de imagem por ultrassonografia convencionais, a elastografia por ultrassonografia estima as alterações de elasticidade tecidual para a caracterização precisa de várias condições patológicas. [206,207]. O método de avaliação tecidual por elastografia já possui larga utilização em determinados órgãos, como no fígado, na tireoide e na mama. Um número crescente de estudos utilizando a elastografia por ultrassonografia para investigar doenças encefálicas tem sido conduzido

recentemente [208-211].

Princípios da Elastografia por Ultrassonografia

O desenvolvimento de métodos não invasivos para avaliar as propriedades mecânicas dos tecidos com base na elastografia tem recebido atenção substancial nos últimos anos. Essas técnicas exploram várias alterações patológicas na elasticidade dos tecidos para gerar informações qualitativas e quantitativas que podem ser usadas para fins diagnósticos. A elastografia por ultrassonografia foi proposta pela primeira vez por Ophir et al. em 1991 e pode ser usada para definir tanto a rigidez de um tecido quanto o deslocamento (deformação) em resposta a uma força aplicada [206].

De acordo com as diretrizes europeias mais recentes, a elastografia por ultrassonografia é dividida em duas categorias: elastografia quasiestática (compressiva) e elastografia de ondas de cisalhamento dinâmicas (SWE – shear wave elastography).[212,213]. A elastografia quasiestática inclui principalmente a imagem elástica em tempo real do tecido, enquanto a SWE dinâmica inclui elastografia transitória, imagem por impulso de força de radiação acústica (ARFI) e SWE. O princípio da elastografia por ultrassonografia é medir a deformação tecidual imposta em resposta a uma compressão externa. As mudanças na elasticidade e na deformação do tecido causadas pela compressão são medidas, processadas e finalmente exibidas em tempo real em mapas elásticos codificados por cores. O método fundamental da elastografia por ultrassonografia é aplicar um estímulo dinâmico ou estático a um tecido. Com base em regras físicas, como elasticidade e biomecânica, o tecido produzirá uma resposta, como deslocamento, deformação e velocidade, que variam dependendo da constituição do tecido.

A imagem por elastografia quasiestática reflete a dureza relativa de um tecido. O princípio básico é que uma pressão constante age na superfície do objeto para causar deformação do tecido. As informações sobre a deformação do tecido são obtidas coletando dados relativos ao eco de radiofrequência antes e depois de aplicar a pressão [213]. Uma nova geração de imagem com análise eletrográfica do tecido em tempo real permitiu a detecção da deformação no tecido hepático causada pela compressão do batimento cardíaco e utiliza a tecnologia de análise quantitativa de difusão do tecido para analisar a imagem elastográfica. A imagem elástica em tempo real do tecido é uma técnica elastográfica semiquantitativa que mede a relação entre o tecido anormal (lesão) e o parênquima normal; no entanto, a relação da elasticidade medida entre esses tecidos constitui um valor variável (relativo), e não representa uma medida de valor absoluto do parâmetro viscoelástico. É importante notar que a qualidade de uma varredura elastográfica quasiestática depende em grande parte da experiência e habilidade do operador.

Por outro lado, a SWE dinâmica reflete a rigidez absoluta (módulo de Young) de um tecido e, deste modo, possui maior reprodutibilidade entre diferentes observadores. A elastografia transitória é um método unidimensional comumente utilizado. O princípio da elastografia transitória é que o eixo de vibração do transdutor de ultrassonografia emite uma onda elástica de baixa frequência que se propaga no tecido. Ao mesmo tempo, o transdutor de ultrassonografia transmite um feixe de onda sonora para rastrear a propagação da onda elástica e medir sua velocidade, exibindo posteriormente o valor de elasticidade na imagem [214].

A elastografia dinâmica define a elasticidade do tecido medindo a velocidade de propagação da onda de cisalhamento. Um tecido mais rígido corresponde a uma maior velocidade da onda de cisalhamento [215]. A imagem por impulso de força de radiação acústica é uma técnica de excitação mecânica baseada em tecido que propaga ondas de cisalhamento para longe da região de excitação, fornecendo forças de radiação acústica pulsada locais; a resposta do tecido ao deslocamento é usada para gerar um mapa de elasticidade e produzir um diagrama elástico [216]. O princípio da SWE consiste em o transdutor de ultrassonografia emitir pulsos de radiação acústica focados no tecido analisado, causando deslocamento longitudinal dos tecidos em diferentes profundidades quase ao mesmo tempo, eventualmente produzindo ondas de cisalhamento. Os mapas de elasticidade do tecido são exibidos em tempo real após a imagem de ultra alta velocidade e codificação por cores, e os valores do módulo de Young do tecido são analisados quantitativamente.

A velocidade de propagação da onda de cisalhamento depende da rigidez do tecido.[217] Atualmente, o sistema de imagem por ondas de cisalhamento automaticamente utiliza a equação $E = 3q(cs)^2$ para calcular o módulo de Young, onde q representa a densidade do tecido e cs representa a velocidade da onda de cisalhamento [217,218]. A maioria dos fornecedores comerciais fornece sistemas de computação automatizados que convertem quilopascals em metros por segundo e metros por segundo em quilopascals. A maioria dos sistemas de ultrassonografia exibe os valores de rigidez em quilopascals e metros por segundo em forma de tabela.

De modo geral, um tecido com um módulo de elasticidade maior (ou seja, maior dureza) produz uma resposta menor, como uma amplitude menor ou uma velocidade maior, que a ultrassonografia em combinação com técnicas de processamento de sinal digital ou processamento de imagem digital utiliza para organizar e avaliar o tecido. A resposta interna é avaliada para refletir diferenças nas propriedades mecânicas, como o módulo de elasticidade dentro da estrutura do tecido [218]. A elastografia por ultrassonografia permite ao usuário identificar precocemente áreas onde novas lesões surgiram ou se desenvolveram, em órgãos

nos quais geralmente tais lesões não são evidentes por meio da ultrassonografia convencional. Os dados obtidos a partir de exames elastográficos aumentam a probabilidade de identificar lesões iniciais e realizar uma análise estimada da composição tecidual predominante.

Aplicações Clínicas da Elastografia por Ultrassonografia

A elastografia por ultrassonografia, conforme descrito acima, constitui técnica não invasiva para medir a rigidez do tecido. À medida que mais pesquisadores constatam que muitos processos patológicos afetam a rigidez dos tecidos, a aplicação dessas tecnologias cresce consideravelmente, fornecendo novos correlatos de imagem para a biologia de determinadas doenças. Muitas aplicações clínicas da elastografia por ultrassonografia estão se desenvolvendo rapidamente. Equipamentos de ultrassonografia com opções elastográficas podem detectar e avaliar com mais precisão as propriedades de lesões localizadas em muitos órgãos, como mama, tireoide, testículo, próstata, linfonodos e tecido cerebral. [219-224].

Com o contínuo avanço dos instrumentos de ultrassonografia, muitos dispositivos de ultrassonografia estão disponíveis no mercado e incluem tecnologia de imagem elastográfica que pode medir rapidamente a velocidade da onda de cisalhamento e a rigidez do tecido em uma região de interesse (ROI; Figura 10), embora a aquisição dessas imagens exija operador com experiência para obtenção de valores fidedignos, sendo capaz de reconhecer os principais artefatos no processo de medida dos coeficientes elásticos.

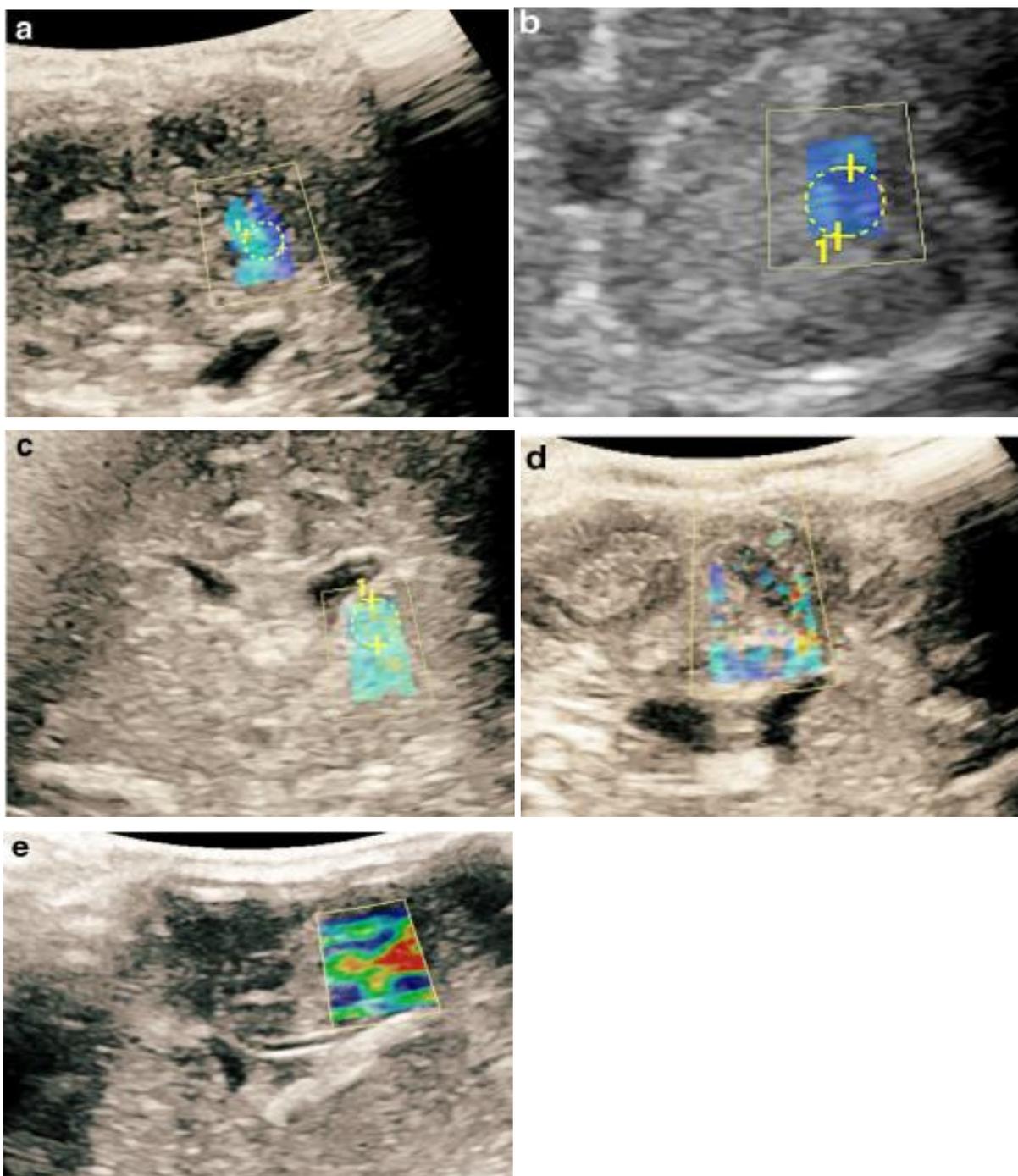


Figura 10. Imagem de onda de cisalhamento bidimensional em cortes coronais do cérebro neonatal. As imagens por onda de cisalhamento (SWE – shear wave elastography) foram realizadas nos núcleos da base, e o módulo de elasticidade de Young e a velocidade da onda de cisalhamento foram medidos. (a-c): medidas adequadas na substância branca, tálamo, e núcleo caudado, respectivamente. (d) amostra insuficiente na escala de cores da elastografia, com dados artefatuais. (e) medida inadequada com transição abrupta de cores na mesma região de interesse. Fonte: El-Ali AM, Subramanian S, Krofchik LM, Kephart MC, Squires JH. Feasibility and reproducibility of shear wave elastography in pediatric cranial ultrasound. *Pediatr Radiol.* 2020 Jun;50(7):990-

996).

Um dos estudos pioneiros em elastografia por ultrassom [225]. aplicou a SWE a cérebros de ratos vivos e descobriu que os valores dinâmicos do módulo de elasticidade do tecido cerebral variavam de 2 a 25 kPa (com uma média de 12 kPa), tendo eles ainda quantificado essas medições em diferentes regiões anatômicas do encéfalo. Ao mesmo tempo, a reprodutibilidade dessa técnica foi considerada favorável, e uma distribuição espacial semelhante das propriedades elásticas foi observada em todos os ratos.

No campo da neuroimagem pediátrica, pesquisadores vem aplicando a elastografia por ultrassonografia a cérebros de neonatos, mostrando que os cérebros de recém-nascidos a termo são mais rígidos do que os de neonatos prematuros. Em um estudo, foram adquiridas imagens ultrassonográficas com análise de elastografia em 21 recém-nascidos saudáveis. [211]. Em comparação com a substância branca periventricular, o núcleo caudado e a substância branca subcortical, a substância cinzenta do córtex cerebral mostrou maior elasticidade, e o núcleo caudado foi menos elástico do que a substância branca periventricular. Em comparação com a substância branca subcortical, a substância branca periventricular mostrou maior elasticidade. Além disso, a idade gestacional corrigida foi correlacionada positivamente com os coeficientes da substância cinzenta cortical, e a correlação demonstrada foi muito significativa. A análise por Virtual Touch tissue quantification (VTQ) é uma nova tecnologia de caracterização tecidual em elastografia por impulso de força de radiação acústica. Sua vantagem é poder detectar quantitativamente a viscoelasticidade do tecido em uma área específica e exibi-la com indicadores correspondentes [226]. O transdutor de ultrassonografia emite pulsos de impulso para a ROI onde a detecção elástica é necessária e coleta as sutis mudanças na compressão longitudinal e na vibração lateral após o estresse sobre o tecido. A velocidade da onda de cisalhamento do tecido ao redor da ROI é calculada rapidamente. Um estudo utilizou VTQ por ARFI para avaliar a elasticidade do tecido em neonatos de diferentes idades gestacionais [238]. Foram realizados exames de impulso de força de radiação acústica em 41 neonatos com diferentes idades gestacionais sem lesões cerebrais, e VTQ foi utilizado para quantificar a rigidez dos tecidos das substâncias cinzenta e branca encefálicas. Os pesquisadores conseguiram estimar valores de VTQ de referência nas regiões da substância cinzenta e branca de neonatos pré-termo e a termo [226]. Além disso, o estudo constatou que o coeficiente de elasticidade foi significativamente maior em neonatos a termo do que em neonatos pré-termo. Presumivelmente, esse aumento no coeficiente de elasticidade (maior valor do módulo de Young) está diretamente relacionado ao aumento da mielinização durante o desenvolvimento normal do encéfalo. Nenhum evento adverso diretamente relacionado ao ARFI foi encontrado

no estudo, ratificando a praticidade e segurança na aplicação da elastografia por ultrassom em neonatos.

Outro estudo sobre aplicação de análise elastográfica do encéfalo por ultrassonografia incluiu 44 neonatos a termo e 39 neonatos pré-termo em sua amostra, tendo aplicado SWE para medida dos coeficientes de elasticidade da substância branca ao redor do tálamo e das regiões periventriculares occipitais [227]. O coeficiente de correlação de Pearson foi usado para determinar a relação entre a idade gestacional e a rigidez do tálamo e da substância branca periventricular. Os resultados do estudo mostraram que os valores de rigidez nos tálamos e na substância branca periventricular do parênquima encefálico foram significativamente menores no grupo de neonatos pré-termo do que no grupo de neonatos a termo. Além disso, o grupo da pesquisa também descobriu que os valores de rigidez da substância branca periventricular de ambos os grupos eram mais baixos do que os valores da rigidez no tálamo. Os valores de corte ótimos para determinar a prematuridade foram um coeficiente de elasticidade médio no tálamo inferior a 8,28 kPa e coeficiente da substância branca periventricular inferior a 6,59 kPa. Nesse estudo, a rigidez do parênquima cerebral de neonatos pré-termo (medida no tálamo e na substância branca periventricular) foi significativamente menor do que no grupo de neonatos a termo – achado que tem sido reproduzido com consistência em outros estudos. Além disso, foi encontrada uma correlação positiva significativa entre a idade gestacional no nascimento e os valores de elasticidade. Esse estudo mostrou que o uso de SWE bidimensional pode diferenciar os valores de elasticidade do cérebro de neonatos pré-termo e neonatos a termo, e os resultados podem ser usados como um padrão de referência para avaliar a elastografia do cérebro neonatal.

À medida que a utilização do método eletrográfico se dissemina, maior o interesse em se pesquisar e estabelecer a faixa de normalidade para coeficientes de elasticidade no encéfalo. Para investigar coeficientes de elasticidade encefálica na população em geral, Ertl et al. [228] recrutaram 108 pacientes saudáveis como participantes, os quais foram divididos em grupos por idade: 20 a 40, 40 a 60 e acima de 60 anos. Os resultados de elasticidade parenquimatosa com SWE bidimensional (eixo coronal na janela transtemporal) mostraram que o valor do hemisfério cerebral esquerdo foi de 3,34 kPa e o valor do hemisfério direito foi de 3,33 kPa. Eles não encontraram correlação entre os valores de elasticidade e índice de massa corporal ou sexo. No entanto, observaram uma alta correlação entre os valores de elasticidade e a idade dos pacientes. A obtenção de uma faixa de coeficientes elastográficos normais para o tecido cerebral por meio da ultrassonografia é útil para se comparar tecidos lesionados com tecidos normais. Também tornará possível avaliações comparativas no que se refere ao desenvolvimento

subsequente de doenças cerebrais. É importante observar que os valores específicos do módulo elástico ainda são variáveis devido às diferenças nas condições estabelecidas pelos fabricantes dos equipamentos e desenvolvedores dos softwares de análise elastográfica, portanto, pesquisas subsequentes são necessárias para obter dados mais representativos.

Aquisição de imagens em escala de cinza para fusão em tempo real com mapa de elastografia (Shear Wave Mode) e demonstração de mensurações do módulo de elasticidade “E” adquiridas nas regiões de interesse (ROIs) no cérebro.

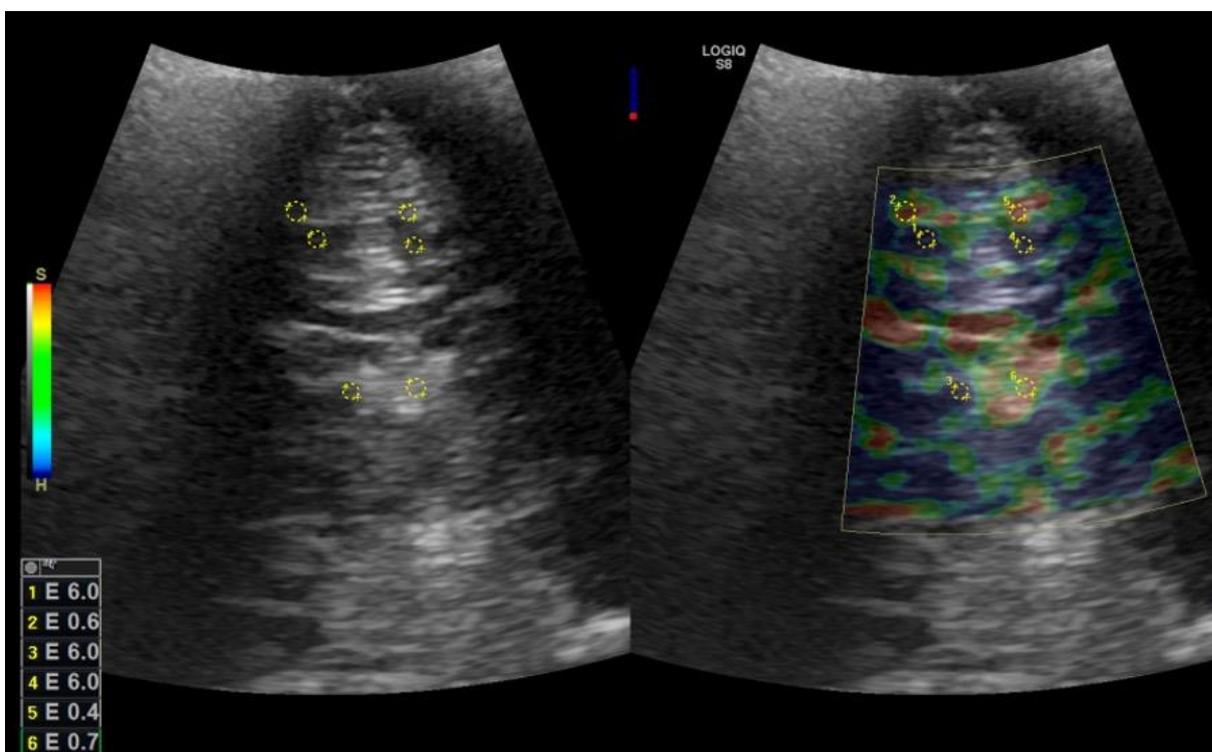


Figura 11. Elastografia de US por onda de cisalhamento com mapa de cores na região dos gânglios da base e substância branca profunda, demonstrando a aquisição de medidas em seis regiões de interesse (ROIs circulares), no plano coronal. Medições do módulo elástico nas regiões de interesse expressas em quilopascals (kPa). Fonte: autoral.

A elastografia por ultrassonografia fornece um novo método para o diagnóstico clínico de doenças cerebrais e potencializa a gama de aplicações clínicas para o método ultrassonográfico. Com o avanço de métodos computacionais aprimorados, melhoria contínua dos equipamentos de imagem elastográfica e constante desenvolvimento das habilidades para aplicação clínica, espera-se que a elastografia por ultrassonografia preencha as lacunas existentes na ultrassonografia tradicional e provavelmente se torne mais útil para a análise de doenças cerebrais. Embora a aplicação da elastografia por ultrassonografia na imagem cerebral ainda esteja em estágio inicial, os experimentos em modelos animais e as pesquisas atuais em seres humanos são extremamente promissores. Como complemento aos métodos-padrão de imagem cerebral, a elastografia por ultrassonografia é um método eficaz, versátil e de baixo custo, que pode aprimorar as avaliações diagnósticas de pacientes com várias doenças neurológicas, e possivelmente estratificar o prognóstico desses pacientes.

2. JUSTIFICATIVA

A infecção pelo SARS-CoV-2 durante a gestação e período perinatal abre um espectro de possibilidades de pesquisa quanto aos efeitos na saúde fetal, neonatal e ao longo da infância. A descrição das consequências da infecção pode propiciar um melhor entendimento da doença e abrir portas para o cuidado e tratamento baseados em achados científicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo primário

Determinar os efeitos da infecção por SARS-CoV-2 sobre o parênquima encefálico em desenvolvimento e suas respectivas manifestações neuroradiológicas em filhos de mulheres expostas e não expostas à infecção pelo SARS-CoV-2 durante a gestação.

3.2. Objetivos secundários

- Caracterizar os efeitos da exposição ao SARS-CoV-2 na estrutura do encéfalo, em especial córtex e substância branca encefálica, de crianças filhas de mães infectadas em qualquer fase do período gestacional.
- Determinar os efeitos da exposição ao SARS-CoV-2 na dinâmica de fluxo cerebral das artérias intracranianas e nos parâmetros de elastografia do parênquima encefálico nas crianças filhas de mães infectadas em qualquer fase do período gestacional.
- Identificar e discutir possíveis aplicações clínicas dos achados de neuroimagem no contexto de prevenção de danos neurológicos e atraso de neurodesenvolvimento em filhos de mães expostas ao SARS-CoV-2, caracterizando quais áreas do encéfalo teriam maior predisposição a alterações elastográficas.

4. METODOLOGIA

O presente estudo integra um projeto mais amplo, PROUDEST (Pregnancy Outcome and Child Development – Effects of SARS-CoV-2 Infection Trial), o qual é dividido em um braço obstétrico (PREGNANT), e um braço pediátrico (BORN) cujo objetivo é determinar os efeitos da infecção por SARS-CoV-2 no crescimento e desenvolvimento em longo prazo entre filhos de mães expostas e não expostas à infecção pelo SARS-CoV-2 durante a gestação. O estudo proposto é uma das etapas do PROUDEST/BORN.

4.1. Desenho do estudo

Estudo de coorte prospectivo, comparativo, analítico. Refere-se ao acompanhamento de lactentes filhos de mães expostas e não expostas à infecção pelo SARS-CoV-2 durante a gestação. O recrutamento de casos e controles teve início no mês de junho de 2020. O período de realização do estudo está compreendido entre junho de 2020 e dezembro de 2022, na cidade de Brasília-DF, no Hospital Universitário de Brasília.

4.2. Estimativa do tamanho da amostra

Para realizar o cálculo do tamanho da amostra, foi necessário considerar que inicialmente não havia um registro final da prevalência da infecção do SARS-CoV-2 em grávidas e crianças, tampouco na população brasileira.

Dados do Ministério da Saúde (14 de junho de 2020) evidenciaram que, no Distrito Federal havia 758,5 casos por 100.000 habitantes e uma taxa de mortalidade de 10,1 para 100.000 habitantes e sem dados específicos para gestantes. Somado a isso, o número de nascidos anuais no Distrito Federal em 2018 (dado mais recente) foi de 44.152 recém-nascidos [229]. Considerando uma população de 2.500.000 habitantes, nascimento anual de 43.313 recém-nascidos e uma prevalência presumida para SARS-CoV-2 em gestantes de 10% (intervalo de confiança de 95%, e um erro-alfa de 5%) a amostra mínima, portanto, seria de 188. Foi estimada uma perda amostral de até 20% no estudo durante o follow-up pediátrico.

4.3. População

O estudo realizado constitui o braço pediátrico do projeto PROUDEST. A população do estudo é composta por um grupo de lactentes filhos de mulheres infectadas pelo SARS-CoV-2 nas distintas fases da gravidez e um grupo controle composto por lactentes filhos de mulheres que permaneçam com sorologia negativa até o final do período neonatal. A população do estudo consistiu em 219 crianças, das quais 201 estavam no grupo de lactentes nascidos de mulheres infectadas pelo SARS-CoV-2 em diferentes estágios da gravidez. O grupo controle consistiu em 18 lactentes nascidos de mulheres que permaneceram soronegativas para o SARS-CoV-2 até o final do período gestacional.

Os pacientes foram recrutados do braço obstétrico do estudo PROUDEST, composto por gestantes da unidade de referência para infecção pelo SARS-CoV-2 da Secretaria de Saúde do Distrito Federal - o Hospital Regional da Asa Norte, e via divulgação do ambulatório em mídias televisiva e digital.

Critérios de inclusão

- i. Lactentes expostos: comprovação de infecção materna pelo SARS-CoV-2 durante a gestação (RT PCR ou IgM positivo).
- ii. Lactentes não expostos: exclusão de infecção materna pelo SARS-CoV-2 durante a gestação com ausência de sintomas e sorologia IgG e IgM negativas ao final da gestação.

Critérios de exclusão

- i. Lactentes expostos
 - Indícios ou confirmação de síndromes genéticas;
 - Suspeita ou confirmação de outras infecções congênitas, como toxoplasmose, sífilis, rubéola, herpes, Chagas e zika vírus;
 - Impossibilidade de acompanhamento sequencial até os dois anos de vida.
- ii. Lactentes não expostos
 - Indícios ou confirmação de síndromes genéticas;
 - Suspeita ou confirmação de outras infecções congênitas, como toxoplasmose, sífilis, rubéola, chagas, herpes e zika vírus;

- Impossibilidade de acompanhamento sequencial até os dois anos de vida.

4.4. Coleta de Dados

Os dados das pesquisas foram coletados durante o funcionamento do ambulatório criado especificamente para a pesquisa, sediado no Hospital Universitário de Brasília (HUB) com o apoio da Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH), onde utilizamos os recursos já disponíveis na unidade ambulatorial.

Foi realizado acompanhamento mensal até os 6 meses de vida; após esse período as consultas foram realizadas trimestralmente até os 24 meses de idade completos. Em cada consulta, conforme ficha clínica padronizada, foi realizada avaliação nutricional, status vacinal, aplicadas curvas de crescimento Intergrowth 21 (prematuros < 34 semanas) e OMS dos pacientes nascidos de termo, e avaliação pediátrica global. Para acompanhamento do desenvolvimento neuropsicomotor foi aplicada a escala de avaliação Bayley III trimestralmente, independentemente da idade do paciente.

4.5. Dados de neuroimagem

Os grupos do estudo foram avaliados quanto às repercussões neurológicas da infecção por SARS-CoV-2 no período gestacional, sendo parte das avaliações através de métodos de Diagnóstico por Imagem, distribuídos nas seguintes modalidades e períodos:

- Ultrassonografia Craniana Transfontanelar e Doppler das artérias intracranianas. A avaliação morfológica do encéfalo incluiu estudo por ultrassonografia em escala de cinza (modo B), com alterações categorizadas em cinco regiões de interesse (ROIs): substância branca profunda/periventricular, substância branca subcortical, tálamos e núcleos caudados, corpo caloso (esplênio) e substância cinzenta do córtex frontal. Os exames ultrassonográficos foram realizados pela técnica transfontanelar anterior, transtemporal e transmastoidea, com equipamentos de modelo Affiniti 70, fabricado pela Philips Medical Systems (Bothell, WA, EUA), utilizando-se transdutor de alta frequência convexo de 8,5 MHz. Os lactentes foram submetidos a exame no sexto mês de idade cronológica corrigida.

Os exames foram realizados em cortes nos planos coronal (anterior, médio e posterior), sagital (mediano e paramediano) e axial. No corte coronal anterior foram obtidas imagens de placa crivosa do etmoide, órbitas, parênquima frontal e cornos anteriores dos ventrículos

laterais. No corte coronal médio foram observados fissura inter-hemisférica, corpo caloso, cavum do septo pelúcido, forames de Monro, terceiro ventrículo, plexos coroides dos ventrículos, cabeça do núcleo caudado, tálamos, fissura de Sylvius, ínsula, globo pálido e putâmen e regiões parietais e temporais do parênquima cerebral. Pelo corte coronal posterior foram obtidas imagens da região atrial dos ventrículos laterais, plexos coroides, cornos occipitais dos ventrículos laterais, região posterior ao átrio dos ventrículos laterais, cerebelo, cisterna magna e lobo occipital. No corte sagital mediano foram obtidas imagens da fissura inter-hemisférica, corpo caloso, cavum do septo pelúcido, terceiro ventrículo, quarto ventrículo e cisterna magna, aqueduto cerebral, vérmis cerebelar, ponte e bulbo. No corte sagital paramediano foram obtidas imagens dos cornos anteriores, temporais e occipitais dos ventrículos laterais, líquido cefalorraquidiano, plexos coroides dos ventrículos laterais, matriz germinativa, tálamos, hipotálamos e núcleos da base, fissura de Sylvius, regiões temporal, parietal e occipital do parênquima cerebral.

O estudo da hemodinâmica intracraniana foi realizado por meio de avaliação Doppler colorido e espectral, com análise dos índices de resistência (IR) e pulsatilidade (IP) das seguintes artérias intracranianas: artéria pericalosa, artéria cerebral média e artéria basilar (Figura 16). Aquisição de imagens dinâmicas, Color Doppler e Espectral, com sistema de ultrassonografia modelo Affiniti 70, Philips, permitindo arquivamento e pós-processamento de curvas espectrais com mensuração automática das velocidades de pico sistólico, velocidade diastólica final e índices derivados. Além disso, foi realizada a quantificação das variações relativas do fluxo sanguíneo cerebral em determinado período de tempo e a mensuração de relações hemodinâmicas. O IR foi calculado por meio da fórmula: $IR = S - D/S$, onde: S corresponde à velocidade do fluxo sistólico e D, à velocidade do fluxo diastólico. Neste estudo foram considerados como IR normal nas artérias avaliadas os valores superiores a 0,60. Os dados foram avaliados empregando-se estatística descritiva e análises comparativas.

- Elastografia do parênquima encefálico: durante os primeiros 6 meses de idade corrigida. Utilizamos software de elastografia ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse) e ShearWave diretamente integrados ao sistema de ultrassonografia cuja onda de cisalhamento é localizada, permitindo a seleção da área de interesse de mensuração pelo operador em modo B e em tempo real. Estimou-se a elasticidade tecidual e calculou-se a velocidade da onda de cisalhamento no parênquima encefálico através do deslocamento das ondas transversais, sendo a velocidade da onda de cisalhamento diretamente proporcional à rigidez tecidual local (Figuras 12 a 15). Os resultados iniciais foram expressos em metros por segundo (m/s), sendo esta

velocidade de propagação da onda de cisalhamento proporcional à raiz quadrada da elasticidade do tecido (E – módulo de Young), e posteriormente codificados para valor absoluto do módulo de elasticidade tecidual. O módulo de elasticidade nas regiões de interesse foi expresso em quiloPascal (kPa).

Aquisição de imagens em escala de cinza para fusão em tempo real com mapa de elastografia (Shear Wave Mode) e demonstração de mensurações do módulo de elasticidade “E” adquiridas nas regiões de interesse (ROIs) no cérebro.

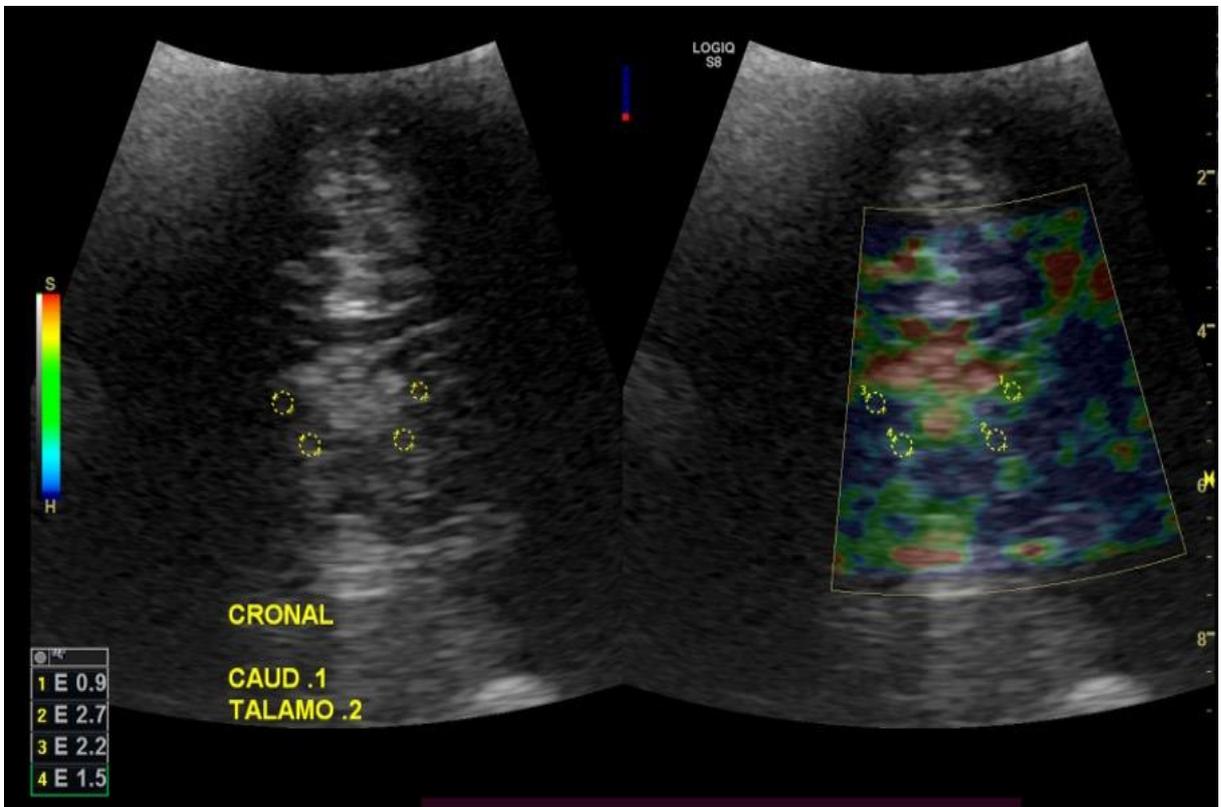


Figura 12. Elastografia de US por onda de cisalhamento com mapa de cores na região do tálamo e núcleos caudados, demonstrando a aquisição de medidas em quatro regiões de interesse (ROIs circulares), no plano coronal. Medições do módulo elástico nas regiões de interesse expressas em quilopascals (kPa). Fonte: autoral.

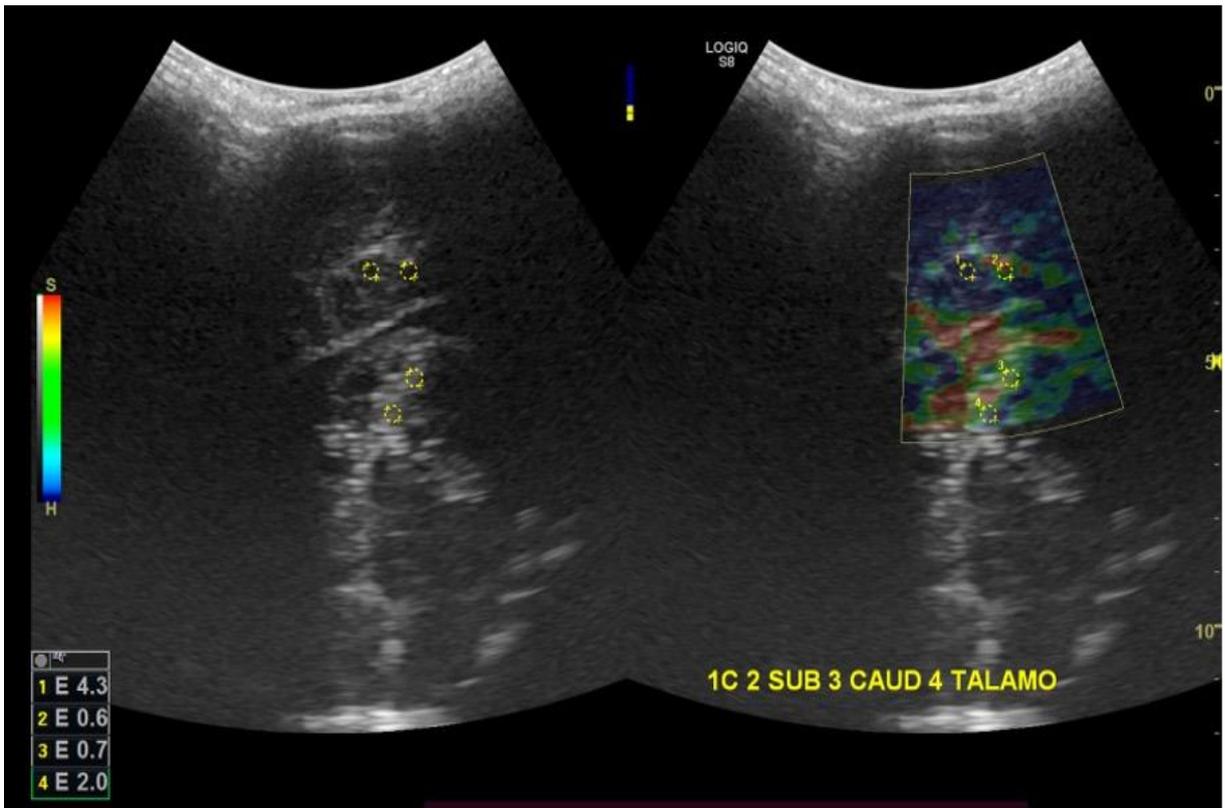


Figura 13. Elastografia US por onda de cisalhamento com mapa de cores na região do córtex, substância branca subcortical, núcleo caudado e tálamo, demonstrando a aquisição de medidas em quatro regiões de interesse (ROIs circulares), no plano sagital. Medições do módulo elástico nas regiões de interesse expressas em quilopascals (kPa). Fonte: autoral.

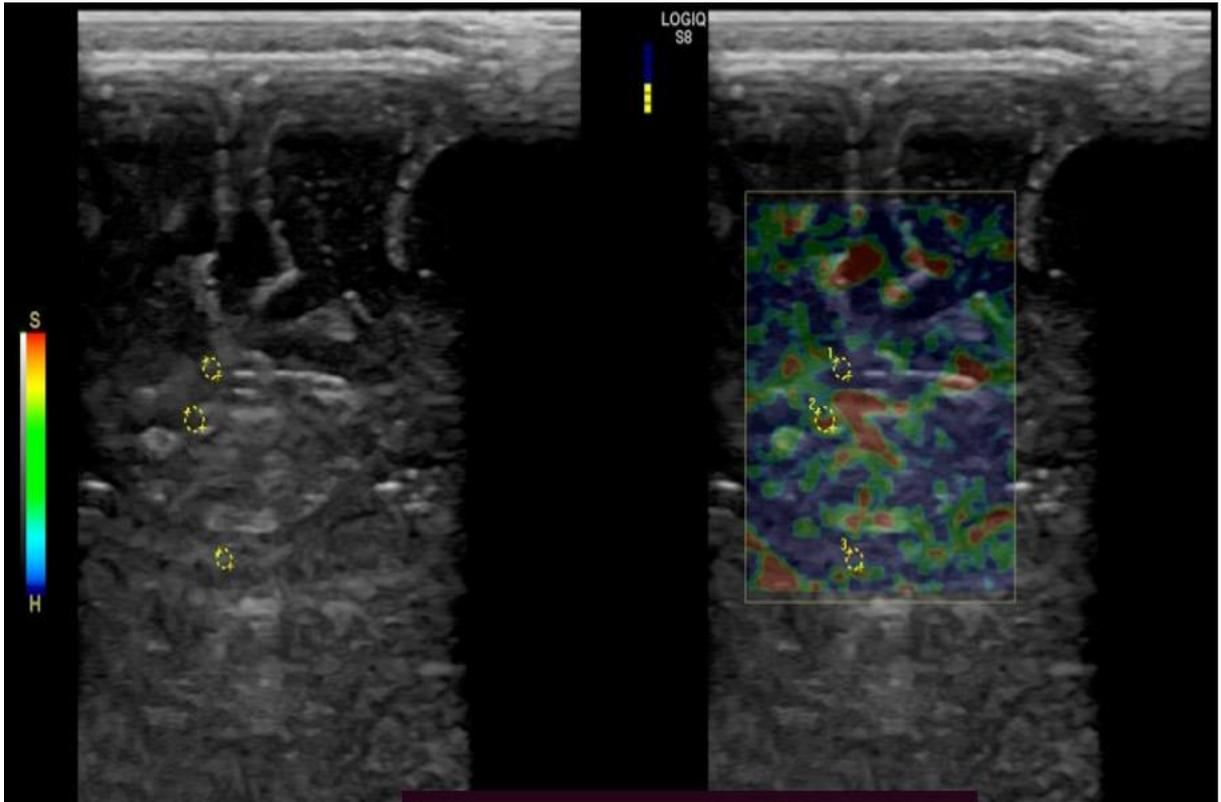


Figura 14. Elastografia de US por onda de cisalhamento com mapa de cores na região da interface córtico-subcortical, incluindo substância cinzenta cortical frontal, substância branca justacortical e substância branca profunda, demonstrando a aquisição de medidas em três regiões de interesse (ROIs circulares), no plano coronal. Medições do módulo elástico nas regiões de interesse expressas em quilopascals (kPa). Fonte: autoral.

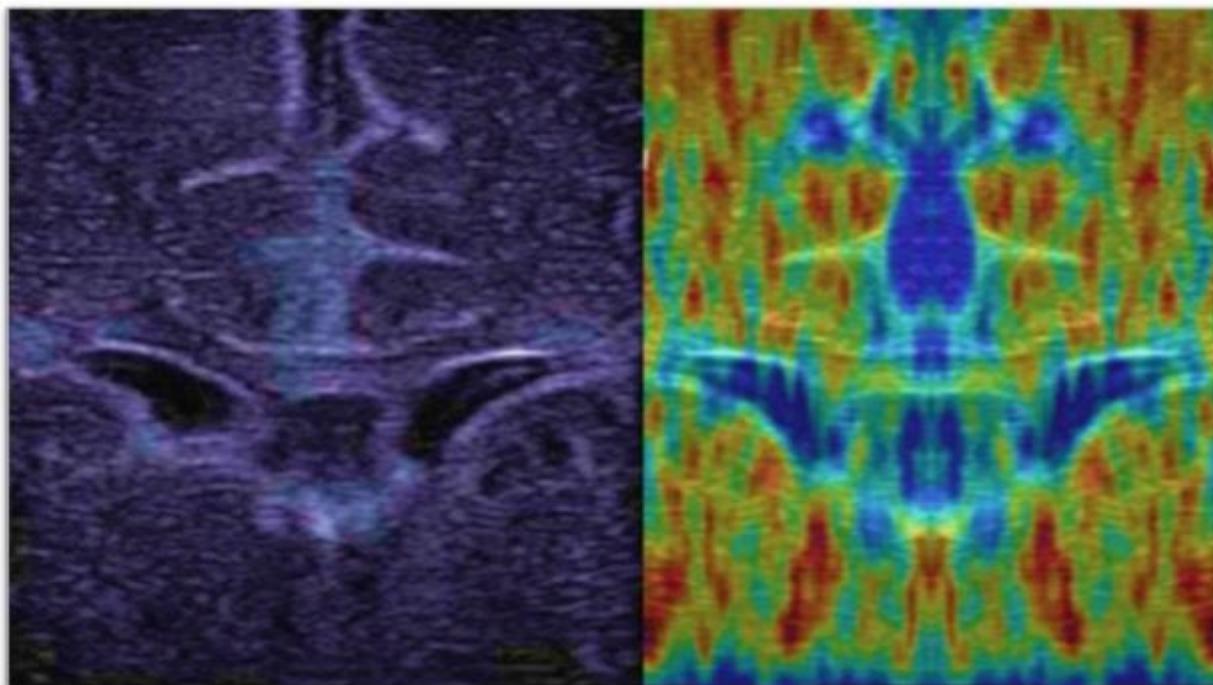


Figura 15. Elastografia US modo onda de cisalhamento com mapa de cores na região de interface cortical-subcortical, incluindo substância cinzenta cortical frontal, substância branca justacortical, substância branca profunda e gânglios da base, mostrando a variação do mapa de cores de acordo com o módulo de elasticidade de (E) numa paciente cuja mãe foi exposta à infecção por SARS-Cov-2 durante a gravidez, com elasticidade reduzida afetando os gânglios da base bilateralmente (áreas mostradas em azul) e algumas zonas da substância branca profunda. Outras zonas em azul correspondem a espaços de circulação do LCR, com valores “E” em sua maioria baixos. Fonte: autoral.

Os exames foram realizados no setor de Radiologia e Diagnóstico por Imagem do Hospital Universitário de Brasília e utilizamos técnicas e processamento das imagens em concordância com o protocolo institucional. As imagens obtidas foram avaliadas por médico pesquisador subespecializado em radiologia pediátrica.

4.6. Armazenamento de Dados

Os registros do protocolo serão armazenados utilizando códigos alfanuméricos na plataforma REDCap (Research Electronic Data Capture) vinculado à Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

4.7. Análise Estatística

As variáveis contínuas foram descritas como média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil (IQR), conforme apropriado. As variáveis categóricas foram descritas como frequências e percentagens. Os participantes do estudo também foram agrupados em duas categorias diferentes com base em sua GA (pré-termo e termo, considerando o corte na 37ª semana) e BW (peso ao nascer baixo e peso ao nascer adequado, considerando o corte em 2.500g).

A prevalência de anormalidade nos parâmetros de imagem foi avaliada para cada categoria e comparada com sua prevalência nos grupos controle e exposto ao SARS-CoV-2. Um teste t de Mann-Whitney ou ANOVA foi usado para comparar os valores médios dos parâmetros de imagem. Correção de Bonferroni foi empregada quando o p-valor do teste ANOVA foi significativo de forma a se ajustar o p-valor das comparações múltiplas. O teste de tendência de Cochran-Armitage foi empregado para se avaliar a tendência ou associação dos resultados dos exames de Doppler ou Ultrassonografia.

Os valores médios dos parâmetros de neuroimagem foram comparados entre os grupos (expostos ao SARS-CoV-2 vs. controle) usando uma análise de covariância (ANCOVA). No modelo ANCOVA, as medidas dos parâmetros de neuroimagem (IR e IP para Doppler; coeficiente "E" / módulo de Young para ROIs de elastografia) foram consideradas variáveis dependentes, o grupo (exposto ao SARS-CoV-2 vs. não exposto) foi considerado a variável independente e as medidas de GA (idade gestacional) e BW (peso ao nascimento) foram consideradas covariáveis. Um nível de significância de $p < 0,05$ foi considerado. As análises foram realizadas usando o programa SAS v. 9.4 (SAS Institute, Inc., 2016).

4.8. Ética em pesquisa

Este estudo respeitou os princípios norteadores da pesquisa envolvendo seres humanos determinados pela Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Os responsáveis pelos pacientes foram informados sobre os objetivos estabelecidos e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido concordando em participar voluntariamente do estudo, sendo-lhes garantidos o anonimato, o acesso a informações sobre a pesquisa e o direito de desistir da participação a qualquer momento. O estudo foi submetido e aceito no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, dentro das normas especiais vigentes para Protocolos de Pesquisa Relacionados à COVID-19 (CAAE: 322359620.0.0000.5558) e está registrado na Plataforma Brasileira para Registro de Ensaio Clínicos. Além disso, contou com o apoio institucional da Universidade de Brasília e dos laboratórios dos grupos de pesquisa já existentes, do HUB-EBSERH, da Secretaria de Estado da Saúde do Distrito Federal (SES DF) através do Serviço de Vigilância Epidemiológica e do Hospital Regional da Asa Norte.

5. RESULTADOS

5.1. Perfil da amostra avaliada

A triagem inicial incluiu 295 voluntários, ordenados por unidade hospitalar, sexo, idade e trimestre de infecção materna. Dois voluntários retrataram sua participação no estudo, após a fase inicial. Dos 293 sujeitos avaliados, 74 foram excluídos devido a: (a) interrupção do seguimento (n = 72) e (b) diagnóstico de infecção congênita (n = 2). A amostra total após as exclusões incluiu 219 participantes, compostos por 201 sujeitos com infecção materna por SARS-CoV-2 documentada (grupo exposto; idade de nascimento = $39 \pm 2,9$ semanas [média \pm DP]; 56,6% feminino) e 18 participantes não expostos à infecção por SARS-CoV-2 (grupo controle; idade de nascimento = $39 \pm 2,8$ semanas [média \pm DP]; 53,0% feminino). A idade gestacional ao nascimento variou de 33 a 42 semanas (média de $38,1 \pm 1,8$ semanas) e o peso ao nascimento variou de 1525 a 4418 g (média de 3127 ± 535 g).

Em relação às doenças maternas anteriores à gravidez afetadas pela COVID-19, 16 pacientes (7%) possuíam história prévia de hipertensão arterial sistêmica, enquanto 3 (1,3%) relataram pré-eclâmpsia e 15 (6,8%) foram afetadas por diabetes gestacional. Quinze pacientes possuíam história de doença pulmonar (6,8%), incluindo asma, e 6 haviam apresentado doença cardíaca prévia (2,7%).

Observando-se as características clínicas do grupo controle, a média de idade de nascimento foi de 38,8 semanas de gestação, com erro padrão de $\pm 0,41$; o peso médio ao nascer para os controles é de 3277g, com erro padrão de ± 107 g; o perímetro cefálico médio é de $35 \pm 0,1$ cm. Os valores da mediana e do intervalo interquartil (IIQ) para os escores de APGAR do primeiro e quinto minuto no grupo controle foram respectivamente 8 (IIQ: 7-8) e 9 (IIQ: 9-9). Com nosso corte definido em 37 semanas para prematuridade e 2500g para baixo peso ao nascer, obtivemos 16,6% (3) indivíduos pré-termos e 11,1% (2) indivíduos com baixo peso ao

nascer no grupo controle; o grupo de casos possuiu frequências semelhantes, com 14,8% (26) indivíduos pré-terms e 16,5% (29) indivíduos com baixo peso ao nascer. Entre as comorbidades encontradas dentro dos grupos, as condições mais frequentes foram anemia, broncoespasmo, desnutrição, obesidade, rinite, dermatite, alergia à proteína do leite de vaca (APLV) e doença do refluxo gastroesofágico (DRGE). Uma tabela suplementar no *Apêndice C* está incluída para referência, demonstrando que os grupos apresentam um perfil semelhante de comorbidades.

5.2. Achados de imagem por modalidade

Ultrassonografia modo B – Escala de cinza (análise morfoestrutural)

Foi encontrada relação entre a infecção materna por SARS-CoV-2 e o envolvimento da substância branca cerebral na prole, com aumento focal de ecogenicidade das áreas anormais nos estudos em escala de cinza. Dos 201 exames realizados no grupo de casos, 18 exames apresentaram anormalidades na análise modo-B (8,9%), com doença da substância branca profunda na totalidade desses 18 casos anormais (100%). Em menor grau, também evidenciamos alterações leves nos gânglios da base (núcleos caudados e tálamo), com ecogenicidade caudo-talâmica anormal em 2 (11,1%) de 18 casos anormais no estudo em modo-B, simultaneamente aos achados de substância branca profunda.

A **Figura 16** resume os 3 planos principais para aquisição de imagens cranianas e análise ultrassonográfica de alterações da substância branca profunda. Também demonstra estudos de modo B e velocimetria Doppler por ultrassom, analisando três artérias intracranianas principais (artérias cerebrais médias, pericalosa e basilar).

Um achado igualmente significativo dos estudos de US morfométrica foi a persistência da ecogenicidade aumentada nas áreas afetadas durante o estudo de ultrassom em follow-up de

rotina, realizado 4 semanas após o estudo inicial, em todos os casos anormais. Na reavaliação, foi possível caracterizar a extensão definitiva das áreas envolvidas, com anormalidades adicionais nos gânglios da base - em geral, os núcleos caudados e os tálamos. Ainda assim, digno de nota, não houve indivíduos no grupo controle (18 de 219) com alterações ultrassonográficas na avaliação em escala de cinza.

Alterações Hemodinâmicas (análise por Dopplervelocimetria)

No grupo exposto, 21 de 201 (10,4%) indivíduos apresentaram padrões hemodinâmicos anormais, exibindo redução dos índices de resistência (IR) e pulsatilidade (IP) no fluxo sanguíneo das principais artérias intracranianas. Realizamos análises separadas de três principais artérias intracranianas: artéria cerebral média, artéria pericalosa e artéria basilar, as duas primeiras representando parâmetros hemodinâmicos para a circulação intracraniana anterior; e a velocimetria da artéria basilar como uma estimativa dos dados de fluxo da circulação posterior.

As **Figuras 17, 18 e 19** demonstram a varredura velocimétrica Doppler, com curvas espectrais para análise do fluxo das três principais artérias intracranianas (artérias cerebrais médias, pericalosas e basilares).

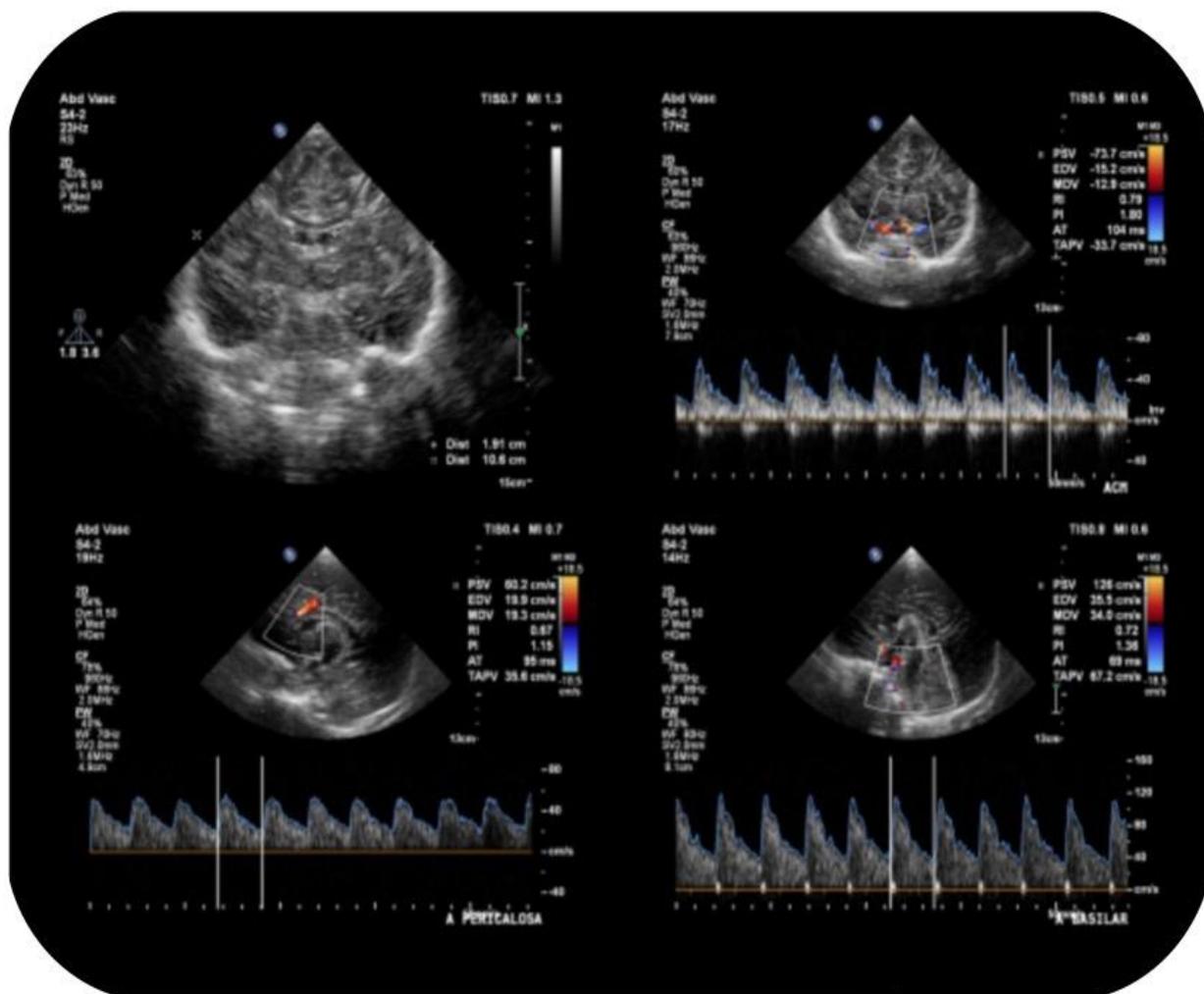


Figura 16. Imagens de ultrassonografia transcraniana em modo B (escala de cinza) corte coronal para avaliação da substância branca profunda via fontanela anterior; e Dopplerfluxometria das principais artérias intracranianas. Fonte: autoral.

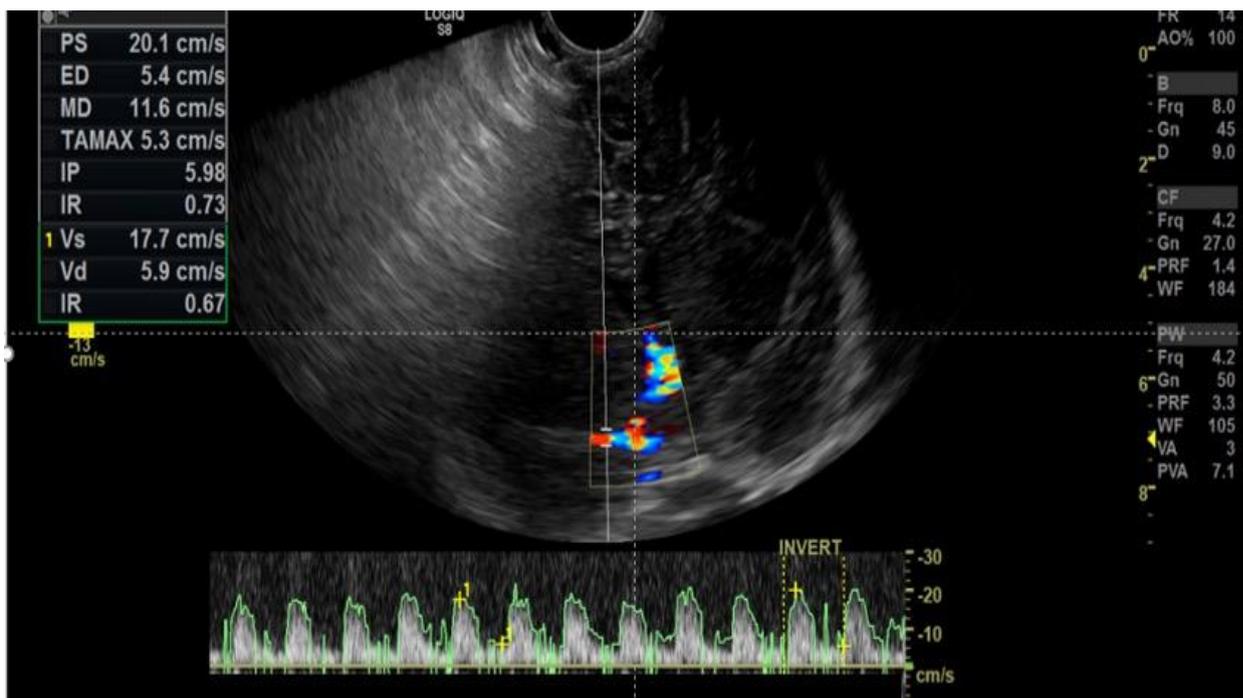


Figura 17. Imagens de ultrassonografia transcraniana em modo B (escala de cinza) coronal sobre a fontanela anterior, com Doppler colorido e espectral para avaliação de índices hemodinâmicos na artéria cerebral média. Fonte: autoral.

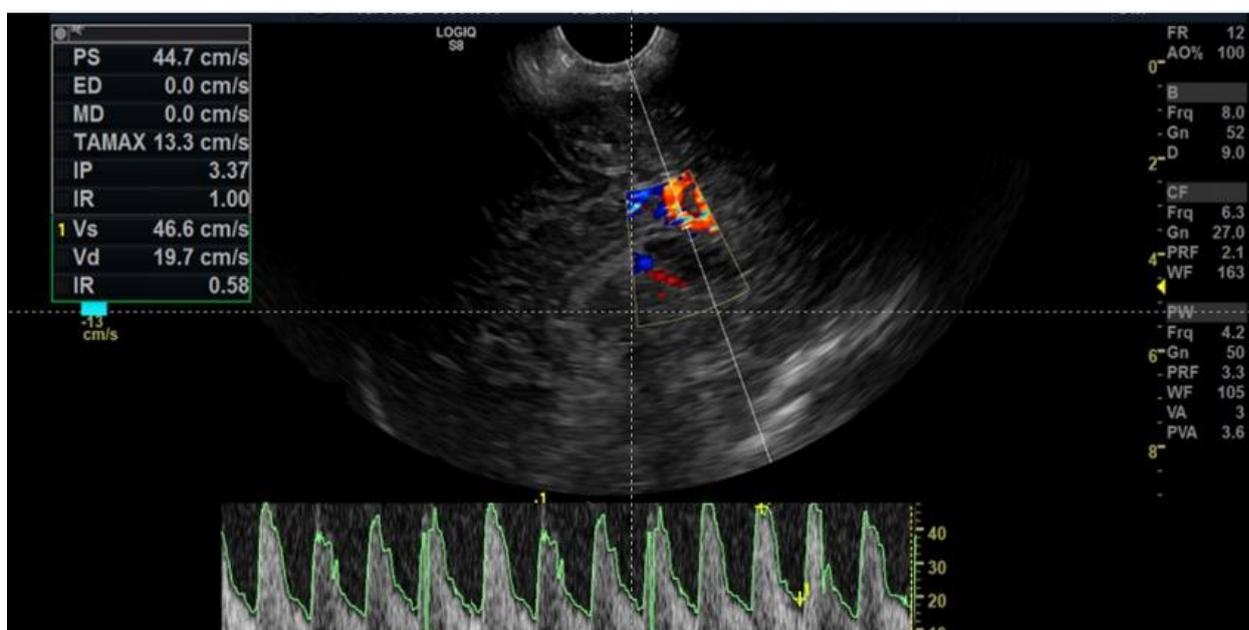


Figura 18. Imagens de ultrassonografia transcraniana em modo B (escala de cinza) sagital sobre a fontanela anterior, com Doppler colorido e espectral para avaliação dos índices hemodinâmicos na artéria pericalosa. Fonte: autoral.

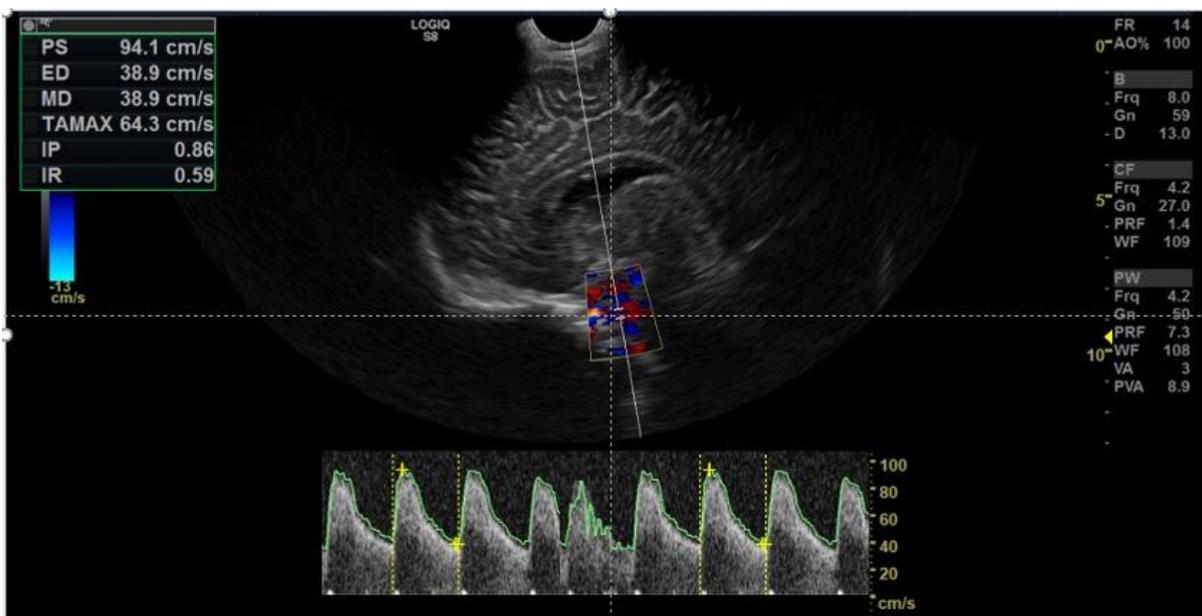


Figura 19. Imagens de ultrassonografia transcraniana em modo B (escala de cinza) coronal sobre a fontanela anterior, com Doppler colorido e espectral para avaliação dos índices hemodinâmicos da artéria basilar. As velocidades são expressas em cm/s, índices IR adimensionais e IP. Fonte: autoral.

Foi verificada uma tendência significativa de redução nos índices de resistência e pulsatilidade do fluxo intracraniano arterial em crianças expostas ao SARS-CoV-2, tanto para artérias de circulação anterior quanto posterior, positivamente correlacionada com a gravidade da infecção materna. Diminuição significativa de IR e IP foi encontrada em casos de infecção gestacional grave por SARS-CoV-2, com valores médios de IP de 1,09 para a ACM (artéria cerebral média), 0,98 para a AP (artéria pericalosa) e 1,04 para a AB (artéria basilar).

A Tabela 1 demonstra os parâmetros de neuroimagem distribuídos de acordo com a gravidade da infecção materna (categorias de gravidade COVID-19 de acordo com a classificação da OMS).

Tabela 1. Parâmetros de imagem avaliados em lactentes, distribuídos entre grupos exposto (casos) e não-exposto (controle) ao SARS-CoV-2 durante a gestação, categorizados de acordo com a gravidade da infecção materna (categorias de gravidade COVID-19 de acordo com a classificação da OMS).

Variável*	COVID-19 Escala de Gravidade - OMS			ANOVA	Comparações Múltiplas p-valor #		
	Leve (n = 165)	Grave (n = 23)	Crítica (n = 8)	p-valor	Leve x Grave	Leve x Crítica	Grave x Crítica
ACM IR	0.77±0.09	0.75±0.10	0.64±0.14	0.0011	0.8394	0.0010	0.0260
ACM IP	1.64±0.50	1.47±0.38	1.09±0.45	0.0039	0.3789	0.0064	0.1713
Pericalosa IR	0.70±0.08	0.68±0.10	0.61±0.09	0.0062	0.7004	0.0070	0.1185
Pericalosa IP	1.29±0.31	1.19±0.25	0.98±0.24	0.0113	0.4744	0.0181	0.2833
Basilar IR	0.72±0.07	0.69±0.09	0.64±0.09	0.0032	0.1692	0.0093	0.3330
Basilar IP	1.34±0.29	1.24±0.28	1.04±0.28	0.0121	0.4389	0.0208	0.3229

ACM= artéria cerebral média, IR=índice de resistência, IP=índice de pulsatilidade

* Valores expressos em média ± erro padrão

p-valor para múltiplas comparações ajustado com correção de Bonferroni

Quando as duas análises, ultrassonografia modo B e Doppler scan, foram integradas e cruzadas com as categorias de gravidade da infecção materna, foi possível identificar uma correlação positiva entre os resultados de neuroimagem anormais aumentando proporcionalmente à gravidade da infecção materna, e um pico de resultados de neuroimagem anormal em crianças cujas mães tiveram infecção crítica por SARS-CoV-2 durante a gravidez. Esses dados estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros de neuroimagem (ultrassonografia modo-B e Doppler espectral) avaliados em lactentes, distribuídos entre grupos exposto (casos) e não-exposto (controle) ao SARS-CoV-2 durante a gestação, categorizados de acordo com a Escala de gravidade da COVID-19 materna segundo a classificação da OMS.

Variável*	OMS - Escala de gravidade da COVID-19			Teste de Correlação de Pearson (IC 95%)	p-valor [#]
	Leve (n = 166)	Grave (n = 23)	Crítica (n = 8)		
Doppler Intracraniano				0.23(0.06;0.40)	< 0.001
Anormal	11 (6.63)	5 (21.74)	5 (62.50)		
Normal	155(93.37)	18 (78.26)	3 (37.50)		
Ultrassonografia				0.24(0.06;0.42)	< 0.001
Anormal	9 (5.42)	5 (21.74)	4 (50.00)		
Normal	157(94.58)	18 (78.26)	4 (50.00)		

* Valores expressos em frequência (%)

p-valor calculado com teste de tendência Cochran-Armitage

Outra tendência em relação aos dados hemodinâmicos foi identificada nesta análise, relacionada ao período de infecção materna por SARS-CoV-2 durante a gravidez. Uma redução significativa nos índices de resistividade e pulsatilidade do fluxo intracraniano arterial correlacionou-se positivamente com o terceiro trimestre da infecção materna por SARS-Cov-2, conforme mostrado **na Tabela 3**.

Tabela 3. Parâmetros de neuroimagem (ultrassonografia modo-B e Doppler espectral) avaliados em lactentes, distribuídos entre grupos exposto (casos) e não-exposto (controle) ao SARS-CoV-2 durante a gestação, categorizados de acordo com o trimestre gestacional da infecção materna.

Variável*	Trimestre gestacional de infecção por SARS-CoV-2*				Correlação Pearson (IC 95%)	p-valor#
	1ºTri (n=27)	2ºTri (n=58)	3ºTri (n = 95)	Periparto (n = 21)		
Doppler das artérias intracranianas					0.43 (0.32; 0.54)	< 0.001
Anormal	0 (0.00)	1 (1.72)	6 (6.32)	14 (66.67)		
Normal	27 (100.00)	57 (98.28)	89 (93.68)	7 (33.33)		
Ultrassonografia modo-B					0.41 (0.30; 0.53)	< 0.001
Anormal	0 (0.00)	1 (1.72)	4 (4.21)	13 (61.90)		
Normal	27 (100.00)	57 (98.28)	91 (95.79)	8 (38.10)		

* Valores expressos em frequência (%)

p-valor calculado com teste de tendência de Cochran-Armitage

Os dados de avaliação hemodinâmica demonstram uma correlação significativa entre os índices de resistência/pulsatilidade nas principais artérias intracranianas e o trimestre da infecção materna, com a maior frequência proporcional de resultados anormais verificada em casos de infecção periparto (definida como um período igual ou inferior a 14 dias entre a infecção por SARS-CoV-2 e a data do parto). Entre as mulheres grávidas infectadas durante este período, 66% apresentaram Dopplervelocimetria anormal e quase 62% apresentaram ultrassonografia craniana anormal em modo-B.

Achados de Elastografia (por ultrassonografia modo shear-wave)

Estudos funcionais baseados em elastografia por onda de cisalhamento foram realizados em cinco regiões de interesse (ROIs) e as referências de corte "E" foram adotadas de acordo com a literatura recente anterior [230,231,211], pois até o momento ainda não existe um parâmetro de normalidade definitivo para estudos de elastografia em cérebro pediátrico.

Foi encontrada uma relação significativa entre a exposição materna ao SARS-CoV-2 e as alterações na elastografia, principalmente na substância branca profunda cerebral e gânglios da base em termos de alterações na rigidez tecidual, com diminuição do módulo de elasticidade (E) no grupo exposto ao SARS-CoV-2, quando comparado aos controles. A **Tabela 4** demonstra esses achados categorizados de acordo com os ROIs.

O grupo exposto ao SARS-CoV-2 apresentou coeficientes "E" significativamente menores em áreas específicas do cérebro, incluindo substância branca profunda / periventricular e esplênio do corpo caloso. Os gânglios da base (núcleos caudados e tálamos), a substância branca superficial e a substância cinzenta cortical também mostraram variações na rigidez associadas à exposição ao SARS-CoV-2, embora em menor grau.

Uma relação dose-resposta significativa foi encontrada entre a exposição ao SARS-CoV-2 durante a gravidez e a presença de anormalidades de neuroimagem, incluindo as modalidades de escala de cinza, Doppler e elastografia.

Tabela 4. Parâmetros de neuroimagem avaliados nos lactentes, distribuídos entre grupos exposto (casos) e não-exposto (controle) ao SARS-CoV-2 durante a gestação, de acordo com as regiões de interesse (ROIs) para análise elastográfica: substância branca profunda (DWM), substância branca frontal subcortical (FWM), núcleos caudados e tálamos, corpo caloso, e córtex frontal.

Variável*	Grupos		p-valor [#]
	Casos (n= 201)	Controles (n = 18)	
Elastografia DWM	3.98±0.62	7.76±0.77	<0.001
Elastografia FWM	3.31±0.59	4.69±0.85	<0.001
Elastografia dos núcleos Caudados e Tálamos	5.45±0.64	6.46±0.96	<0.001
Elastografia do Corpo caloso	4.53±0.39	7.93±0.88	<0.001
Elastografia do Córtex frontal	5.62±0.57	6.59±0.66	<0.001

* valores expressos em Kilopascal, como média ± erro padrão

p-valor calculado por teste Mann-Whitney

DWM: substância branca profunda; FWM: substância branca frontal subcortical

As médias dos parâmetros de neuroimagem também foram comparadas entre os grupos (exposição ao SARS-CoV-2 versus não exposição) usando um modelo de análise de covariância (ANCOVA). Neste modelo ANCOVA, as medidas dos parâmetros de neuroimagem (índices hemodinâmicos e módulos de elasticidade) foram consideradas como variáveis dependentes, o grupo (exposição ao SARS-CoV-2 versus não exposição) foi considerado como variável independente e as medidas de GA (idade gestacional) e BW (peso ao nascer) foram consideradas como covariáveis. Assim, o modelo ANCOVA foi usado para controlar a influência da idade gestacional e do peso ao nascer nos resultados, a fim de obter uma estimativa mais precisa do efeito da exposição ao SARS-CoV-2 sobre os achados de neuroimagem.

Os resultados do modelo ANCOVA mostraram que a exposição ao SARS-CoV-2 durante a gravidez foi associada a valores significativamente menores dos índices hemodinâmicos e módulos de elasticidade no cérebro, mesmo após controlada a influência da idade gestacional e do peso ao nascimento. Isso sugere que a exposição ao SARS-CoV-2 pode ter um efeito direto na microestrutura cerebral do feto e do lactente.

Tabela 5. Parâmetros de neuroimagem avaliados em lactentes, distribuídos entre grupos exposto (casos) e não-exposto (controle) ao SARS-CoV-2 durante a gestação, controlados para GA (idade gestacional) e BW (peso ao nascimento), de acordo com as regiões de interesse (ROIs) para análise por Elastografia: substância branca profunda (DWM), substância branca frontal subcortical (FWM), núcleos caudados e tálamos, corpo caloso, e córtex frontal (continua).

Variável	Grupos – Valor médio [#] ± erro padrão		Comparação entre grupos	
	Casos (n = 201)	Controles (n=18)	Diferença [IC 95%]	p-valor*
ACM - IR	0.76 ± 0.01	0.79 ± 0.01	-0.03 [-0.07; -0.00]	0.0451
ACM - IP	1.59 ± 0.03	1.65 ± 0.08	-0.04 [-0.08; -0.00]	0.0434
Artéria Pericalosa - IR	0.70 ± 0.00	0.73 ± 0.01	-0.03 [-0.06; -0.00]	0.0277
Artéria Pericalosa - IP	1.26 ± 0.02	1.40 ± 0.05	-0.14 [-0.25; -0.03]	0.0123
Artéria Basilar - IR	0.71 ± 0.00	0.73 ± 0.02	-0.02 [-0.04; 0.01]	0.2324
Artéria Basilar - IP	1.31 ± 0.02	1.32 ± 0.07	-0.01 [-0.14; 0.14]	0.9585
Elastografia - DWM	3.98 ± 0.04	7.77 ± 0.11	-3.80 [-4.03; -3.57]	< 0.001
Elastografia - FWM	3.31 ± 0.04	4.69 ± 0.11	-1.37 [-1.60; -1.14]	< 0.001
Elastografia – Núcleos caudados e tálamos	5.46 ± 0.05	6.45 ± 0.12	-0.99 [-1.24; -0.74]	< 0.001
Elastografia - Corpo caloso	4.56 ± 0.03	7.92 ± 0.08	-3.38 [-3.56; -3.20]	< 0.001
Elastografia – Córtex frontal	5.61 ± 0.04	6.60 ± 0.10	-0.99 [-1.20; -0.78]	< 0.001

resultados expressos em Kilopascal, como média ± erro padrão.

valores médios ajustados pelo modelo ANCOVA.

* p-valor para comparação entre grupos calculado utilizando-se modelo ANCOVA, tendo GA e BW como covariáveis. ACM: artéria cerebral média, IR: índice de resistência, IP: índice de pulsatilidade. DWM: substância branca profunda; FWM: substância branca frontal subcortical

Conforme demonstrado na Tabela 5, os parâmetros de neuroimagem dos pacientes apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos, mesmo quando controlados para idade gestacional e peso ao nascimento. De acordo com os dados, o valor médio da elasticidade da substância branca profunda no grupo exposto ao SARS-CoV-2 foi de $3,98 \pm 0,04$, enquanto no grupo sem SARS-CoV-2 foi de $7,77 \pm 0,11$. A diferença entre os dois grupos é $-3,80$ com um intervalo de confiança de 95% de $[-4,03, -3,57]$ e um valor de p inferior a 0,001. Portanto, existe diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos para este parâmetro, indicando que pacientes expostos ao SARS-CoV-2 apresentaram valores mais baixos de elasticidade da substância branca profunda em comparação aos que não foram expostos ao SARS-CoV-2 durante a gestação.

Em contraste, os parâmetros para apenas um dos vasos (artéria basilar) não mostraram diferença significativa entre os dois grupos, quando ajustados para idade gestacional e peso ao nascimento. Considerando-se o IR da artéria basilar, a diferença entre os dois grupos é $-0,02$ com um intervalo de confiança de 95% de $[-0,04, 0,01]$ e um valor de p de 0,2324.

6. DISCUSSÃO

6.1.1. Evidências gerais

A resposta inflamatória sistêmica ao vírus SARS-CoV-2 e o consequente dano endotelial provaram estar envolvidos na patogênese da COVID-19, com evidências replicadas em muitos estudos, em ambos os contextos bioquímico e clínico [232-234]. Embora existam amplas evidências epidemiológicas dos efeitos sistêmicos da COVID-19 [235,236], as consequências neurológicas da exposição ao SARS-CoV-2 no grupo pediátrico ainda são incertas, e as evidências atuais são baseadas principalmente em relatos de casos [237,238]. Não está claro se, e em que medida, a barreira hematoencefálica funciona como um fator protetor no bloqueio de citocinas inflamatórias [239-242].

Nosso estudo fornece evidências de que a infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez pode estar associada a comprometimento estrutural e funcional do cérebro em lactentes. Os achados mais recorrentes foram caracterizados na substância branca profunda cerebral, embora todas as outras regiões de interesse avaliadas no encéfalo tenham apresentado alterações em algum grau. Essas alterações foram manifestadas por aumento da ecogenicidade regional em estudos em modo B, redução da resistividade/pulsatilidade correspondente no fluxo arterial intracraniano e diminuição do módulo de elasticidade cerebral. A menor rigidez no tecido cerebral, especialmente na substância branca profunda, pode representar uma diminuição da quantidade de mielina tissular no sistema nervoso central, elemento crucial para o neurodesenvolvimento adequado em crianças. Poucos estudos de neuroimagem foram realizados neste campo com indivíduos pediátricos, portanto, nossos resultados trazem evidências sem precedentes, com base em anormalidades estruturais e funcionais.

6.2. Achados ultrassonográficos (escala de cinza)

Os exames de neuroimagem estrutural em nosso estudo mostraram repetidamente envolvimento da substância branca em casos anormais entre os indivíduos expostos ao SARS-CoV-2. Até o momento, há séries de casos publicadas [243,244], relatando um padrão de envolvimento semelhante na COVID-19, mas nenhum estudo longitudinal com grupo exposto ao SARS-CoV-2 e grupo controle não exposto, correlacionando os achados de neuroimagem e o seguimento clínico.

Dado que no período neonatal e na primeira infância há uma circulação colateral excepcional nos vasos cerebrais, o padrão de envolvimento parenquimatoso nesses indivíduos tende a afetar menos a substância cinzenta cortical (diferentemente do indivíduo adulto). Em resposta a uma lesão vascular e/ou hipóxia encefálica, a substância branca profunda é uma das primeiras áreas afetadas no cérebro durante este período inicial da vida. [245-247]. Esse achado foi replicado em nossos resultados, pois as áreas de substância branca profunda e gânglios basais apresentaram-se como regiões com ecogenicidade mais alta em exames de modo B anormais, quando comparadas ao controle (grupo não exposto). Em nossa amostra, 18 indivíduos cujas mães foram infectadas com SARS-CoV-2 durante a gravidez manifestaram algum grau de doença da substância branca, dos quais 16 (88,8%) apresentaram comprometimento exclusivo da substância branca e 2 (11,2%) apresentaram envolvimento simultâneo da substância branca profunda e dos gânglios basais do cérebro (tálamos e caudados). Outro achado significativo dos estudos morfológicos por ultrassonografia foi a persistência de ecogenicidade aumentada nas áreas afetadas durante o exame ultrassonográfico de acompanhamento de rotina, realizado 4 semanas após o exame inicial, para todos os casos anormais. Na reavaliação, foi possível caracterizar o aumento da extensão das áreas afetadas em 3 indivíduos (16,6%), que evoluíram de lesões iniciais de substância branca profunda para anormalidades adicionais nos gânglios basais,

principalmente os núcleos caudados e os tálamos.

Embora ainda não esteja clara a correlação entre as alterações dos gânglios basais e a síndrome clínica da COVID-19, supõe-se que elas desempenhem um papel no dano de longa duração que algumas crianças apresentam, manifestando-se como sintomas tardios pós-COVID-19, com atraso no desenvolvimento neurológico e falha em atingir marcos neuro-psicomotores em idades específicas [248,249].

6.2.1.1. Achados hemodinâmicos (avaliação doppler)

Nossos dados sobre a análise do fluxo sanguíneo intracraniano em ambos os grupos sugerem uma tendência significativa de diminuição dos índices IR (resistência) e IP (pulsatilidade) no grupo exposto ao SARS-Cov-2 quando as infecções maternas ocorrem nos últimos 14 dias de gestação e em casos graves. Esse fato é considerado consequência da adaptação sistêmica à condição inflamatória sustentada, que pode persistir mesmo após os primeiros 14 dias de sintomas virais agudos [250,251]. Os casos de infecção materna precoce pelo SARS-CoV-2 durante a gravidez, especialmente no primeiro e segundo trimestres, permitiriam tempo suficiente para a autorregulação do fluxo arterial e a remissão da resposta inflamatória sistêmica.

6.2.2. Achados de elastografia encefálica

Até onde sabemos, nenhum estudo anterior avaliou os parâmetros de elastografia do parênquima cerebral em crianças expostas ao SARS-CoV-2 durante a gravidez. As poucas publicações na literatura pediátrica compreendem pequenas séries de casos de indivíduos saudáveis, que visavam sugerir valores de elastografia padrão para o parênquima cerebral normal em neonatos [252,253]. Outros estudos semelhantes foram realizados em

camundongos com correlações anatomopatológicas [254,255]. Os experimentos com camundongos obtiveram um nível significativo de congruência com os valores do cérebro humano, o que supostamente está relacionado a coeficientes de elasticidade/densidade de energia (ρ) muito semelhantes entre cérebros de camundongos e humanos.

Quando analisados os dados de elastografia dos grupos de nosso estudo, foram evidenciadas diferenças significativas entre as crianças expostas ao SARS-Cov-2 e o grupo não exposto, em termos de módulo de elasticidade do parênquima cerebral. Todas as regiões de interesse (ROIs) demonstraram redução do coeficiente de elasticidade/módulo de Young (E) no grupo exposto ao SARS-CoV-2.

As diferenças dos padrões de elastografia entre os dois grupos foram mais pronunciadas na zona de substância branca profunda DWM (ROI número 1), se comparadas a outras regiões de análise como a substância branca subcortical e o córtex frontal. Uma hipótese plausível está ligada às diferenças na composição tissular dessas regiões, com a predominância principal de mielina na substância branca profunda [212]. Se levarmos em consideração também a idade dos sujeitos (6 meses de idade cronológica ajustada), nossa região de interesse / análise na substância branca profunda deveria estar normalmente mielinizada neste estágio, diferentemente das zonas subcorticais ou corticais frontais [256-258].

Esses elementos sugerem que os achados cerebrais relacionados à exposição ao SARS-CoV-2 durante a gravidez podem, em certa medida, ser consequência de alterações na quantidade de mielina no tecido cerebral, uma vez que se sabe que tecidos com menos mielina apresentam uma diminuição em seus coeficientes de elasticidade, correspondendo à redução na velocidade de propagação das ondas de cisalhamento / menor rigidez. Outro mecanismo possível pode ser o de edema intramielínico leve, com inflamação causando aumento do conteúdo hídrico no tecido cerebral, o que levaria à diminuição da rigidez do

tecido.

Nossos achados estão em consonância com estudos recentes que investigam o impacto da infecção pelo SARS-CoV-2 durante a gravidez no neurodesenvolvimento pediátrico. No que diz respeito à neuroimagem, um estudo publicado em outubro de 2021 teve como objetivo avaliar a associação entre a infecção materna pelo SARS-CoV-2 durante a gravidez e o desenvolvimento do cérebro na prole por meio de exames de ressonância magnética (RM) [259]. O estudo acompanhou 55 bebês nascidos de mães com infecção pelo SARS-CoV-2 durante a gravidez. Os pesquisadores descobriram que os bebês nascidos de mães com infecção pelo SARS-CoV-2 durante a gravidez apresentavam menor espessura cortical no giro temporal superior esquerdo, que é uma região importante do cérebro para a linguagem e a comunicação social, e a espessura cortical anormal nesta região tem sido associada a distúrbios do neurodesenvolvimento, como o transtorno do espectro do autismo. O estudo sugere que a infecção materna pelo SARS-CoV-2 durante a gravidez pode afetar o desenvolvimento do cérebro na prole, particularmente nas regiões cerebrais importantes para a linguagem e a comunicação social.

Protocolos com foco mais clínico incluíram um estudo publicado em janeiro de 2022 que acompanhou 205 crianças nascidas de mães com infecção pelo SARS-CoV-2 durante a gravidez [260]; evidenciou-se que as crianças nascidas de mães com infecção pelo SARS-CoV-2 durante a gravidez apresentavam um risco aumentado de atrasos no desenvolvimento aos 12 meses de idade em comparação com crianças nascidas de mães sem infecção pelo SARS-CoV-2. Outro estudo publicado em agosto de 2021 encontrou que crianças nascidas de mães com COVID-19 grave ou crítica durante a gravidez apresentaram um maior risco de atrasos no desenvolvimento cognitivo, motor e linguístico aos 6 meses de idade em comparação com crianças nascidas de mães sem COVID-19 [261]. O estudo acompanhou 150 bebês nascidos de mães com COVID-19 e 150 bebês nascidos de mães sem COVID-19.

Vale ressaltar que esses estudos têm limitações e mais pesquisas são necessárias para entender completamente o impacto potencial da infecção pelo SARS-CoV-2 durante a gravidez sobre neurodesenvolvimento pediátrico. No entanto, os resultados sugerem que os profissionais de saúde devem monitorar de perto as crianças nascidas de mães com infecção pelo SARS-CoV-2 durante a gravidez, a fim de identificar precocemente qualquer sinal de atraso no desenvolvimento ou distúrbio neuropsicomotor na criança.

6.3. Limitações

Estudos clínicos têm sugerido a existência de uma relação causal entre a infecção por SARS-CoV-2 e resultados perinatais adversos, porém tal relação ainda não está definitivamente estabelecida, pois existem muitos fatores de confusão potenciais. Entre estes, devemos enfatizar que as mães infectadas por SARS-CoV-2 durante a gravidez tendem a apresentar complicações gestacionais, incluindo condições adversas de parto, antecipação do parto, hipóxia materna e neonatal - fatores que podem levar a danos no sistema nervoso central por si mesmos. Controlar todos esses fatores de confusão pode ser um desafio. Nosso estudo tentou controlar alguns desses possíveis vieses com técnicas de análise de covariância. No entanto, muitas características relacionadas ao estado clínico materno, por exemplo, hipertensão gestacional, diabetes, doenças pulmonares anteriores e obesidade, persistiram em nossa amostra para ambos os grupos e podem afetar os resultados de neurodesenvolvimento.

Também é relevante considerar que a maioria da nossa amostra foi composta por pacientes ambulatoriais, de modo que a gravidade da infecção materna foi predominantemente leve a moderada, e houve uma desproporção quantitativa entre os grupos de casos e controles, dado o contexto de múltiplos “lockdowns” e subsequente vacinação contra o SARS-CoV-2 - este último constituiu um dos critérios de exclusão para o grupo controle.

Reconhecemos a diferença substancial no tamanho da amostra entre os casos e os controles, e a possibilidade de introdução de viés como resultado. Dado que os desfechos pediátricos da exposição materna ao SARS-CoV-2 durante a gravidez estão pouco definidos até o momento, uma estimativa precisa do tamanho da amostra prospectiva para casos e controles não foi viável. No entanto, foi realizada uma análise post-hoc para estimar o número de controles necessário para manter uma probabilidade de erro (alfa) de 0,05 com um poder de 0,8 usando a frequência relativa de achados de imagem anormais nos casos. Usamos um teste de razão de verossimilhança para estimar o tamanho da amostra necessária para os controles e encontramos um $N = 9$. Assim, acreditamos que o grupo controle em nosso estudo é suficiente para responder os questionamentos propostos nessa pesquisa. Além disso, no recrutamento prospectivo de nossos controles, os indivíduos foram selecionados aleatoriamente de uma grande população representativa em nosso sistema universal de saúde pública.

7. CONCLUSÃO

- A infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez está relacionada a alterações encefálicas em uma fração relevante dos casos, predominantemente envolvendo a substância branca profunda cerebral (DWM). A leucopatia pediátrica relacionada ao SARS-CoV-2 se manifesta na neuroimagem com aumento da ecogenicidade e redução dos coeficientes de elasticidade (E) na substância branca profunda, o que significa redução da rigidez tecidual, provavelmente traduzindo uma redução da quantidade de mielina na região de análise.
- O principal efeito da exposição ao SARS-CoV-2 durante o período gestacional sobre a estrutura do encéfalo nos lactentes mostrou ser uma leucopatia de substância branca profunda.
- Dentre os efeitos da exposição ao SARS-CoV-2 na dinâmica de fluxo cerebral das artérias intracranianas e nos parâmetros de elastografia do parênquima encefálico, nosso estudo demonstrou tendência de redução nos índices de resistência e pulsatilidade arterial, com alterações mais expressivas relacionadas a infecção materna no período periparto. O grupo de lactentes exposto ao SARS-CoV-2 durante a gestação demonstrou alterações de Elastografia consistentes com redução nos módulos de elasticidade encefálicos nas regiões de análise, inferindo-se redução na quantidade de mielina tecidual.
- Essas descobertas abrem um espectro de possibilidades de pesquisa sobre os efeitos na saúde fetal, neonatal e infantil. A descrição das consequências da infecção no acompanhamento de longo prazo fornece uma melhor compreensão da doença e sua influência no sistema nervoso central.
- Ao compreender os correlatos de neuroimagem da infecção por SARS-CoV-2 no período perinatal, este estudo pode traçar um panorama mais amplo do padrão de apresentação no cérebro de indivíduos expostos ao SARS-CoV-2 durante a gestação. A caracterização da substância branca profunda cerebral como área de maior risco para dano neurológico pediátrico após infecção materna por SARS-CoV-2 torna possível avaliar os correlatos clínicos e a prevenção de sequelas no neurodesenvolvimento dessas crianças.

8. PERSPECTIVAS

- Com o desenho do protocolo de estudo e dados de neuroimagem analisados, produzimos material científico na forma de artigos completos em periódicos de alto impacto, conforme a seguir. Pesquisas e publicações adicionais deverão advir das análises multivariadas com cruzamento entre dados de neuroimagem e os desfechos clínicos de neurodesenvolvimento nas crianças avaliadas.
- Pretendemos estender a testagem de correlação entre dados de elastografia encefálica e escalas de desenvolvimento neuropsicomotor, com dados até os 24 meses de idade cronológica (escala Bayley III).
- Prosseguimento de análises estatísticas multivariadas entre variáveis de neuroimagem e possíveis desfechos clínicos com o seguimento de longo prazo das crianças expostas.
- Recrutamento de pacientes do banco de dados para posterior avaliação por RM do encéfalo após fase de mielinização completa (após 24 meses), identificando possíveis alterações morfológicas e/ou funcionais de longo prazo.
- Pesquisas futuras com métodos axiais correlacionados, como ressonância magnética e tractografia, podem contribuir para prever áreas do cérebro mais vulneráveis à encefalopatia relacionada ao SARS-CoV-2 e delimitar regiões com propensão à redução ou atraso da mielinização. Nosso estudo identificou a substância branca profunda como área de maior vulnerabilidade a essas alterações.

9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA (ARTIGOS PUBLICADOS)

- Araujo DA, Motta F, Fernandes GM, Castro MEC, Sasaki LMP, et al. **Neuroimaging assessment of pediatric cerebral changes associated with SARS-CoV-2 infection during pregnancy. *Frontiers in Pediatrics*, v. 11, p. 01, 2023. (Apêndice A - Qualis Capes A2 – FI 3,24). Consoante ao regimento do PPGCM-UnB.**
- Fernandes GM, Araujo DA, Motta F, Castro MEC, Sasaki LMP, et al. Pregnancy Outcomes and Child Development Effects of SARS-CoV-2 Infection (PROUDEST Trial): Protocol for a Multicenter, Prospective Cohort Study. *JMIR Research Protocols* [JMIR Res Protoc 2021 | vol. 10 | iss. 4 | e26477]. (Apêndice B – PROTOCOLO PROUDEST - Qualis Capes B2 – FI 1,25).
- Fernandes GM, Araujo DA, Motta F, Castro MEC, Sasaki LMP, et al. Panoramic snapshot of serum soluble mediator interplay in pregnant women with convalescent COVID-19: an exploratory study. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 01, 2023. (Apêndice C - Qualis Capes A2 – FI 7.30).
- Apresentação oral sobre o tema em congresso internacional (4th joint European Neonatal Societies Congress – Milão, Itália).

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020; 382:727.
2. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 2020; 5:536.
3. Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020; 395:565.
4. Abdel-Mannan O, Eyre M, Löbel U, Bamford A et al., Neurologic and Radiographic Findings Associated with COVID-19 Infection in Children. *JAMA Neurol.* 2020 Nov 1;77(11):1440-1445.
5. Patel, P.B. and D. Bearden, Neuropathogenesis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Curr Opin Pediatr*, 2021. 33(6): p. 597-602.
6. Carvajal, J., et al., Functional consequences of SARS-CoV-2 infection in pregnant women, fetoplacental unit, and neonate. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2023. 1869(1):p.166582.
7. Beyrouti 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; pii: jnnp-2020-323586. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-323586>.
8. 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. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2009787>.
9. Pezzini A, Padovani A. Lifting the mask on neurological manifestations of COVID-19. *Nat Rev Neurol* 2020; 16:636.
10. Thakur KT, Miller EH, Glendinning MD, et al. COVID-19 neuropathology at Columbia University Irving Medical Center/New York Presbyterian Hospital. *Brain* 2021; 144:2696.
11. Solomon IH, Normandin E, Bhattacharyya S, et al. Neuropathological Features of Covid-19. *N Engl J Med* 2020; 383:989.
12. Lee MH, Perl DP, Steiner J, et al. Neurovascular injury with complement activation and inflammation in COVID-19. *Brain* 2022; 145:2555.
13. Agarwal S, Jain R, Dogra S, et al. Cerebral Microbleeds and Leukoencephalopathy in Critically Ill Patients With COVID-19. *Stroke* 2020; 51:2649.
14. Pilotto A, Padovani A, ENCOVID-BIO Network. Reply to the Letter "COVID-19-Associated Encephalopathy and Cytokine-Mediated Neuroinflammation". *Ann Neurol* 2020; 88:861.
15. Muccioli L, Pensato U, Cani I, et al. COVID-19-Associated Encephalopathy and Cytokine-Mediated Neuroinflammation. *Ann Neurol* 2020; 88:860.

16. Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol* 2017; 39:529.
17. Huang KJ, Su IJ, Theron M, et al. An interferon-gamma-related cytokine storm in SARS patients. *J Med Virol* 2005; 75:185.
18. Korolnik IJ, Tyler KL. COVID-19: A Global Threat to the Nervous System. *Ann Neurol* 2020; 88:1.
19. Fotuhi M, Mian A, Meysami S, Raji CA. Neurobiology of COVID-19. *J Alzheimers Dis* 2020; 76:3.
20. Al-Dalahmah O, Thakur KT, Nordvig AS, et al. Neuronophagia and microglial nodules in a SARS-CoV-2 patient with cerebellar hemorrhage. *Acta Neuropathol Commun* 2020; 8:147.
21. Soung AL, Vanderheiden A, Nordvig AS, et al. COVID-19 induces CNS cytokine expression and loss of hippocampal neurogenesis. *Brain* 2022; 145:4193.
22. Connors JM, Levy JH. Thromboinflammation and the hypercoagulability of COVID-19. *J Thromb Haemost* 2020; 18:1559.
23. Lei Y, Zhang J, Schiavon CR, et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Impairs Endothelial Function via Downregulation of ACE 2. *Circ Res* 2021; 128:1323.
24. Magro C, Mulvey JJ, Berlin D, et al. Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: A report of five cases. *Transl Res* 2020; 220:1.
25. Apple AC, Oddi A, Peluso MJ, et al. Risk factors and abnormal cerebrospinal fluid associate with cognitive symptoms after mild COVID-19. *Ann Clin Transl Neurol* 2022; 9:221.
26. Zhou Y, Han T, Chen J, et al. Clinical and Autoimmune Characteristics of Severe and Critical Cases of COVID-19. *Clin Transl Sci* 2020; 13:1077.
27. Wang EY, Mao T, Klein J, et al. Diverse functional autoantibodies in patients with COVID-19. *Nature* 2021; 595:283.
28. Zhao H, Shen D, Zhou H, et al. Guillain-Barré syndrome associated with SARS-CoV-2 infection: causality or coincidence? *Lancet Neurol* 2020; 19:383.
29. Matschke J, Lütgehetmann M, Hagel C, et al. Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series. *Lancet Neurol* 2020; 19:919.
30. Meinhardt J, Radke J, Dittmayer C, et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci* 2021; 24:168.
31. Song E, Zhang C, Israelow B, et al. Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *bioRxiv* 2020.
32. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet* 2020; 395:1417.
33. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med* 2020; 383:120.

34. Goldsmith CS, Miller SE, Martines RB, et al. Electron microscopy of SARS-CoV-2: a challenging task. *Lancet* 2020; 395:e99.
35. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al. Electron microscopy of SARS-CoV-2: a challenging task - Authors' reply. *Lancet* 2020; 395:e100.
36. Douaud G, Lee S, Alfaro-Almagro F, et al. SARS-CoV-2 is associated with changes in brain structure in UK Biobank. *Nature* 2022; 604:697.
37. Hanson BA, Visvabharathy L, Ali ST, et al. Plasma Biomarkers of Neuropathogenesis in Hospitalized Patients With COVID-19 and Those With Postacute Sequelae of SARS-CoV-2 Infection. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2022; 9.
38. Frontera JA, Boutajangout A, Masurkar AV, et al. Comparison of serum neurodegenerative biomarkers among hospitalized COVID-19 patients versus non-COVID subjects with normal cognition, mild cognitive impairment, or Alzheimer's dementia. *Alzheimers Dement* 2022; 18:899.
39. Saniasiaya J, Islam MA, Abdullah B. Prevalence of Olfactory Dysfunction in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Meta-analysis of 27,492 Patients. *Laryngoscope* 2021; 131:865.
40. Bilinska K, Jakubowska P, Von Bartheld CS, Butowt R. Expression of the SARS-CoV-2 Entry Proteins, ACE2 and TMPRSS2, in Cells of the Olfactory Epithelium: Identification of Cell Types and Trends with Age. *ACS Chem Neurosci* 2020; 11:1555.
41. Aragão MFVV, Leal MC, Cartaxo Filho OQ, et al. Anosmia in COVID-19 Associated with Injury to the Olfactory Bulbs Evident on MRI. *AJNR Am J Neuroradiol* 2020; 41:1703.
42. Li CW, Syue LS, Tsai YS, et al. Anosmia and olfactory tract neuropathy in a case of COVID-19. *J Microbiol Immunol Infect* 2021; 54:93.
43. Coolen T, Lolli V, Sadeghi N, et al. Early postmortem brain MRI findings in COVID-19 non-survivors. *Neurology* 2020; 95:e2016.
44. Laurendon T, Radulesco T, Mugnier J, et al. Bilateral transient olfactory bulb edema during COVID-19-related anosmia. *Neurology* 2020; 95:224.
45. Lin E, Lantos JE, Strauss SB, et al. Brain Imaging of Patients with COVID-19: Findings at an Academic Institution during the Height of the Outbreak in New York City. *AJNR Am J Neuroradiol* 2020; 41:2001.
46. Eliezer M, Hamel AL, Houdart E, et al. Loss of smell in patients with COVID-19: MRI data reveal a transient edema of the olfactory clefts. *Neurology* 2020; 95:e3145.
47. Meng X, Deng Y, Dai Z, Meng Z. COVID-19 and anosmia: A review based on up-to-date knowledge. *Am J Otolaryngol* 2020; 41:102581.
48. Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, De Siaty DR, et al. Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2020; 277:2251.

49. Paderno A, Mattavelli D, Rampinelli V, et al. Olfactory and Gustatory Outcomes in COVID-19: A Prospective Evaluation in Nonhospitalized Subjects. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2020; 163:1144.
50. Renaud M, Thibault C, Le Normand F, et al. Clinical Outcomes for Patients With Anosmia 1 Year After COVID-19 Diagnosis. *JAMA Netw Open* 2021; 4:e2115352.
51. Augustin M, Schommers P, Stecher M, et al. Post-COVID syndrome in non-hospitalised patients with COVID-19: a longitudinal prospective cohort study. *Lancet Reg Health Eur* 2021; 6:100122.
52. Maamar A, Liard C, Doucet W, et al. Acquired agitation in acute respiratory distress syndrome with COVID-19 compared to influenza patients: a propensity score matching observational study. *Virol J* 2022; 19:145.
53. Pun BT, Badenes R, Heras La Calle G, et al. Prevalence and risk factors for delirium in critically ill patients with COVID-19 (COVID-D): a multicentre cohort study. *Lancet Respir Med* 2021; 9:239.
54. Mao L, Jin H, Wang M, et al. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients with Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol* 2020; 77:683.
55. Helms J, Kremer S, Merdji H, et al. Neurologic Features in Severe SARS-CoV-2 Infection. *N Engl J Med* 2020; 382:2268.
56. Somani S, Pati S, Gaston T, et al. De Novo Status Epilepticus in patients with COVID-19. *Ann Clin Transl Neurol* 2020; 7:1240.
57. Lyons S, O'Kelly B, Woods S, et al. Seizure with CSF lymphocytosis as a presenting feature of COVID-19 in an otherwise healthy young man. *Seizure* 2020; 80:113.
58. Beach SR, Praschan NC, Hogan C, et al. Delirium in COVID-19: A case series and exploration of potential mechanisms for central nervous system involvement. *Gen Hosp Psychiatry* 2020; 65:47.
59. Alkeridy WA, Almaghlouth I, Alrashed R, et al. A Unique Presentation of Delirium in a Patient with Otherwise Asymptomatic COVID-19. *J Am Geriatr Soc* 2020; 68:1382.
60. Kennedy M, Helfand BKI, Gou RY, et al. Delirium in Older Patients With COVID-19 Presenting to the Emergency Department. *JAMA Netw Open* 2020; 3:e2029540.
61. Inouye SK. The Importance of Delirium and Delirium Prevention in Older Adults During Lockdowns. *JAMA* 2021; 325:1779.
62. Nishizawa T, Kawakami A, Taguchi T, Osugi Y. Transient global amnesia with bilateral hippocampal lesions during the COVID-19 global outbreak. *J Gen Fam Med* 2021; 22:154.
63. Hussein HM. Transient Global Amnesia as a Possible First Manifestation of COVID-19. *Neurohospitalist* 2021; 11:84.
64. Kremer S, Lersy F, de Sèze J, et al. Brain MRI Findings in Severe COVID-19: A Retrospective Observational Study. *Radiology* 2020; 297:E242.
65. Abdel-Mannan O, Eyre M, Löbel U, et al. Neurologic and Radiographic Findings Associated With COVID-19 Infection in Children. *JAMA Neurol* 2020; 77:1440.

66. Kremer S, Lersy F, Anheim M, et al. Neurologic and neuroimaging findings in patients with COVID-19: A retrospective multicenter study. *Neurology* 2020; 95:e1868.
67. Larvie M, Lev MH, Hess CP. More on Neurologic Features in Severe SARS-CoV-2 Infection. *N Engl J Med* 2020; 382:e110.
68. Ardellier FD, Baloglu S, Sokolska M, et al. Cerebral perfusion using ASL in patients with COVID-19 and neurological manifestations: A retrospective multicenter observational study. *J Neuroradiol* 2023; 50:470.
69. Klironomos S, Tzortzakakis A, Kits A, et al. Nervous System Involvement in Coronavirus Disease 2019: Results from a Retrospective Consecutive Neuroimaging Cohort. *Radiology* 2020; 297:E324.
70. Chougar L, Shor N, Weiss N, et al. Retrospective Observational Study of Brain MRI Findings in Patients with Acute SARS-CoV-2 Infection and Neurologic Manifestations. *Radiology* 2020; 297:E313.
71. Qureshi AI, Baskett WI, Huang W, et al. Acute Ischemic Stroke and COVID-19: An Analysis of 27 676 Patients. *Stroke* 2021; 52:905.
72. Yaghi S, Ishida K, Torres J, et al. SARS-CoV-2 and Stroke in a New York Healthcare System. *Stroke* 2020; 51:2002.
73. Merkler AE, Parikh NS, Mir S, et al. Risk of Ischemic Stroke in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) vs Patients With Influenza. *JAMA Neurol* 2020.
74. Rothstein A, Oldridge O, Schwennesen H, et al. Acute Cerebrovascular Events in Hospitalized COVID-19 Patients. *Stroke* 2020; 51:e219.
75. Requena M, Olivé-Gadea M, Muchada M, et al. COVID-19 and Stroke: Incidence and Etiological Description in a High-Volume Center. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2020; 29:105225.
76. Al-Mufti F, Amuluru K, Sahni R, et al. Cerebral Venous Thrombosis in COVID-19: A New York Metropolitan Cohort Study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2021; 42:1196.
77. Baldini T, Asioli GM, Romoli M, et al. Cerebral venous thrombosis and severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 infection: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Neurol* 2021; 28:3478.
78. Khatana SAM, Groeneveld PW. Health Disparities and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic in the USA. *J Gen Intern Med* 2020; 35:2431.
79. Katz JM, Libman RB, Wang JJ, et al. Cerebrovascular Complications of COVID-19. *Stroke* 2020; 51:e227.
80. Katsoularis I, Fonseca-Rodríguez O, Farrington P, et al. Risk of acute myocardial infarction and ischaemic stroke following COVID-19 in Sweden: a self-controlled case series and matched cohort study. *Lancet* 2021; 398:599.
81. Fridman S, Bres Bullrich M, Jimenez-Ruiz A, et al. Stroke risk, phenotypes, and death in COVID-19: Systematic review and newly reported cases. *Neurology* 2020; 95:e3373.
82. Srivastava PK, Zhang S, Xian Y, et al. Acute Ischemic Stroke in Patients With COVID-19: An Analysis From Get With The Guidelines-Stroke. *Stroke* 2021; 52:1826.

83. Xie Y, Xu E, Bowe B, Al-Aly Z. Long-term cardiovascular outcomes of COVID-19. *Nat Med* 2022; 28:583.
84. de Havenon A, Ney JP, Callaghan B, et al. Characteristics and Outcomes Among US Patients Hospitalized for Ischemic Stroke Before vs During the COVID-19 Pandemic. *JAMA Netw Open* 2021; 4:e2110314.
85. Beyrouti R, Adams ME, Benjamin L, et al. Characteristics of ischaemic stroke associated with COVID-19. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2020; 91:889.
86. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 2020; 395:1054.
87. Perry RJ, Smith CJ, Roffe C, et al. Characteristics and outcomes of COVID-19 associated stroke: a UK multicentre case-control study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2021; 92:242.
88. Esenwa C, Cheng NT, Luna J, et al. Biomarkers of Coagulation and Inflammation in COVID-19-Associated Ischemic Stroke. *Stroke* 2021; 52:e706.
89. Elkind MS. Why now? Moving from stroke risk factors to stroke triggers. *Curr Opin Neurol* 2007; 20:51.
90. Elkind MS, Carty CL, O'Meara ES, et al. Hospitalization for infection and risk of acute ischemic stroke: the Cardiovascular Health Study. *Stroke* 2011; 42:1851.
91. Cowan LT, Alonso A, Pankow JS, et al. Hospitalized Infection as a Trigger for Acute Ischemic Stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Stroke* 2016; 47:1612.
92. Merkler AE, Parikh NS, Mir S, et al. Risk of Ischemic Stroke in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) vs Patients With Influenza. *JAMA Neurol* 2020.
93. Dogra S, Jain R, Cao M, et al. Hemorrhagic stroke and anticoagulation in COVID-19. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2020; 29:104984.
94. Zahid MJ, Baig A, Galvez-Jimenez N, Martinez N. Hemorrhagic stroke in setting of severe COVID-19 infection requiring Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO). *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2020; 29:105016.
95. Extracorporeal Life Support Organization. ECMO in COVID-19. Available at: <https://www.else.org/Registry/FullCOVID19RegistryDashboard.aspx> (Accessed on October 12, 2023).
96. Usman AA, Han J, Acker A, et al. A Case Series of Devastating Intracranial Hemorrhage During Venovenous Extracorporeal Membrane Oxygenation for COVID-19. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2020; 34:3006.
97. Dafer RM, Osteras ND, Biller J. Acute Stroke Care in the Coronavirus Disease 2019 Pandemic. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2020; 29:104881.
98. Leira EC, Russman AN, Biller J, et al. Preserving stroke care during the COVID-19 pandemic: Potential issues and solutions. *Neurology* 2020; 95:124.

99. Wira CR, Goyal M, Southerland AM, et al. Pandemic Guidance for Stroke Centers Aiding COVID-19 Treatment Teams. *Stroke* 2020; 51:2587.
100. Marto JP, Strambo D, Ntaios G, et al. Safety and Outcome of Revascularization Treatment in Patients With Acute Ischemic Stroke and COVID-19: The Global COVID-19 Stroke Registry. *Neurology* 2023; 100:e739.
101. Toscano G, Palmerini F, Ravaglia S, et al. Guillain-Barré Syndrome Associated with SARS-CoV-2. *N Engl J Med* 2020; 382:2574.
102. Scheidl E, Canseco DD, Hadji-Naumov A, Bereznai B. Guillain-Barré syndrome during SARS-CoV-2 pandemic: A case report and review of recent literature. *J Peripher Nerv Syst* 2020; 25:204.
103. Virani A, Rabold E, Hanson T, et al. Guillain-Barré Syndrome associated with SARS-CoV-2 infection. *IDCases* 2020; 20:e00771.
104. Abu-Rumeileh S, Abdelhak A, Foschi M, et al. Guillain-Barré syndrome spectrum associated with COVID-19: an up-to-date systematic review of 73 cases. *J Neurol* 2021; 268:1133.
105. Fragiol M, Miró Ò, Llorens P, et al. Incidence, clinical, risk factors and outcomes of Guillain-Barré in Covid-19. *Ann Neurol* 2021; 89:598.
106. Luijten LWG, Leonhard SE, van der Eijk AA, et al. Guillain-Barré syndrome after SARS-CoV-2 infection in an international prospective cohort study. *Brain* 2021; 144:3392.
107. Li X, Raventós B, Roel E, et al. Association between covid-19 vaccination, SARS-CoV-2 infection, and risk of immune mediated neurological events: population based cohort and self-controlled case series analysis. *BMJ* 2022; 376:e068373.
108. Aladawi M, Elfil M, Abu-Esheh B, et al. Guillain Barre Syndrome as a Complication of COVID-19: A Systematic Review. *Can J Neurol Sci* 2022; 49:38.
109. Keddie S, Pakpoor J, Mousele C, et al. Epidemiological and cohort study finds no association between COVID-19 and Guillain-Barré syndrome. *Brain* 2021; 144:682.
110. Li X, Wang Y, Wang H, Wang Y. SARS-CoV-2-associated Guillain-Barré syndrome is a para-infectious disease. *QJM* 2021; 114:625.
111. Gutiérrez-Ortiz C, Méndez-Guerrero A, Rodrigo-Rey S, et al. Miller Fisher syndrome and polyneuritis cranialis in COVID-19. *Neurology* 2020; 95:e601.
112. Juliao Caamaño DS, Alonso Beato R. Facial diplegia, a possible atypical variant of Guillain-Barré Syndrome as a rare neurological complication of SARS-CoV-2. *J Clin Neurosci* 2020; 77:230.
113. Moriguchi T, Harii N, Goto J, et al. A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. *Int J Infect Dis* 2020; 94:55.
114. Huang YH, Jiang D, Huang JT. SARS-CoV-2 Detected in Cerebrospinal Fluid by PCR in a Case of COVID-19 Encephalitis. *Brain Behav Immun* 2020; 87:149.
115. Bernard-Valnet R, Pizzarotti B, Anichini A, et al. Two patients with acute meningoencephalitis concomitant with SARS-CoV-2 infection. *Eur J Neurol* 2020; 27:e43.

116. Pilotto A, Odolini S, Masciocchi S, et al. Steroid-Responsive Encephalitis in Coronavirus Disease 2019. *Ann Neurol* 2020; 88:423.
117. Panariello A, Bassetti R, Radice A, et al. Anti-NMDA receptor encephalitis in a psychiatric Covid-19 patient: A case report. *Brain Behav Immun* 2020; 87:179.
118. Fadakar N, Ghaemmaghami S, Masoompour SM, et al. A First Case of Acute Cerebellitis Associated with Coronavirus Disease (COVID-19): a Case Report and Literature Review. *Cerebellum* 2020; 19:911.
119. Povlow A, Auerbach AJ. Acute Cerebellar Ataxia in COVID-19 Infection: A Case Report. *J Emerg Med* 2021; 60:73.
120. Sharma S, Ruparelia J, Bhaskar S, et al. Acute Fulminant Cerebellitis in Children with COVID-19 Infection: A Rare But Treatable Complication. *Pediatr Neurol* 2021; 119:45.
121. Oosthuizen K, Steyn EC, Tucker L, et al. SARS-CoV-2 Encephalitis Presenting as a Clinical Cerebellar Syndrome: A Case Report. *Neurology* 2021; 97:27.
122. Sotgiu S, Uzzau S, Pippia A, et al. Expanding the Spectrum of Acute Cerebellitis due to SARS-Cov-2. *Pediatr Neurol* 2021; 121:1.
123. Samim MM, Dhar D, Goyal S, et al. AI-CoV Study: Autoimmune Encephalitis Associated With COVID-19 and Its Vaccines-A Systematic Review. *J Clin Neurol* 2022; 18:692.
124. Zanin L, Saraceno G, Panciani PP, et al. SARS-CoV-2 can induce brain and spine demyelinating lesions. *Acta Neurochir (Wien)* 2020; 162:1491.
125. Reichard RR, Kashani KB, Boire NA, et al. Neuropathology of COVID-19: a spectrum of vascular and acute disseminated encephalomyelitis (ADEM)-like pathology. *Acta Neuropathol* 2020; 140:1.
126. Delamarre L, Gollion C, Grouteau G, et al. COVID-19-associated acute necrotising encephalopathy successfully treated with steroids and polyvalent immunoglobulin with unusual IgG targeting the cerebral fibre network. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2020; 91:1004.
127. Krett JD, Jewett GAE, Elton-Lacasse C, et al. Hemorrhagic encephalopathy associated with COVID-19. *J Neuroimmunol* 2020; 346:577326.
128. Román GC, Gracia F, Torres A, et al. Acute Transverse Myelitis (ATM):Clinical Review of 43 Patients With COVID-19-Associated ATM and 3 Post-Vaccination ATM Serious Adverse Events With the ChAdOx1 nCoV-19 Vaccine (AZD1222). *Front Immunol* 2021; 12:653786.
129. Chow CCN, Magnussen J, Ip J, Su Y. Acute transverse myelitis in COVID-19 infection. *BMJ Case Rep* 2020; 13.
130. Ali L, Mohammed I, Zada Y, et al. COVID-19-Associated Acute Transverse Myelitis: A Case Series of a Rare Neurologic Condition. *Cureus* 2021; 13:e18551.
131. Rábano-Suárez P, Bermejo-Guerrero L, Méndez-Guerrero A, et al. Generalized myoclonus in COVID-19. *Neurology* 2020; 95:e767.

132. Franceschi AM, Ahmed O, Giliberto L, Castillo M. Hemorrhagic Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome as a Manifestation of COVID-19 Infection. *AJNR Am J Neuroradiol* 2020; 41:1173.
133. Kaya Y, Kara S, Akinci C, Kocaman AS. Transient cortical blindness in COVID-19 pneumonia; a PRES-like syndrome: Case report. *J Neurol Sci* 2020; 413:116858.
134. Kishfy L, Casasola M, Banankhah P, et al. Posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES) as a neurological association in severe Covid-19. *J Neurol Sci* 2020; 414:116943.
135. Princiotta Cariddi L, Tabae Damavandi P, Carimati F, et al. Reversible Encephalopathy Syndrome (PRES) in a COVID-19 patient. *J Neurol* 2020; 267:3157.
136. Parauda SC, Gao V, Gewirtz AN, et al. Posterior reversible encephalopathy syndrome in patients with COVID-19. *J Neurol Sci* 2020; 416:117019.
137. Sadeghizadeh A, Pourmoghaddas Z, Zandifar A, et al. Reversible Cerebral Vasoconstriction Syndrome and Multisystem Inflammatory Syndrome in Children With COVID-19. *Pediatr Neurol* 2022; 129:1.
138. Ray S, Kamath VV, Raju P A, et al. Fulminant Reversible Cerebral Vasoconstriction Syndrome in Breakthrough COVID 19 Infection. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2022; 31:106238.
139. Arandela K, Samudrala S, Abdalkader M, et al. Reversible Cerebral Vasoconstriction Syndrome in Patients with Coronavirus Disease: A Multicenter Case Series. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2021; 30:106118.
140. Danoun OA, Zillgitt A, Hill C, et al. Outcomes of seizures, status epilepticus, and EEG findings in critically ill patient with COVID-19. *Epilepsy Behav* 2021; 118:107923.
141. 141. Emami A, Fadakar N, Akbari A, et al. Seizure in patients with COVID-19. *Neurol Sci* 2020; 41:3057.
142. Asadi-Pooya AA, Kouhanjani MF, Nemati H, et al. A follow-up study of patients with COVID-19 presenting with seizures. *Epilepsy Behav* 2021; 122:108207.
143. Anand P, Al-Faraj A, Sader E, et al. Seizure as the presenting symptom of COVID-19: A retrospective case series. *Epilepsy Behav* 2020; 112:107335.
144. Dono F, Nucera B, Lanzone J, et al. Status epilepticus and COVID-19: A systematic review. *Epilepsy Behav* 2021; 118:107887.
145. Suwanwongse K, Shabarek N. Rhabdomyolysis as a Presentation of 2019 Novel Coronavirus Disease. *Cureus* 2020; 12:e7561.
146. Jin M, Tong Q. Rhabdomyolysis as Potential Late Complication Associated with COVID-19. *Emerg Infect Dis* 2020; 26:1618.
147. Manzano GS, Woods JK, Amato AA. Covid-19-Associated Myopathy Caused by Type I Interferonopathy. *N Engl J Med* 2020; 383:2389.

148. Dinkin M, Gao V, Kahan J, et al. COVID-19 presenting with ophthalmoparesis from cranial nerve palsy. *Neurology* 2020; 95:221.
149. Decavel P, Petit C, Tatu L. Tapia syndrome at the time of the COVID-19 pandemic: Lower cranial neuropathy following prolonged intubation. *Neurology* 2020; 95:312.
150. Todisco M, Alfonsi E, Arceri S, et al. Isolated bulbar palsy after SARS-CoV-2 infection. *Lancet Neurol* 2021; 20:169.
151. Cacciavillani M, Salvalaggio A, Briani C. Pure sensory neuralgic amyotrophy in COVID-19 infection. *Muscle Nerve* 2021; 63:E7.
152. Siepmann T, Kitzler HH, Lueck C, et al. Neuralgic amyotrophy following infection with SARS-CoV-2. *Muscle Nerve* 2020; 62:E68.
153. Milovanovic B, Djajic V, Bajic D, et al. Assessment of Autonomic Nervous System Dysfunction in the Early Phase of Infection With SARS-CoV-2 Virus. *Front Neurosci* 2021; 15:640835.
154. Scala I, Rizzo PA, Bellavia S, et al. Autonomic Dysfunction during Acute SARS-CoV-2 Infection: A Systematic Review. *J Clin Med* 2022; 11.
155. Guidon AC, Amato AA. COVID-19 and neuromuscular disorders. *Neurology* 2020; 94:959.
156. Frithiof R, Rostami E, Kumlien E, et al. Critical illness polyneuropathy, myopathy and neuronal biomarkers in COVID-19 patients: A prospective study. *Clin Neurophysiol* 2021; 132:1733.
157. Goërtz YMJ, Van Herck M, Delbressine JM, et al. Persistent symptoms 3 months after a SARS-CoV-2 infection: the post-COVID-19 syndrome? *ERJ Open Res* 2020; 6.
158. Ceban F, Ling S, Lui LMW, et al. Fatigue and cognitive impairment in Post-COVID-19 Syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav Immun* 2022; 101:93.
159. Graham EL, Clark JR, Orban ZS, et al. Persistent neurologic symptoms and cognitive dysfunction in non-hospitalized Covid-19 "long haulers". *Ann Clin Transl Neurol* 2021; 8:1073.
160. Kim Y, Bitna-Ha, Kim SW, et al. Post-acute COVID-19 syndrome in patients after 12 months from COVID-19 infection in Korea. *BMC Infect Dis* 2022; 22:93.
161. Ali ST, Kang AK, Patel TR, et al. Evolution of neurologic symptoms in non-hospitalized COVID-19 "long haulers". *Ann Clin Transl Neurol* 2022; 9:950.
162. National Institute of Nursing Research. NIH Announces Research Opportunities to Study Long COVID. <https://www.ninr.nih.gov/newsandinformation/newsandnotes/pasc-initiative> (Accessed on January 18, 2023).
163. Liu YH, Chen Y, Wang QH, et al. One-Year Trajectory of Cognitive Changes in Older Survivors of COVID-19 in Wuhan, China: A Longitudinal Cohort Study. *JAMA Neurol* 2022; 79:509.
164. Qureshi AI, Baskett WI, Huang W, et al. New-Onset Dementia Among Survivors of Pneumonia Associated With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. *Open Forum Infect Dis* 2022; 9:ofac115.

165. Axenus M, Schedin-Weiss S, Tjernberg L, et al. Changes in dementia diagnoses in Sweden during the COVID-19 pandemic. *BMC Geriatr* 2022; 22:365.
166. Hugon J, Msika EF, Queneau M, et al. Long COVID: cognitive complaints (brain fog) and dysfunction of the cingulate cortex. *J Neurol* 2022; 269:44.
167. Guedj E, Campion JY, Dudouet P, et al. 18F-FDG brain PET hypometabolism in patients with long COVID. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2021; 48:2823.
168. Sollini M, Morbelli S, Ciccarelli M, et al. Long COVID hallmarks on [18F]FDG-PET/CT: a case-control study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2021; 48:3187.
169. Kas A, Soret M, Pyatigorskaya N, et al. Correction to: The cerebral network of COVID-19-related encephalopathy: a longitudinal voxel-based 18F-FDG-PET study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2022; 49:3304.
170. Volkow, N.D. et al. (2021) The healthy brain and child development study-shedding light on opioid exposure, COVID-19, and health disparities. *JAMA Psychiatry* 78, 471–472.
171. Lins, B. (2021) Maternal immune activation as a risk factor for psychiatric illness in the context of the SARS-CoV-2 pandemic. *Brain Behav. Immun. Health* 16, 100297.
172. Lopez-Diaz, A. et al. (2021) COVID-19 infection during pregnancy and risk of neurodevelopmental disorders in offspring: time for collaborative research. *Biol. Psychiatry* 89, e29–e30.
173. Sakurada et al. (2020) Neurodevelopmental disorders induced by maternal immune activation: toward a prevention strategy in the era of the COVID-19 pandemic. *Psychiatry Int.* 1, 24–26.
174. Figueiredo, C.P. et al. (2021) SARS-CoV-2-associated cytokine storm during pregnancy as a possible risk factor for neuropsychiatric disorder development in post-pandemic infants. *Neuropharmacology* 201, 108841.
175. Okechukwu, C. (2021) 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.* 9, 58.
176. Centers for Disease Control and Prevention (2021) Data on COVID-19 During Pregnancy: Severity Of Maternal Illness, Centers for Disease Control and Prevention.
177. Sutton, D. et al. (2020) Universal screening for SARS-CoV-2 in women admitted for delivery. *N. Engl. J. Med.* 382, 2163–2164.
178. Shook, L. et al. (2021) Countering COVID-19 vaccine hesitancy in pregnancy: the “4 Cs”. *Am. J. Perinatol.* Published online October 19, 2021. <https://doi.org/10.1055/a-1673-5546>.
179. Shook, L. et al. (2021) COVID-19 vaccination in pregnancy and lactation: current research and gaps in understanding. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 899. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.735394>.
180. Edlow, A.G. et al. (2021) Neurodevelopmental outcomes at one year in offspring of mothers who test positive for SARSCoV-2 during pregnancy. *medRxiv* Published online December 16, 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.12.15.21267849>.

181. Racicot, K. and Mor, G. (2017) Risks associated with viral infections during pregnancy. *J. Clin. Invest.* 127, 1591–1599.
182. Silasi, M. et al. (2015) Viral infections during pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 73, 199–213.
183. Granja, M.G. et al. (2021) SARS-CoV-2 infection in pregnant women: neuroimmune-endocrine changes at the maternalfetal interface. *Neuroimmunomodulation* 28, 1–21.
184. Ray, S.T.J. et al. (2021) Neurological manifestations of SARSCoV-2 infection in hospitalised children and adolescents in the UK: a prospective national cohort study. *Lancet Child Adolesc. Health* 5, 631–641.
185. Huang, P. et al. (2021) Association between the COVID-19 pandemic and infant neurodevelopment: a comparison before and during COVID-19. *Front. Pediatr.* 9, 662165.
186. Deoni, S.C. et al. (2021) Impact of the COVID-19 pandemic on early child cognitive development: initial findings in a longitudinal observational study of child health. *medRxiv* Published online August 11, 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.08.10.21261846>.
187. Shuffrey, L.C. et al. (2022) 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.* Published online Jan 04, 2022. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2021.5563>.
188. Wang, Y. et al. (2020) Impact of Covid-19 in pregnancy on mother's psychological status and infant's neurobehavioral development: a longitudinal cohort study in China. *BMC Med.* 18, 347.
189. Ayed, M. et al. (2021) Neurodevelopmental outcomes of infants secondary to in utero exposure to maternal SARS-CoV-2 infection: a national prospective study in Kuwait. *medRxiv* Published online November 14, 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.11.12.21266291>.
190. Antoon JW, Hall M, Howard LM, et al. COVID-19 and Acute Neurologic Complications in Children. *Pediatrics* 2022; 150.
191. Fink EL, Robertson CL, Wainwright MS, et al. Prevalence and Risk Factors of Neurologic Manifestations in Hospitalized Children Diagnosed with Acute SARS-CoV-2 or MIS-C. *Pediatr Neurol* 2022; 128:33.
192. LaRovere KL, Riggs BJ, Poussaint TY, et al. Neurologic Involvement in Children and Adolescents Hospitalized in the United States for COVID-19 or Multisystem Inflammatory Syndrome. *JAMA Neurol* 2021; 78:536.
193. LaRovere KL, Poussaint TY, Young CC, et al. Changes in Distribution of Severe Neurologic Involvement in US Pediatric Inpatients With COVID-19 or Multisystem Inflammatory Syndrome in Children in 2021 vs 2020. *JAMA Neurol* 2023; 80:91.
194. Deb N, Roy P, Biswakarma A, et al. Neurological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 and Mpox in Pediatric Patients and Their Management: A State-of-the-Art Systematic Review. *Pediatr Neurol* 2023; 146:65.

195. Gandhi RT, Lynch JB, Del Rio C. Mild or Moderate Covid-19. *N Engl J Med* 2020; 383:1757.
196. Molteni E, Sudre CH, Canas LS, et al. Illness duration and symptom profile in symptomatic UK school-aged children tested for SARS-CoV-2. *Lancet Child Adolesc Health* 2021; 5:708.
197. American Academy of Pediatrics. Critical Updates on COVID-19. COVID-19 interim guidance. Post-COVID-19 conditions in children and adolescents. <https://services.aap.org/en/pages/2019-novel-coronavirus-covid-19-infections/clinical-guidance/post-covid-19-conditions-in-children-and-adolescents/> (acessado em 12/10/2023).
198. United States Centers for Disease Control and Prevention. COVID19. Post-COVID conditions: Information for healthcare providers. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-care/post-covid-index.html> (acessado em 12/10/2023).
199. World Health Organization. A clinical case definition of post COVID-19 condition in children and adolescents by expert consensus, 16 February 2023. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Post-COVID-19-condition-CA-Clinical-case-definition-2023-1> (acessado em 12/10/2023).
200. Rumack C, Wilson S, Charboneau W, editors. *Diagnostic Ultrasound*. 2nd ed. Ch. 53. Vol. 2. St. Louis, MO: Mosby; 1997. Neonatal and infant brain imaging; pp. 1443–502.
201. North K, Lowe L. Modern head ultrasound: Normal anatomy, variants, and pitfalls that may simulate disease. *Ultrasound Clin*. 2009;4:497–512.
202. Grant EG, Schellinger D, Richardson JD, Coffey ML, Smirniotopoulos JG. Echogenic periventricular halo: Normal sonographic finding or neonatal cerebral hemorrhage. *AJR Am J Roentgenol*. 1983;140:793–6.
203. Vergani P, Locatelli A, Doria V, Assi F, Paterlini G, Pezzullo JC, et al. Intraventricular hemorrhage and periventricular leucomalacia in preterm infants. *Obstet Gynecol*. 2004;104:225–31.
204. Burstein J, Papile LA, Burstein R. Intraventricular hemorrhage and hydrocephalus in premature newborns: A prospective study with CT. *AJR Am J Roentgenol*. 1979;132:631–5.
205. Allison JW, Faddis LA, Kinder DL, Roberson PK, Glasier CM, Seibert JJ. Intracranial resistive index (RI) values in normal term infant during the first day of life. *Pediatr Radiol*. 2000;30:618–620.
206. Bamber J, Cosgrove D, Dietrich CF, et al. EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of ultrasound elastography, part 1: basic principles and technology. *Ultraschall Med* 2013; 34:169–184.
207. Cosgrove D, Piscaglia F, Bamber J, et al. EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of ultrasound elastography, part 2: clinical applications. *Ultraschall Med* 2013; 34:238–253.
208. Xu ZS, Lee RJ, Chu SS, et al. Evidence of changes in brain tissue stiffness after ischemic stroke derived from ultrasound-based elastography. *J Ultrasound Med* 2013; 32:485–494.
209. Xu ZS, Yao A, Chu SS, et al. Detection of mild traumatic brain injury in rodent models using shear wave elastography: preliminary studies. *J Ultrasound Med* 2014; 33:1763–1771.

210. Chauvet D, Imbault M, Capelle L, et al. In vivo measurement of brain tumor elasticity using intraoperative shear wave elastography. *Ultraschall Med* 2016; 37:584–590.
211. Kim HG, Park MS, Lee JD, Park SY. Ultrasound elastography of the neonatal brain: preliminary study. *J Ultrasound Med* 2017; 36:1313–1319.
212. Sadigh G, Carlos RC, Neal CH, Wojcinski S, Dwamena BA. Impact of breast mass size on accuracy of ultrasound elastography vs. conventional B-mode ultrasound: a meta-analysis of individual participants. *Eur Radiol* 2013; 23:1006–1014.
213. Treece G, Lindop J, Chen L, Housden J, Prager R, Gee A. Realtime quasi-static ultrasound elastography. *Interface Focus* 2011; 1:540–552.
214. Montaldo G, Tanter M, Bercoff J, Benech N, Fink M. Coherent plane-wave compounding for very high frame rate ultrasonography and transient elastography. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 2009; 56:489–506.
215. Bhatia KS, Tong CS, Cho CC, Yuen EH, Lee YY, Ahuja AT. Shear wave elastography of thyroid nodules in routine clinical practice: preliminary observations and utility for detecting malignancy. *Eur Radiol* 2012; 22:2397–2406.
216. Cho SH, Lee JY, Han JK, Choi BI. Acoustic radiation force impulse elastography for the evaluation of focal solid hepatic lesions: preliminary findings. *Ultrasound Med Biol* 2010; 36:202–208.
217. Garra BS. Elastography: history, principles, and technique comparison. *Abdom Imaging* 2015; 40:680–697.
218. Sigrist RMS, Liao J, Kaffas AE, Chammas MC, Willmann JK. Ultrasound elastography: review of techniques and clinical applications. *Theranostics* 2017; 7:1303–1329.
219. Zeng B, Chen F, Qiu S, et al. Application of quasistatic ultrasound elastography for examination of scrotal lesions. *J Ultrasound Med* 2016; 35:253–261.
220. Hu Z, Li Y, Li C, et al. Using ultrasonic transient elastometry (FibroScan) to predict esophageal varices in patients with viral liver cirrhosis. *Ultrasound Med Biol* 2015; 41:1530–1537.
221. Nowicki A, Dobruch-Sobczak K. Introduction to ultrasound elastography. *J Ultrason* 2016; 16:113–124.
222. Franchi-Abella S, Elie C, Correas JM. Performances and limitations of several ultrasound-based elastography techniques: a phantom study. *Ultrasound Med Biol* 2017; 43:2402–2415.
223. Ozturk A, Grajo JR, Dhyan M, Anthony BW, Samir AE. Principles of ultrasound elastography. *Abdom Radiol (NY)* 2018; 43:773–785.
224. Bailey C, Huisman TAGM, de Jong RM, Hwang M. Contrast enhanced ultrasound and elastography imaging of the neonatal brain: a review. *J Neuroimaging* 2017; 27:437–441.
225. Macé E, Cohen I, Montaldo G, Miles R, Fink M, Tanter M. In vivo mapping of brain elasticity in small animals using shear wave imaging. *IEEE Trans Med Imaging* 2011; 30:550–558.

226. Su Y, Ma J, Du L, et al. Application of acoustic radiation force impulse imaging (ARFI) in quantitative evaluation of neonatal brain development. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2015; 42:797–800.
227. Albayrak E, Kasap T. Evaluation of neonatal brain parenchyma using 2-dimensional shear wave elastography. *J Ultrasound Med* 2018; 37:959–967.
228. Ertl M, Raasch N, Hammel G, Harter K, Lang C. Transtemporal investigation of brain parenchyma elasticity using 2-D shear wave elastography: definition of age-matched normal values. *Ultrasound Med Biol* 2018; 44:78–84
229. Distrito Federal–Secretaria de Saúde [Internet]. Disponível em <http://www.saude.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/03/Relatorio-natalidade-2018.pdf>, último acesso em 14/06/2023.
230. Yang, H., et al., Compression Elastography and Shear Wave Ultrasound Elastography for Measurement of Brain Elasticity in Full-Term and Premature Neonates: A Prospective Study. *J Ultrasound Med*, 2023. 42(1): p. 221-231.
231. deCampo, D. and M. Hwang, Characterizing the Neonatal Brain with Ultrasound Elastography. *Pediatr Neurol*, 2018. 86: p. 19-26.
232. Ciapponi, A., et al., COVID-19 and pregnancy: An umbrella review of clinical presentation, vertical transmission, and maternal and perinatal outcomes. *PLoS One*, 2021. 16(6): p. e0253974.
233. Granja, M.G., et al., SARS-CoV-2 Infection in Pregnant Women: Neuroimmune-Endocrine Changes at the Maternal-Fetal Interface. *Neuroimmunomodulation*, 2021. 28(1): p.1-21.
234. Manti, S., et al., Effects of Vertical Transmission of Respiratory Viruses to the Offspring. *Front Immunol*, 2022. 13: p. 853009.
235. Overton, E.E., D. Goffman, and A.M. Friedman, The Epidemiology of COVID-19 in Pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*, 2022. 65(1): p. 110-122.
236. Bastos, S., et al., Clinical and Obstetric Aspects of Pregnant Women with COVID-19: A Systematic Review. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 2021. 43(12): p. 949-960.
237. Valderas, C., et al., COVID-19 and neurologic manifestations: a synthesis from the child neurologist's corner. *World J Pediatr*, 2022. 18(6): p. 373-382.
238. Casabianca, M., et al., Neurological consequences of SARS-CoV-2 infections in the pediatric population. *Front Pediatr*, 2023. 11: p. 1123348.
239. Govil-Dalela, T. and L. Sivaswamy, Neurological Effects of COVID-19 in Children. *Pediatr Clin North Am*, 2021. 68(5): p. 1081-1091.
240. Stafstrom, C.E. and L.L. Jantzie, COVID-19: Neurological Considerations in Neonates and Children. *Children (Basel)*, 2020. 7(9).
241. Perlman, J.M. and C. Salvatore, Coronavirus Disease 2019 Infection in Newborns. *Clin Perinatol*, 2022. 49(1): p. 73-92.
242. Allotey, J., et al., SARS-CoV-2 positivity in offspring and timing of mother-to-child transmission: living systematic review and meta-analysis. *Bmj*, 2022. 376: p. e067696.

243. Singer, T.G., et al., Coronavirus Infections in the Nervous System of Children: A Scoping Review Making the Case for Long-Term Neurodevelopmental Surveillance. *Pediatr Neurol*, 2021. 117: p. 47-63.
244. Jha, N.K., et al., Evidence of Coronavirus (CoV) Pathogenesis and Emerging Pathogen SARS-CoV-2 in the Nervous System: A Review on Neurological Impairments and Manifestations. *J Mol Neurosci*, 2021. 71(11): p. 2192-2209.
245. da Silva Chagas, L., et al., Neuroinflammation and Brain Development: Possible Risk Factors in COVID-19-Infected Children. *Neuroimmunomodulation*, 2021. 28(1): p. 22-28.
246. Siracusa, L., et al., Neurological complications in pediatric patients with SARS-CoV-2 infection: a systematic review of the literature. *Ital J Pediatr*, 2021. 47(1): p. 123.
247. de Moraes, F.M., et al., SARS-CoV-2 Infection and Possible Neonatal Neurological Outcomes: A Literature Review. *Viruses*, 2022. 14(5).
248. Zimmer, A., et al., Prenatal exposure to viral infection and neuropsychiatric disorders in offspring: A review of the literature and recommendations for the COVID-19 pandemic. *Brain Behav Immun*, 2021. 91: p. 756-770.
249. Figueiredo, C.P., 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. 201: p. 108841.
250. Briana, D., G. Syridou, and V. Papaevangelou, Perinatal COVID-19. *Pediatr Infect Dis J*, 2021. 40(12): p. e504-e506.
251. Shook, L.L., L.T. Fourman, and A.G. Edlow, Immune Responses to SARS-CoV-2 in Pregnancy: Implications for the Health of the Next Generation. *J Immunol*, 2022. 209(8): p. 1465-1473.
252. Garces Inigo, E., et al., Quantitative Evaluation of Neonatal Brain Elasticity Using Shear Wave Elastography. *J Ultrasound Med*, 2021. 40(4): p. 795-804.
253. Wang, J., et al., Real-time shear wave elastography evaluation of the correlation between brain tissue stiffness and body mass index in premature neonates. *Transl Pediatr*, 2021. 10(12): p. 3230-3236.
254. Liao, J., et al., Progress in the Application of Ultrasound Elastography for Brain Diseases. *J Ultrasound Med*, 2020. 39(11): p. 2093-2104.
255. Liu, L., et al., The combined use of DTI and MR elastography for monitoring microstructural changes in the developing brain of a neurodevelopmental disorder model: Poly (I:C)-induced maternal immune-activated rats. *PLoS One*, 2023. 18(1): p. e0280498.
256. Germano, C., et al., Fetal Brain Damage during Maternal COVID-19: Emerging Hypothesis, Mechanism, and Possible Mitigation through Maternal-Targeted Nutritional Supplementation. *Nutrients*, 2022. 14(16).
257. Karnik, M., et al., A Review on SARS-CoV-2-Induced Neuroinflammation, Neurodevelopmental Complications, and Recent Updates on the Vaccine Development. *Mol Neurobiol*, 2021. 58(9): p. 4535-4563.

258. Jeličić, L., et al., Maternal Distress during Pregnancy and the Postpartum Period: Underlying Mechanisms and Child's Developmental Outcomes-A Narrative Review. *Int J Mol Sci*, 2022. 23(22).
259. Pereira A, Cruz-Sánchez FF, Adel Fahmideh M, et al. Association of maternal SARS-CoV-2 infection during pregnancy with human fetal brain development and neonatal behavior. *JAMA Netw Open*. 2021 Oct 1;4(10):e2127252. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.27252. PMID: 34648438.
260. Van Calsteren K, Donders F, Wynants L, et al. Obstetric and neonatal outcome in SARS-CoV-2 infection during pregnancy: A prospective cohort study. *JAMA Pediatr*. 2022 Jan 1;176(1):1-9. doi: 10.1001/jamapediatrics.2021.3396. PMID: 34687213.
261. Bwire GM, Majigo MV, Njiro BJ, et al. Neurodevelopmental outcomes among infants born to mothers with COVID-19 during pregnancy: a prospective cohort study. *JAMA Pediatr*. 2021 Aug 1;175(8):843-853. doi: 10.1001/jamapediatrics.2021.1402. PMID: 34021449.

APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL COM DADOS DE NEUROIMAGEM

Qualis Capes A1



OPEN ACCESS

EDITED BY

Balaji Govindaswami,
Valley Medical Center Foundation, United States

REVIEWED BY

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

*CORRESPONDENCE

David Alves de Araujo Junior
✉ david.junior@ebserh.gov.br

[†]These authors have contributed equally to this work and share first authorship

[‡]These authors share senior authorship

RECEIVED 26 March 2023

ACCEPTED 26 April 2023

PUBLISHED 24 May 2023

CITATION

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

COPYRIGHT

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

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

David Alves de Araujo Junior^{1,2,3,4*}, Felipe Motta^{1,2,3†}, Geraldo Magela Fernandes^{1,2,3}, Maria Eduarda Canellas De Castro^{1,2,3}, Lizandra Moura Paravidine Sasaki^{1,2,3}, Licia Pacheco Luna⁵, Thalys Sampaio Rodrigues⁴, Patricia Shu Kurizky^{1,2,3}, Alexandre Anderson De Sousa Munhoz Soares⁵, Otavio de Toledo Nobrega⁵, Laila Salmen Espindola⁵, Alberto Moreno Zaconeta⁵, Ciro Martins Gomes^{1,2,3}, Olindo Assis Martins-Filho⁶, Cleandro Pires de Albuquerque^{1,2,3†} and Licia Maria Henrique da Mota^{1,2,3†}

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

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

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

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

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

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

KEYWORDS

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

1. Introduction

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

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

2. Methods

2.1. Study design and population

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

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

The case group included exposed newborns born to mothers infected by SARS-CoV-2 during pregnancy (RT-PCR or positive IgM). The control group included unexposed neonates with no maternal infection with the SARS-CoV-2 virus during pregnancy, no symptoms, and negative IgG and IgM serology at the end of pregnancy. Unexposed control subjects had negative IgG serology at 6 months of adjusted chronological age. Exclusion criteria for the study sample were evidence or confirmation of genetic syndromes; suspected or confirmed other congenital infections, such as toxoplasmosis, syphilis, rubella, herpes, Chagas, and Zika; discontinuation of clinical follow-up before the age of 2 years.

2.2. Neuroimaging data

The study groups were evaluated for morphometric, hemodynamic, and cerebral tissue elasticity parameters using high-frequency ultrasonography. A cranial ultrasound scan (CUS) was performed through the anterior fontanelle at 6 months of adjusted chronological age and repeated 4 weeks later at a follow-up exam in case of abnormal findings at the first CUS. Further examinations were planned thereafter, if indicated, according to an individualized schedule based on the persistence of abnormal findings and their clinical correlation. Only data from the first ultrasound scan of each infant were considered for the purpose of statistical analysis. All CUS were performed or supervised by the same operator (DA). A Philips Affiniti 70 ultrasound system, equipped with a 5–7.5 MHz convex probe

and a 5–18.0 MHz linear probe, was used for CUS studies, divided into the following modalities:

- Cranial ultrasound scan and Doppler of the intracranial arteries —pericallosal artery, middle cerebral artery, and basilar artery; Doppler velocimetry data were analyzed for each individual artery. Absolute values of resistance (RI) and pulsatility index (PI) for blood flow were compared in both groups (exposed vs. control). Images were obtained at the same standard windows over the anterior fontanelle, temporal bone, and suboccipital zone.
- Elastography of the brain parenchyma: scans were performed using ARFI (Acoustic Radiation Force Impulse) and SWE (Shear-wave Elastography) software, which is directly integrated into the ultrasound system where the shear wave is located, allowing the operator to select the region of interest (ROI) for measurement in B-mode and in real-time. The ROIs were divided as follows: deep white matter (DWM), superficial white matter (SWM), basal ganglia (BG), represented by caudate nuclei and thalamus, corpus callosum (CC), and cortical gray matter (CGM) in the frontal lobe. All measurements were repeated at three different locations in the same type of zone and the same slice of view. The archived data represent the mean value of the measurements.

Tissue elasticity was estimated, and the velocity of the shear wave in the brain parenchyma was calculated from the displacement of transverse waves, where the velocity of the shear wave is directly proportional to the local tissue stiffness. The results were expressed in meters per second (m/s) and automatically converted to kilopascals (KpA), with the shear wave propagation velocity being proportional to the square root of the tissue elasticity [$E = 3\rho c^2$].

2.3. Data storage

Study records were stored using alphanumeric codes in the REDCap (Research Electronic Data Capture) platform, with access restricted to approved research personnel.

2.4. Statistical analysis

Continuous variables were described as mean and standard deviation or median and interquartile range (IQR), as appropriate. Categorical variables were expressed as frequencies and percentages. The prevalence of total abnormalities was evaluated for each category and compared with its prevalence in the control and SARS-CoV-2-exposed groups. A Mann-Whitney *t*-test or ANOVA were used to compare the mean values of imaging parameters.

The neuroimaging parameter means were compared between groups (SARS-CoV-2 exposed vs. controls) using an analysis of covariance (ANCOVA) model. In the ANCOVA model, the neuroimaging parameter measures (RI and PI for Doppler; “E” coefficient/Young’s modulus for elastography ROIs) were

considered dependent variables, the group (SARS-CoV-2 exposed vs. unexposed) was considered the independent variable, and the measures of GA (gestational age) and BW (birth weight) were considered covariates. A significance level of $p < 0.05$ was considered. Study participants were also grouped into two different categories based on their GA (pre-term and term, considering the cut-off at 37 weeks) and BW (low birth weight and adequate birth weight, considering the cut-off at 2,500 g).

A Cochran-Armitage trend test and Pearson correlation were used to evaluate trends or associations of results between Doppler and cranial ultrasound scans. p -value < 0.05 was considered significant. Analyses were performed using SAS v. 9.4 (SAS Institute, Inc., 2016).

2.5. Ethical approval and informed consent

The study was approved by the Research Ethics Committee of the School of Medicine of the University of Brasilia (Certificate Number C.A.A.E 32359620.0.0000.5558). The protocol was also registered in the Brazilian Registry of Clinical Trials. All pregnant women participating in the study gave informed consent. Likewise, the participation of the children in the pediatric arm required the signed, informed consent of their mothers. The 6-month reports on the status of the study and its partial results are available to the Institutional Research Ethics Committee and can be consulted upon request.

3. Results

3.1. Overview of enrolled subjects

The initial screening included 295 volunteers, sorted by hospital unit, gender, age, and trimester of maternal infection. Two subjects withdrew from the study after the initial phase. Of the 293 subjects evaluated, 74 were excluded due to: (a) loss of follow-up ($n = 72$) and (b) diagnosis of congenital infection ($n = 2$). After exclusions, the total sample included 219 participants, consisting of 201 subjects with documented maternal SARS-CoV-2 infection [exposed group; birth age = 39 ± 2.9 weeks (mean \pm SD); 56.6% female] and 18 subjects not exposed to SARS-CoV-2 infection [control group; birth age = 39 ± 2.8 weeks (mean \pm SD); 53.0% female]. Gestational age at birth ranged from 33 to 42 weeks (mean 38.1 ± 1.8 weeks), and birth weight ranged from 1,525 to 4,418 g (mean $3,127 \pm 535$ g).

Concerning maternal diseases prior to pregnancy being affected by COVID-19, 16 patients (7%) had a previous history of systemic arterial hypertension, 3 (1.3%) reported pre-eclampsia, and 15 (6.8%) were affected by pregestational diabetes. A total of 15 patients had a history of pulmonary disease (6.8%), including asthma, and six had heart disease (2.7%).

Considering the clinical characteristics of the control group, the mean age at birth is 38.8 weeks of gestation, with a standard error of ± 0.41 w; mean birth weight for controls is 3,277 g, with a standard error of ± 107 g; mean head circumference is 35 ± 0.1 cm. The median and interquartile range (IQR) values for the

first- and fifth-minute APGAR scores in the control group are 8 (IQR: 7–8) and 9 (IQR: 9–9), respectively. With our cut-offs of 37 weeks for prematurity and 2,500 g for low birth weight, we have 16.6% (3) pre-term and 11.1% (2) low-birth weight individuals in the control group; the case group has similar frequencies with 14.8% (26) pre-term and 16.5% (29) low-birth weight individuals. Among the comorbidities found within the groups, the most frequent were anemia, bronchospasm, malnutrition, obesity, rhinitis, dermatitis, cow's milk protein allergy (CMPA), and gastroesophageal reflux disease (GERD). A supplemental table in **Appendix C** is provided for reference, demonstrating that groups display a similar profile of comorbidities.

3.2. Findings by imaging modality

3.2.1. Grayscale ultrasonography (structural US)

An association was found between maternal SARS-CoV-2 infection and white matter involvement in their children, with increased echogenicity in grayscale studies. Among the 201 examinations performed in the case group, 18 examinations showed abnormalities in B-mode analysis (8.9%), with deep white matter disease in the totality of these 18 abnormal cases (100%). To a lesser extent, we also saw mild alterations in the basal ganglia (caudate nuclei and thalamus), with abnormal caudothalamic echogenicity in 2 (11.1%) of 18 abnormal B-mode cases, concurrent with the deep white matter findings.

Supplementary Figure A1 summarizes the three main planes for cranial image acquisition and ultrasonographic analysis of deep white matter changes. It also shows CUS B-mode and Doppler velocimetry studies, analyzing three major intracranial arteries (the middle cerebral, pericallosal, and basilar arteries).

An equally significant finding of the morphometric US studies was the persistence of increased echogenicity in the affected areas at the routine second-look ultrasound study, performed 4 weeks after the initial study, in all the abnormal cases. On re-evaluation, it was possible to characterize the clear extension of the affected areas, with additional abnormalities in the basal ganglia—in total, the caudate nuclei and thalami. It is also noteworthy that there were no individuals in the control group (18 out of 219) with grayscale ultrasound alterations.

3.2.2. Hemodynamic abnormalities (Doppler velocimetry)

In the exposed group, 21 out of 201 (10.4%) subjects presented with abnormal hemodynamic patterns, showing a reduction in the resistance (RI) and pulsatility (PI) indices in the blood flow of the major intracranial arteries. We conducted separate analyses of three main intracranial arteries: the middle cerebral artery, the pericallosal artery, and the basilar artery, the former two representing hemodynamic parameters for the anterior intracranial circulation, and the basilar artery velocimetry as an estimate of posterior circulation flow data.

Supplementary Figures A2–A4 demonstrate the Doppler velocimetric scan with spectral curves for the analysis of the flow of three major intracranial arteries (middle cerebral, pericallosal, and basilar arteries).

A significant trend of reduction in both resistance and pulsatility indices of arterial intracranial flow in SARS-CoV-2-exposed children were observed for both anterior and posterior circulation arteries, which was positively correlated with the severity of maternal infection. Significant decreases in RI and PI were found in cases of critical SARS-CoV-2 gestational infection, with mean PI values of 1.09 for the MCA (middle cerebral artery), 0.98 for the PA (pericallosal artery), and 1.04 for the BA (basilar artery).

Table 1 shows the neuroimaging parameters according to the severity of maternal infection (COVID-19 categories according to WHO classification).

When both analyses, mode-B ultrasound, and Doppler scan findings, were integrated and cross-matched with the categories of maternal infection severity, a positive correlation of abnormal neuroimaging results that increased proportionally with the severity of maternal infection, and a peak of abnormal neuroimaging results in children whose mothers had critical SARS-CoV-2 infection during pregnancy could be identified. These data are summarized in **Table 2**.

A second trend in the hemodynamic data was identified in this analysis, related to the duration of SARS-CoV-2 infection during pregnancy. A significant reduction in both the resistance and pulsatility indices of intracranial arterial flow positively correlated with the last trimester of maternal SARS-CoV-2 infection, as shown in **Table 3**.

TABLE 1 Imaging parameters distributed according to the severity of maternal infection (COVID-19 categories according to WHO classification).

Variable ^a	COVID-19 severity scale—WHO			ANOVA p-value	Multiple comparisons p-value ^b		
	Mild (n = 165)	Severe (n = 23)	Critical (n = 8)		Mild to severe	Mild to critical	Severe to critical
MCA RI	0.77 ± 0.09	0.75 ± 0.10	0.64 ± 0.14	0.0011	0.8394	0.0010	0.0260
MCA PI	1.64 ± 0.50	1.47 ± 0.38	1.09 ± 0.45	0.0059	0.3789	0.0064	0.1713
Pericallosal RI	0.70 ± 0.08	0.68 ± 0.10	0.61 ± 0.09	0.0062	0.7004	0.0070	0.1185
Pericallosal PI	1.29 ± 0.31	1.19 ± 0.25	0.98 ± 0.24	0.0113	0.4744	0.0181	0.2833
Basilar RI	0.72 ± 0.07	0.69 ± 0.09	0.64 ± 0.09	0.0052	0.1692	0.0093	0.3330
Basilar PI	1.34 ± 0.29	1.24 ± 0.28	1.04 ± 0.28	0.0121	0.4389	0.0208	0.3229

MCA, middle cerebral artery; RI, resistance index; PI, pulsatility index.

^aValues expressed as mean ± standard error.

^bp-values for multiple comparisons adjusted with Bonferroni correction.

TABLE 2 Neuroimaging parameters are distributed according to the COVID-19 severity scale—WHO classification.

Variable ^a	COVID-19 severity scale—WHO ^a			Pearson correlation (CI 95%)	p-value ^a
	Mild (n = 166)	Severe (n = 23)	Critical (n = 8)		
Intracranial Doppler				0.23 (0.06; 0.40)	<0.001
Abnormal	11 (6.63)	5 (21.74)	5 (62.50)		
Normal	155 (93.37)	18 (78.26)	3 (37.50)		
Ultrasonography				0.24 (0.06; 0.42)	<0.001
Abnormal	9 (5.42)	5 (21.74)	4 (50.00)		
Normal	157 (94.58)	18 (78.26)	4 (50.00)		

^aValues expressed in frequency (%).^ap-value calculated with the Cochran-Armitage trend test.

TABLE 3 Neuroimaging parameters (ultrasound B-mode and Doppler analysis) distributed according to the trimester of SARS-CoV-2 infection during pregnancy.

Variable ^a	Gestational trimester of SARS-CoV-2 infection ^a				Pearson Correlation (CI 95%)	p-value ^a
	1st (n = 27)	2nd (n = 58)	3rd (n = 95)	Peripartum (n = 21)		
Intracranial arteries Doppler					0.43 (0.32; 0.54)	<0.001
Abnormal	0 (0.00)	1 (1.72)	6 (6.32)	14 (66.67)		
Normal	27 (100.00)	57 (98.28)	89 (93.68)	7 (33.33)		
Ultrasound B-mode					0.41 (0.30; 0.53)	<0.001
Abnormal	0 (0.00)	1 (1.72)	4 (4.21)	13 (61.90)		
Normal	27 (100.00)	57 (98.28)	91 (95.79)	8 (38.10)		

^aValues expressed in frequency (%).^ap-value calculated with the Cochran-Armitage trend test.

The hemodynamic evaluation data show a significant correlation between the resistance/pulsatility indices in the main intracranial arteries and the trimester of maternal infection, with the highest proportional frequency of abnormal results observed in cases of peripartum infection (defined as a period equal to or less than 14 days between infection with SARS-CoV-2 and the date of delivery). Among the pregnant women infected during this period, 66% had abnormal Doppler velocimetry, and nearly 62% had abnormal cranial ultrasound in grayscale.

3.2.3. Elastography abnormalities (shear-wave ultrasound-based)

The functional studies based on shear-wave elastography were performed in five regions of interest (ROIs) and “E” cut-off references were adopted according to previous recent literature (6–8), as there is no definitive normality parameter for elastography studies in the pediatric brain.

A significant relationship was found between maternal exposure to SARS-CoV-2 and elastography changes, mainly in the cerebral deep white matter and basal ganglia, in terms of stiffness alterations, with a decrease of the elastic modulus (*E*) in the SARS-CoV-2-exposed group when compared to controls. Table 4 shows these findings categorized by ROIs.

The SARS-CoV-2 group had significantly lower “E” coefficients in specific brain areas, including the deep/periventricular white matter and the splenium of the corpus callosum. The basal ganglia (caudate nuclei and thalamus), superficial white matter, and cortical gray matter also showed stiffness variations associated with SARS-CoV-2 exposure, although to a lesser extent.

TABLE 4 Neuroimaging parameters of children distributed between the group exposed to SARS-CoV-2 infection during gestation (cases) and the non-exposed (control) group, according to the specific regions of interest (ROIs) for elastography analysis: deep white matter, frontal white matter, caudate/thalamus, corpus callosum, and frontal cortex.

Variable ^a	Groups		p-value ^a
	Cases (n = 201)	Control (n = 18)	
Elastography—DWM	3.98 ± 0.62	7.76 ± 0.77	<0.001
Elastography—FWM	3.31 ± 0.59	4.69 ± 0.85	<0.001
Elastography—caudate/thalamus	5.45 ± 0.64	6.46 ± 0.96	<0.001
Elastography—corpus callosum	4.53 ± 0.39	7.93 ± 0.88	<0.001
Elastography—frontal cortex	5.62 ± 0.57	6.59 ± 0.66	<0.001

DWM, deep white matter; FWM, frontal white matter.

^aValues expressed in kilopascal, as mean ± standard error.^ap-value calculated by Mann-Whitney test.

A significant dose-response relationship was found between exposure to SARS-CoV-2 during pregnancy and the presence of neuroimaging abnormalities, including grayscale, Doppler, and elastography modalities.

The neuroimaging parameter means were also compared between groups (SARS-CoV-2 exposure vs. non-exposure) using an analysis of covariance (ANCOVA) model. In this ANCOVA model, the neuroimaging parameter measures (hemodynamic indices and elastic modulus) were considered dependent variables, the group (SARS-CoV-2 exposure vs. non-exposure) was considered the independent variable, and the measures of GA (gestational age) and BW (birth weight) were considered covariates.

TABLE 5 Neuroimaging parameters of infants distributed between the group exposed to SARS-CoV-2 infection during gestation (cases) and the unexposed group (control), controlled by GA (gestational age) and BW (birth weight), according to the specific regions of interest (ROIs) for elastography analysis: deep white matter, frontal white matter, caudate/thalamus, corpus callosum, and frontal cortex; *p*-value calculated by ANCOVA model.

Variable	Groups—mean value ^a ± standard error		Comparison between groups	
	Cases (<i>n</i> = 201)	Control (<i>n</i> = 18)	Difference [CI 95%]	<i>p</i> -value ^b
MCA—RI	0.76 ± 0.01	0.79 ± 0.01	-0.03 [-0.07; -0.00]	0.0451
MCA—PI	1.59 ± 0.03	1.65 ± 0.08	-0.04 [-0.08; -0.00]	0.0434
Pericallosal artery—RI	0.70 ± 0.00	0.73 ± 0.01	-0.03 [-0.06; -0.00]	0.0277
Pericallosal artery—PI	1.26 ± 0.02	1.40 ± 0.05	-0.14 [-0.25; -0.03]	0.0123
Basilar artery—RI	0.71 ± 0.00	0.73 ± 0.02	-0.02 [-0.04; 0.01]	0.2324
Basilar artery—PI	1.31 ± 0.02	1.32 ± 0.07	-0.01 [-0.14; 0.14]	0.9585
Elastography—DWM	3.98 ± 0.04	7.77 ± 0.11	-3.80 [-4.03; -3.57]	<0.001
Elastography—FWM	3.31 ± 0.04	4.69 ± 0.11	-1.37 [-1.60; -1.14]	<0.001
Elastography—caudate nucleus/thalamus	5.46 ± 0.05	6.45 ± 0.12	-0.99 [-1.24; -0.74]	<0.001
Elastography—corpus callosum	4.56 ± 0.03	7.92 ± 0.08	-3.38 [-3.56; -3.20]	<0.001
Elastography—frontal cortex	5.61 ± 0.04	6.60 ± 0.10	-0.99 [-1.20; -0.78]	<0.001

Mean values adjusted by ANCOVA model. MCA, middle cerebral artery; RI, resistance index; PI, pulsatility index; DWM, deep white matter; FWM, frontal white matter.

^aResults are expressed in kilopascals, as mean ± standard error.

^b*p*-values for comparison between groups were calculated using ANCOVA model, with GA and BW as covariates.

As shown in Table 5, the neuroimaging parameters of the patients present significant differences between the two groups, even after controlling for GA and BW. According to the data, the mean value of deep white matter elasticity in the group exposed to SARS-CoV-2 is 3.98 ± 0.04 , while in the group without SARS-CoV-2 it is 7.77 ± 0.11 . The difference between the two groups is -3.80 with a 95% confidence interval of $[-4.03, -3.57]$ and a *p*-value of less than 0.001. This means that there is a statistically significant difference between the two groups for this parameter, indicating that patients exposed to SARS-CoV-2 during pregnancy have lower values for deep white matter elasticity compared to those not exposed to SARS-CoV-2. In contrast, the parameters for a single vessel (basilar artery) interestingly did not show a significant difference between the two groups, when adjusted for GA and BW. Considering the basilar artery RI, the difference between the two groups is -0.02 with a 95% confidence interval of $[-0.04, 0.01]$ and a *p*-value of 0.2324.

4. Discussion

4.1. General evidence

A systemic inflammatory response to the SARS-CoV-2 virus and consequent endothelial damage has been implicated in COVID-19 pathogenesis, with replicated evidence in many studies in both biochemical and clinical settings (9–11). Although there is extensive epidemiologic evidence of systemic COVID-19 effects (12, 13), the neurologic consequences of SARS-CoV-2 exposure in the pediatric group are still uncertain, and current evidence is mostly based on case reports (14, 15). It is not clear whether and to what extent the blood-brain barrier functions as a protective factor in blocking inflammatory cytokines (16–19).

Our study provides evidence that SARS-CoV-2 infection during pregnancy may be associated with both structural and functional brain damage in infants. The most recurrent findings were characterized in the cerebral deep white matter, although all other ROIs demonstrated some degree of change. These changes were manifested by increased regional echogenicity on B-mode studies, a reduction in the corresponding resistance/pulsatility of intracranial arterial flow, and a decrease in the cerebral elastic modulus. The reduced stiffness in the cerebral tissue, especially in the deep white matter, may represent a decreased amount of tissuer myelin in the central nervous system, a crucial element for adequate neurodevelopment in children. Few neuroimaging studies have been conducted in this area with pediatric subjects, so our results provide unprecedented evidence based on structural and functional abnormalities.

4.2. Ultrasonographic findings (gray scale)

Structural neuroimaging scans in our study have repeatedly demonstrated white matter involvement in abnormal cases in SARS-CoV-2-exposed subjects. To date, there are published case series (20, 21) reporting a similar pattern of involvement in COVID-19, but no longitudinally designed studies with SARS-CoV-2-exposed and unexposed control groups correlating neuroimaging findings and clinical follow-up.

Because there is exceptional collateral circulation in the brain vasculature in the neonatal period and early childhood, the pattern of parenchymal involvement in these subjects tends to be less severe in the cortical gray matter (unlike in adults). In response to vascular and/or hypoxic encephalic injury, the deep white matter is one of the first areas of the brain affected during this early period of life (22–24).

This evidence was replicated in our results, as both deep white matter and basal ganglia areas presented as regions of higher echogenicity in abnormal B-mode scans when compared to

controls (the unexposed group). In our sample, 18 individuals whose mothers were infected by SARS-CoV-2 during pregnancy manifested some degree of white matter disease, of which 16 (88.8%) had exclusive white matter involvement and two (11.2%) subjects had concomitant involvement of deep white matter and cerebral basal ganglia (thalami and caudate nuclei). Another significant finding of the morphometric US studies was the persistence of increased echogenicity in the affected areas at the routine follow-up ultrasound study, performed 4 weeks after the initial scan, in all the abnormal cases. At re-evaluation, it was possible to characterize an increase in the extent of the affected areas in three individuals (16.6%) who evolved from initial exclusive deep white matter lesions to additional abnormalities in the basal ganglia, in total, the caudate nuclei and thalami.

Although the correlation of basal ganglia changes with the clinical COVID-19 syndrome is still unclear, it is thought to play a role in the long-lasting damage that some infants have shown, manifesting as late-onset post-COVID-19 symptoms, with delayed neurological development and failure to achieve neuropsychomotor milestones at specific ages (25, 26).

4.3. Hemodynamics findings (Doppler evaluation)

Our data regarding intracranial blood flow analysis in both groups suggest a relevant trend of decrease in RI (resistance) and PI (pulsatility) indices in the SARS-CoV-2-exposed group when maternal infections occur in the last 14 days of gestation and critical cases. This fact is thought to be a consequence of systemic adaptation to the persistent inflammatory condition that may be present even after the first 14 days of acute viral symptoms (27, 28). Cases of early maternal infection with SARS-CoV-2 during pregnancy, especially in the first and second trimesters, would allow sufficient time for arterial flow autoregulation to settle and the systemic inflammatory response to subside.

Such hemodynamic adaptation findings have been widely reported in the literature for other conditions predisposing to brain injury, such as hypoxic-ischemic injury, metabolic damage, and systemic inflammatory conditions (SIRS—systemic inflammatory response syndrome) (29, 30), generally indicating situations in which the brain has increased metabolic demands and a significant increase in intracranial blood flow is required. In fetal life, an analogous situation is classically demonstrated in cases of fetal intrauterine growth-restriction (IUGR), when the fetal arterial flow is redirected to the intracranial circulation to the detriment of visceral and peripheral flow (31–33).

Unlike other viral infections with the well-known transplacental transmission, such as human cytomegalovirus (CMV), rubella virus, parvovirus B19, and Zika virus (ZIKV), the worst pregnancy outcomes in SARS-CoV-2 infection were observed in late-stage pregnancies. This finding is consistent with the current literature, as current evidence does not demonstrate that SARS-CoV-2 represents efficient transplacental virus transmission or direct fetal neuronal damage (34, 35).

4.4. Elastography findings (shear-wave elastography assessment)

To our knowledge, no previous study has assessed elastography parameters of the brain parenchyma in infants exposed to SARS-CoV-2 during pregnancy. The few publications in the pediatric literature include small case series of healthy individuals aimed at suggesting standard elastography values for normal brain parenchyma in neonates (36, 37). Other similar studies have been conducted in mice with anatomopathological correlations (38, 39). Experiments in mice achieved a significant level of agreement with human brain values, presumably related to the very similar elasticity coefficients/energy densities (p) of mouse and human brains.

When the elastography data of our study groups were analyzed, significant differences were found between SARS-CoV-2-exposed newborns and the unexposed group in terms of the elastic modulus of the brain parenchyma. All regions of interest (ROIs) showed a reduction in the elasticity coefficient/Young's modulus (E) in the SARS-CoV-2-exposed group.

The elastography pattern differences between both groups were more pronounced in the DWM deep white matter zone (ROI number 1) when compared to other regions of analysis such as subcortical white matter and the frontal cortex. A plausible hypothesis is related to differences in the tissular composition of these regions, with a predominance of myelin in the deep white matter (40). Considering also the age of the subjects (6 months of adjusted chronological age), our ROI at the DWM was expected to be myelinated at this stage, different from the subcortex or frontal cortical zones (41–43). These elements suggest that brain findings related to SARS-CoV-2 exposure during pregnancy may be due, to some extent, to changes in the amount of myelin in the cerebral tissue, knowing that those with less myelin present a decrease in their elasticity coefficients, corresponding to a reduction in stiffness. Another possible mechanism could be mild intra-myelinic edema, in which the inflammation causes an increased water content in the cerebral tissue, thus leading to a decrease in tissue stiffness.

Our findings are consistent with recent studies investigating the impact of SARS-CoV-2 infection during pregnancy on pediatric neurodevelopment. Regarding neuroimaging, a study published in October 2021 aimed to assess the association between maternal SARS-CoV-2 infection during pregnancy and offspring brain development using MRI scans (44). The study followed 55 infants born to mothers with SARS-CoV-2 infection during pregnancy. The researchers found that infants born to mothers with SARS-CoV-2 infection during pregnancy had reduced cortical thickness in the left superior temporal gyrus, which is an important brain region for language and social communication. Abnormal cortical thickness in this region has been associated with neurodevelopmental conditions such as autism spectrum disorders. The study suggests that maternal SARS-CoV-2 infection during pregnancy may affect offspring brain development, particularly in brain regions important for language and social communication.

Protocols with a more clinical focus included a study published in January 2022 (45) that followed 205 children born to mothers with SARS-CoV-2 infection during pregnancy and found that children born to mothers with SARS-CoV-2 infection during pregnancy had an increased risk of developmental delay at 12 months of age compared to children born to mothers without SARS-CoV-2 infection. Another study published in August 2021 (46) found that children born to mothers with severe or critical COVID-19 during pregnancy had a higher risk of cognitive, motor, and language developmental delays at 6 months of age compared to children born to mothers without COVID-19. The study followed 150 infants born to mothers with COVID-19 and 150 infants born to mothers without COVID-19.

It is worth noting that these studies have limitations, and more research is needed to fully understand the potential effects of SARS-CoV-2 infection during pregnancy on pediatric neurodevelopment. However, the findings suggest that healthcare providers should closely monitor children born to mothers with SARS-CoV-2 infection during pregnancy for any signs of developmental delays or neurodevelopmental disorders.

4.5. Limitations

Causal associations between SARS-CoV-2 infection and adverse perinatal outcomes have been suggested in clinical studies but have not been definitely established, as there are many potential confounding factors involved. Among these, we should emphasize that mothers infected by SARS-CoV-2 during pregnancy are often prone to gestational complications, including adverse birth conditions, preterm labor, and maternal and neonatal hypoxia—factors that may themselves lead to CNS damage. Controlling all of these factors can be challenging. Our study attempted to control for some of these possible biases with covariance analysis techniques. However, many characteristics related to clinical maternal status, such as gestational hypertension, diabetes, previous lung disease, and obesity, persisted in our sample for both groups and may affect neurodevelopmental outcomes in infants. It is also relevant to consider that most of our sample was composed of outpatients, so the severity of maternal infection was predominantly mild to moderate, and there was a quantitative disproportion between case and control groups, given the context of multiple lockdowns and subsequent SARS-CoV-2 vaccination—the latter being one of the exclusion criteria for the control group. We acknowledge the substantial difference in the sample size between the cases and controls, and the possibility of introducing bias as a result. Because infant outcomes of maternal SARS-CoV-2 exposure during pregnancy are poorly defined to date, an accurate prospective sample size estimation for cases and controls was not feasible. However, a *post hoc* analysis was performed to estimate the number of controls needed to maintain a probability of error (alpha) of 0.05 with a power of 0.8 using the relative frequency of abnormal imaging findings in the cases. We used a likelihood

ratio test to estimate the sample size needed for controls and found that $N = 9$. Thus, we believe that the control group in our study is sufficient for our research questions. Furthermore, the prospective recruitment of our controls involved randomly selecting individuals from a large representative population in our universal public health system.

5. Conclusion

SARS-CoV-2 infection during pregnancy is associated with encephalic changes in a relevant proportion of cases, predominantly affecting the cerebral deep white matter (DWM). The characteristic SARS-CoV-2-related pediatric leukopathy is manifested in neuroimaging with increased echogenicity and decreased elasticity coefficients in the DWM, i.e., reduced stiffness. These findings open up a spectrum of research possibilities regarding their effects on fetal, neonatal, and childhood health. The description of the consequences of infection in long-term follow-up may provide a better understanding of the disease and its impact on the central nervous system.

Future research using correlated axial methods, such as magnetic resonance imaging and tractography, may contribute to predicting brain areas more vulnerable to SARS-CoV-2-related encephalopathy and delineating regions with a propensity for decreased myelination. By understanding the neuroimaging correlates of SARS-CoV-2 infection in the perinatal period, this study could provide a more complete picture of the presentation pattern in the brain of SARS-CoV-2-exposed individuals during early childhood. The characterization of pediatric brain areas with a higher risk of neurological damage following maternal SARS-CoV-2 infection will allow the evaluation of clinical correlates and the early prevention of neurodevelopmental sequelae.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Research Ethics Committee of the University of Brasilia School of Medicine (Certificate Number 32359620.0.0000.5558). Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

Author contributions

Study design: DA, FM, GF, MC, LS, CA, and LM. Advisory committee: LL, TR, PK, LE, AZ, AS, and ON. Funding

acquisition: LE, AZ, CG, OM-F, and LM. Sample collection, clinical appointments, and data collection: DA, FM, GF, MC, and LS. Data analysis: DA, FM, LL, TR, CA, and LM. Writing and revision of the manuscript: DA, FM, LL, TR, CA, and LM. All authors have participated sufficiently in the work to take responsibility for its content. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

The study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the University of Brasília (UnB) (Grant # 7155, "Fundo COVID-19 UnB em Ação: Ações emergenciais para combate à COVID-19 e mitigação das consequências da pandemia"). This study was funded by Cnpq/CAPES.

Acknowledgments

The research project involves doctoral students and professors affiliated with the Medical Sciences Post-Graduation Program of the University of Brasília (UnB), supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors express their gratitude University Hospital of Brasília (HUB) for the use of its facilities. The authors also thank the University of Melbourne and the Austin Health Library for

technical support with literature searches and statistical analysis. ON and OM-F received a research fellowship from the Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Brazil).

Conflict of interest

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

Publisher's note

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

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2023.1194114/full#supplementary-material>.

References

1. Vesce F, Battisti C, Crudo M. The inflammatory cytokine imbalance for miscarriage, pregnancy loss and COVID-19 pneumonia. *Front Immunol.* (2022) 13:861245. doi: 10.3389/fimmu.2022.861245
2. Carvajal J, Casareto P, Toso A, Farias M, Carrasco-Negre K, Araujo K, et al. Functional consequences of SARS-CoV-2 infection in pregnant women, fetoplacental unit, and neonate. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* (2023) 1869 (1):166582. doi: 10.1016/j.bbdis.2022.166582
3. Wong AM, Toh CH. Spectrum of neuroimaging mimics in children with COVID-19 infection. *Biomol J.* (2022) 45(1):50–62. doi: 10.1016/j.bj.2021.11.005
4. Abdel-Mannan O, Eyme M, Löbel U, Bamford A, Eltze C, Hameed B, et al. Neurologic and radiographic findings associated with COVID-19 infection in children. *JAMA Neurol.* (2020) 77(11):1440–5. doi: 10.1001/jamaneurol.2020.2687
5. Patel PB, Bearden D. Neuropathogenesis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Curr Opin Pediatr.* (2021) 33(6):597–602. doi: 10.1097/MOP.0000000000001068
6. Yang H, Li H, Liao J, Yuan X, Shi C, Liang W. Compression elastography and shear wave ultrasound elastography for measurement of brain elasticity in full-term and premature neonates: a prospective study. *J Ultrasound Med.* (2023) 42 (1):221–31. doi: 10.1002/jum.16075
7. deCampo D, Hwang M. Characterizing the neonatal brain with ultrasound elastography. *Pediatr Neurol.* (2018) 86:19–26. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2018.06.005
8. Kim HG, Park MS, Lee JD, Park SY. Ultrasound elastography of the neonatal brain: preliminary study. *J Ultrasound Med.* (2017) 36(7):1313–9. doi: 10.7863/ultra.16.06079
9. Ciapponi A, Bardach A, Comandé D, Bernueta M, Argento FJ, Rodriguez Cairoli F, et al. COVID-19 and pregnancy: an umbrella review of clinical presentation, vertical transmission, and maternal and perinatal outcomes. *PLoS One.* (2021) 16(6):e0253974. doi: 10.1371/journal.pone.0253974
10. Granja MG, Oliveira A, Figueiredo C, Gomes A, Ferreira E, Giestal-de-Araujo E, et al. SARS-CoV-2 infection in pregnant women: neuroimmune-endocrine changes at the maternal-fetal interface. *Neuroimmunomodulation.* (2021) 28(1):1–21. doi: 10.1159/000515556
11. Manti S, Leonardi S, Rezaee F, Harford TJ, Perez MK, Piedimonte G. Effects of vertical transmission of respiratory viruses to the offspring. *Front Immunol.* (2022) 13:853009. doi: 10.3389/fimmu.2022.853009
12. Overton EE, Goffman D, Friedman AM. The epidemiology of COVID-19 in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol.* (2022) 65(1):10–22. doi: 10.1097/GRF.0000000000000674
13. Bastos SNMAN, Barbosa BLF, Cruz LGB, Souza RP, Silva Melo SSE, Luz CCRDS. Clinical and obstetric aspects of pregnant women with COVID-19: a systematic review. *Rev Bras Ginecol Obstet.* (2021) 43(12):949–60. doi: 10.1055/s-0041-1733913
14. Valderas C, Méndez G, Echeverría A, Suarez N, Julio K, Sandoval F. COVID-19 and neurologic manifestations: a synthesis from the child neurologist's corner. *World J Pediatr.* (2022) 18(6):373–82. doi: 10.1007/s12519-022-00550-4
15. Casabianca M, Gaula C, Titomanlio L, Lenglet L. Neurological consequences of SARS-CoV-2 infections in the pediatric population. *Front Pediatr.* (2023) 11:1123348. doi: 10.3389/fped.2023.1123348
16. Govil-Dalela T, Srivastava L. Neurological effects of COVID-19 in children. *Pediatr Clin North Am.* (2021) 68(5):1081–91. doi: 10.1016/j.pcl.2021.05.010
17. Stafitrom CE, Jantzie LL. COVID-19: neurological considerations in neonates and children. *Children.* (2020) 7(9):133. doi: 10.3390/children7090133
18. Perlman JM, Salvatore C. Coronavirus disease 2019 infection in newborns. *Clin Perinatol.* (2022) 49(1):73–92. doi: 10.1016/j.clp.2021.11.005
19. Allotey J, Chatterjee S, Kew T, Gaetano A, Stallings E, Fernández-García S, et al. SARS-CoV-2 positivity in offspring and timing of mother-to-child transmission: living systematic review and meta-analysis. *Br Med J.* (2022) 376:e067696. doi: 10.1136/bmj-2021-067696
20. Singer TG, Evankovich KD, Fisher K, Demmler-Harrison GJ, Risen SR. Coronavirus infections in the nervous system of children: a scoping review making

- the case for long-term neurodevelopmental surveillance. *Pediatr Neurol.* (2021) 117:47–63. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2021.01.007
21. Jha NK, Ojha S, Jha SK, Dureja H, Singh SK, Shukla SD, et al. Evidence of coronavirus (CoV) pathogenesis and emerging pathogen SARS-CoV-2 in the nervous system: a review on neurological impairments and manifestations. *J Med Neurosci.* (2021) 71(11):2192–209. doi: 10.1007/s12031-020-01767-6
22. da Silva Chagas I, Sandre PC, de Velasco PC, Marcondes H, Ribeiro E, Ribeiro NCA, Barreto AL, et al. Neuroinflammation and brain development: possible risk factors in COVID-19-infected children. *Neuroimmunomodulation.* (2021) 28(1):22–8. doi: 10.1159/000512815
23. Stracusa L, Cascio A, Giordano S, Medaglia AA, Restivo GA, Pirrone I, et al. Neurological complications in pediatric patients with SARS-CoV-2 infection: a systematic review of the literature. *Ital J Pediatr.* (2021) 47(1):123. doi: 10.1186/s13052-021-01066-9
24. de Moraes FM, de Souza JWPS, Alves LP, de Siqueira MFR, Dos Santos APA, de Carvalho Bezardo MM, et al. SARS-CoV-2 infection and possible neonatal neurological outcomes: a literature review. *Viruses.* (2022) 14(5):1037. doi: 10.3390/v14051037
25. Zimmer A, Youngblood A, Adnane A, Miller BJ, Goldsmith DR. Prenatal exposure to viral infection and neuropsychiatric disorders in offspring: a review of the literature and recommendations for the COVID-19 pandemic. *Brain Behav Immun.* (2021) 91:756–70. doi: 10.1016/j.bbi.2020.10.024
26. Figueiredo CP, Fontes-Dantas FL, da Poian AT, Clarke JR. SARS-CoV-2-associated cytokine storm during pregnancy as a possible risk factor for neuropsychiatric disorder development in post-pandemic infants. *Neuropharmacology.* (2021) 201:108841. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108841
27. Briana D, Syridou G, Papaevangelou V. Perinatal COVID-19. *Pediatr Infect Dis J.* (2021) 40(12):e504–6. doi: 10.1097/INF.0000000000003356
28. Shook LL, Fozzerman LT, Edlow AG. Immune responses to SARS-CoV-2 in pregnancy: implications for the health of the next generation. *J Immunol.* (2022) 209(8):1465–73. doi: 10.4049/jimmunol.2200414
29. O'Loughlin L, Alvarez Toledo N, Badrie L, Waechter R, Rayner J. A systematic review of severe neurological manifestations in pediatric patients with coexisting SARS-CoV-2 infection. *Neurol Int.* (2021) 13(3):410–27. doi: 10.3390/neurolint13030041
30. Shook LL, Sullivan EL, Lo JO, Perlis RH, Edlow AG. COVID-19 in pregnancy: implications for fetal brain development. *Trends Mol Med.* (2022) 28(4):319–30. doi: 10.1016/j.molmed.2022.02.004
31. Grünebaum A, Dudenhausen J, Chervenak FA. COVID and pregnancy in the United States - an update as of August 2022. *J Perinat Med.* (2023) 51(1):34–8. doi: 10.1515/jpm-2022-0361
32. Amirian A, Pakzad R, Hasanpour V, Mirzadeh N, Abdi F. Neonatal outcome among pregnant women with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* (2022) 35(25):9234–48. doi: 10.1080/14767058.2021.2022648
33. Neef V, Buzmann H, Rabenau HF, Zacharowski K, Raimann FJ. Characterization of neonates born to mothers with SARS-CoV-2 infection: review and meta-analysis. *Pediatr Neonatol.* (2021) 62(1):11–20. doi: 10.1016/j.pedneo.2020.10.001
34. Simbar M, Nazarpour S, Sheidaei A. Evaluation of pregnancy outcomes in mothers with COVID-19 infection: a systematic review and meta-analysis. *J Obstet Gynaecol.* (2023) 43(1):2162867. doi: 10.1080/01443615.2022.2162867
35. Płarska I, Rizin M, Sawicki W. Influence of COVID-19 infection on placental function. *Ginekol Pol.* (2023) 94(1):79–83. doi: 10.5603/GP.a2022.0139
36. Garcés Iñigo E, Llorens Salvador R, Escrig R, Hervás D, Vento M, Martí-Bonmati L. Quantitative evaluation of neonatal brain elasticity using shear wave elastography. *J Ultrasound Med.* (2021) 40(4):795–804. doi: 10.1002/jum.15464
37. Wang J, Zhang Z, Xu X, Lu X, Wu T, Tong M. Real-time shear wave elastography evaluation of the correlation between brain tissue stiffness and body mass index in premature neonates. *Transl Pediatr.* (2021) 10(12):3230–6. doi: 10.21037/tp-21-513
38. Liao J, Yang H, Yu J, Liang X, Chen Z. Progress in the application of ultrasound elastography for brain diseases. *J Ultrasound Med.* (2020) 39(11):2093–104. doi: 10.1002/jum.15317
39. Liu L, Bongers A, Bilston LE, Jagé L. The combined use of DTI and MR elastography for monitoring microstructural changes in the developing brain of a neurodevelopmental disorder model: poly (I:c)-induced maternal immune-activated rats. *PLoS One.* (2023) 18(1):e0280498. doi: 10.1371/journal.pone.0280498
40. Hwang M, Zhang Z, Katz J, Freeman C, Kilbaugh T. Brain contrast-enhanced ultrasonography and elastography in infants. *Ultrasonography.* (2022) 41(4):633–49. doi: 10.14366/usg.21224
41. Germano C, Messina A, Tavella E, Vitale B, Avella V, Barbieri M, et al. Fetal brain damage during maternal COVID-19: emerging hypothesis, mechanism, and possible mitigation through maternal-targeted nutritional supplementation. *Nutrients.* (2022) 14(16):3303. doi: 10.3390/nu14163303
42. Karnik M, Beeraka NM, Uthiah CA, Nataraj SM, Bettadapura ADS, Aliev G, et al. A review on SARS-CoV-2-induced neuroinflammation, neurodevelopmental complications, and recent updates on the vaccine development. *Mol Neurobiol.* (2021) 58(9):4535–63. doi: 10.1007/s12035-021-02399-6
43. Jeličić I, Veselinović A, Črović M, Jakovljević V, Raičević S, Subotić M. Maternal distress during pregnancy and the postpartum period: underlying mechanisms and child's developmental outcomes—a narrative review. *Int J Mol Sci.* (2022) 23(22):13932. doi: 10.3390/ijms232213932
44. Nurman M, Navé L, Söderling J, Ahlberg M, Hervius Askling H, Aronsson B, et al. Association of maternal SARS-CoV-2 infection in pregnancy with neonatal outcomes. *JAMA Netw Open.* (2021) 325(20):2076–86. doi: 10.1001/jama.2021.5775; Erratum in: *JAMA Netw Open.* (2021) 326(10):978.
45. Cosma S, Carruso AR, Casato J, Borella F, Bertero I, Bovetti M, et al. Obstetric and neonatal outcome in SARS-CoV-2 infection during pregnancy: a prospective cohort study. *J Obstet Gynaecol Res.* (2022) 48(2):393–401. doi: 10.1111/jog.15105
46. Ayed M, Embaireq A, Kartam M, Moore K, Alqallaf M, AlNafisi A, et al. Neurodevelopmental outcomes of infants born to mothers with SARS-CoV-2 infections during pregnancy: a national prospective study in Kuwait. *BMC Pediatr.* (2022) 22(1):319. doi: 10.1186/s12887-022-03359-2

APPENDIX A –

Acquisition of color Doppler and spectral images, measurement of hemodynamic indices in the main intracranial arteries

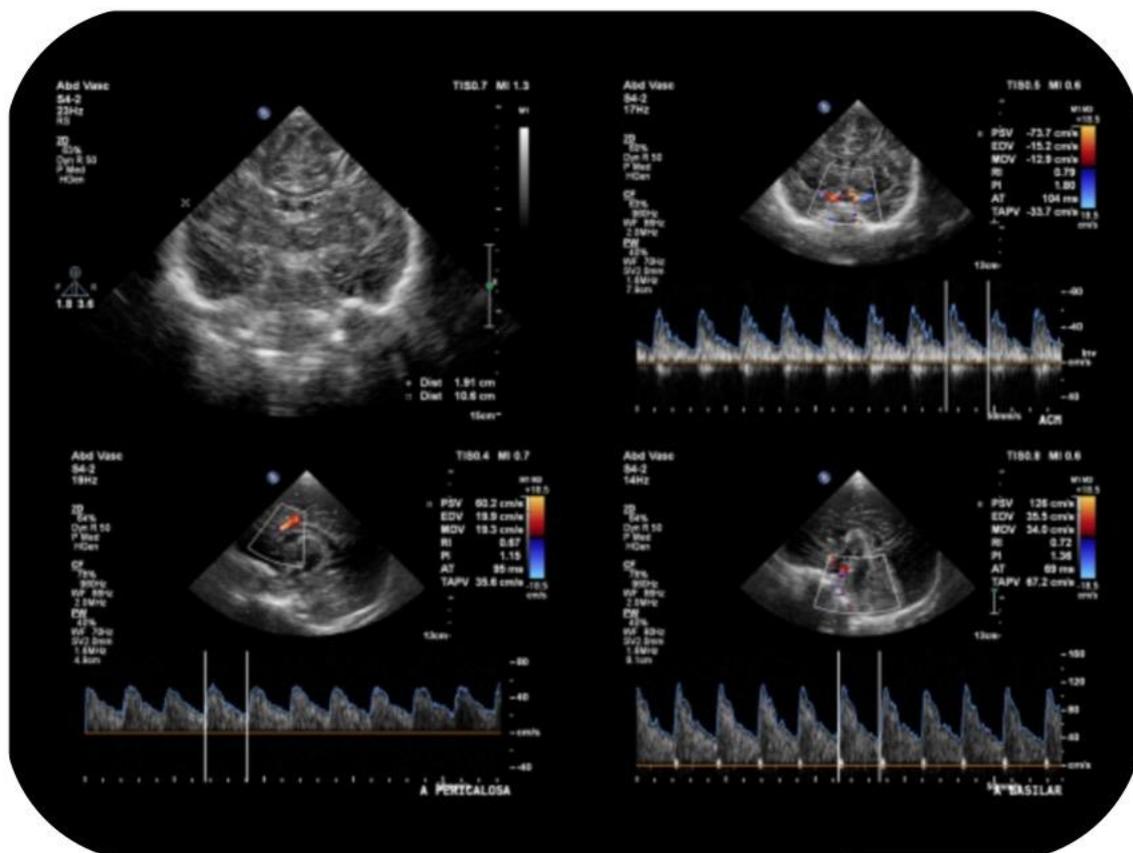


Figure A1. Transcranial ultrasonography images in B-mode (grayscale) coronal view for evaluation of the deep white matter over the anterior fontanelle; and Doppler flowmetry of the major intracranial arteries.

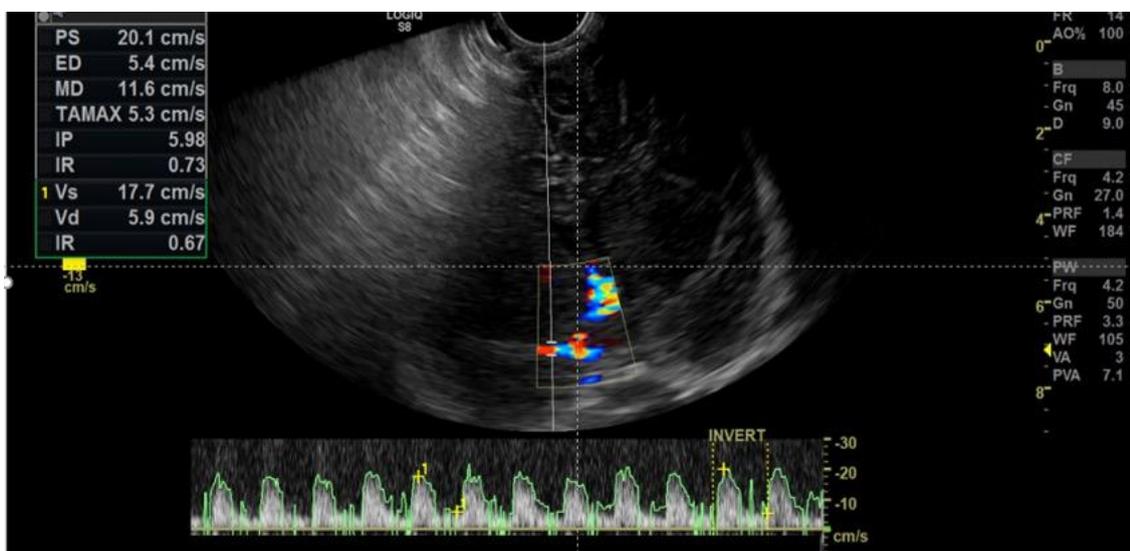


Figure A2. Transcranial ultrasonography images in B-mode (grayscale) coronal view over the anterior fontanelle, with color and spectral Doppler for evaluation of hemodynamic indices in the middle cerebral artery.

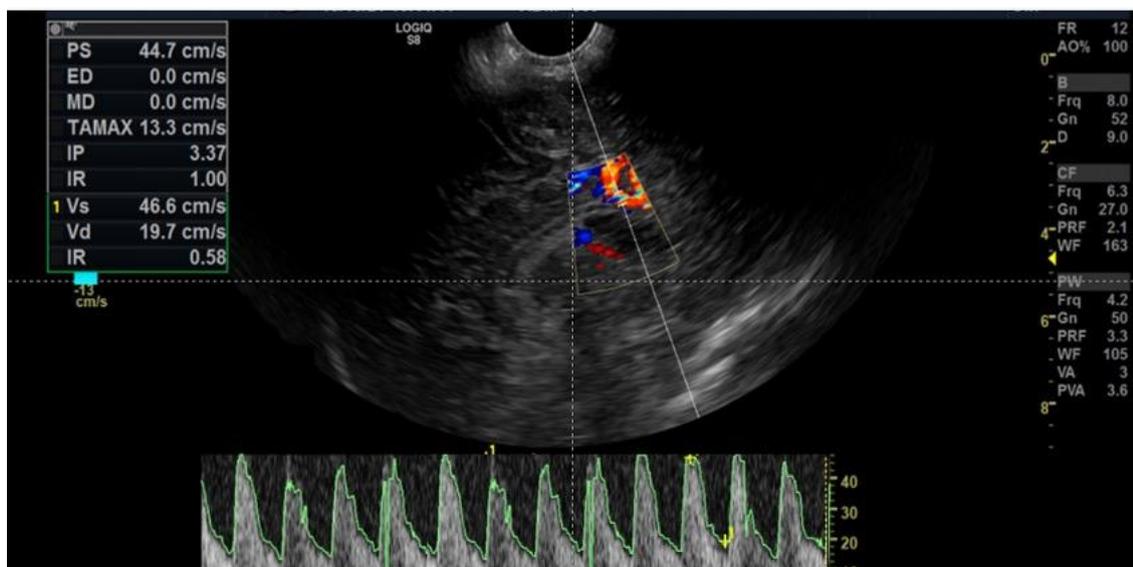


Figure A3. Transcranial ultrasonography images in B-mode (grayscale) sagittal view over the anterior fontanelle, with color and spectral Doppler for evaluation of hemodynamic indices in the pericallosal artery.

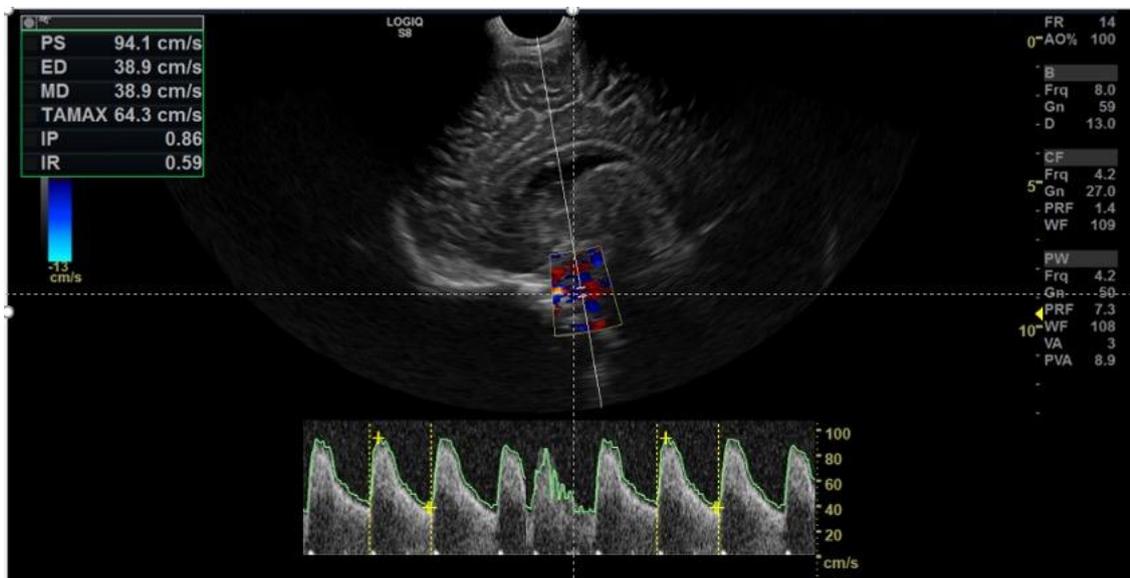


Figure A4. Transcranial ultrasonography images in B-mode (grayscale) coronal view over the anterior fontanelle, with color and spectral Doppler for evaluation of hemodynamic indices in the basilar artery. Velocities are expressed in cm/s, dimensionless IR, and IP indices.

APPENDIX B –

Acquisition of gray scale images for real time fusion with elastography map (Shear Wave Mode) and demonstration of module “E” measurements acquired in regions of interest (ROIs) in the brain.

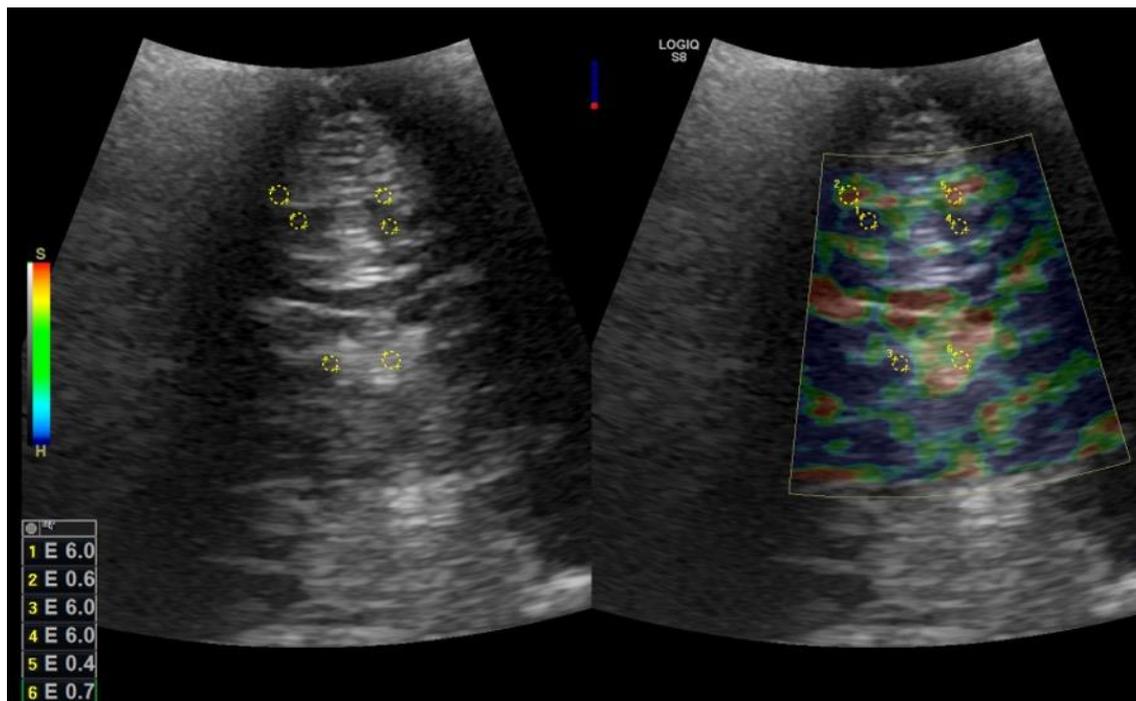


Figure B1. Shear-wave US elastography with color map in the region of the basal ganglia and deep white matter, demonstrating the acquisition of measurements in six regions of interest (circular ROIs), in the coronal plane. Elastic modulus measurements in the regions of interest expressed in kilopascals (kPa).

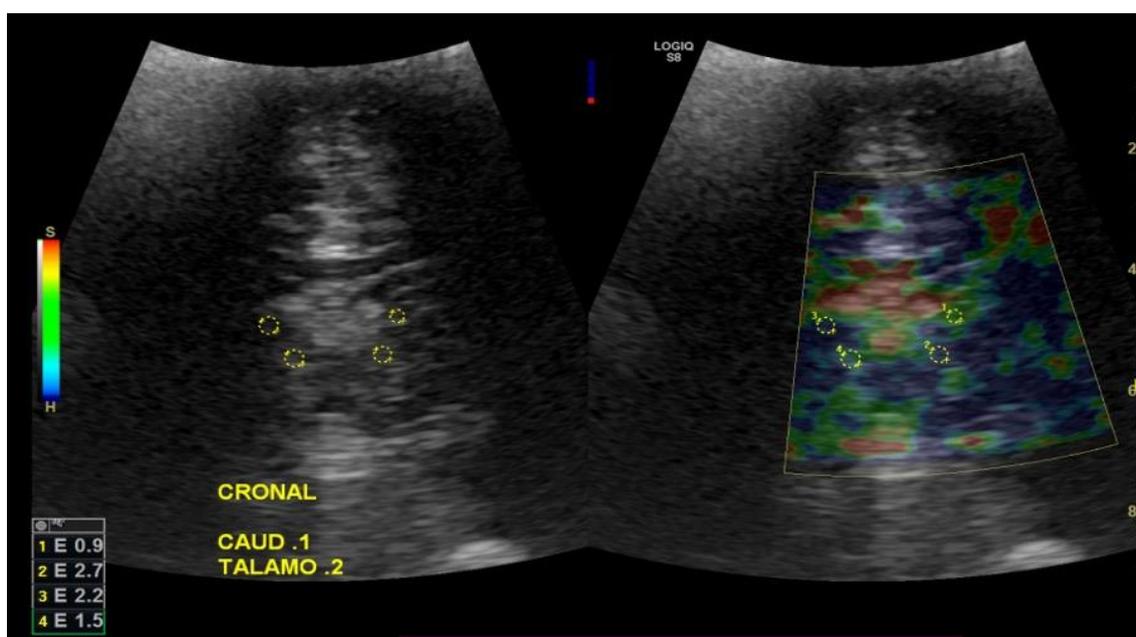


Figure B2. Shear-wave US elastography with color map in the region of the thalamus and caudate nuclei, demonstrating the acquisition of measurements in four regions of interest (circular ROIs), in the coronal plane. Elastic modulus measurements in the regions of interest expressed in kilopascals (kPa).

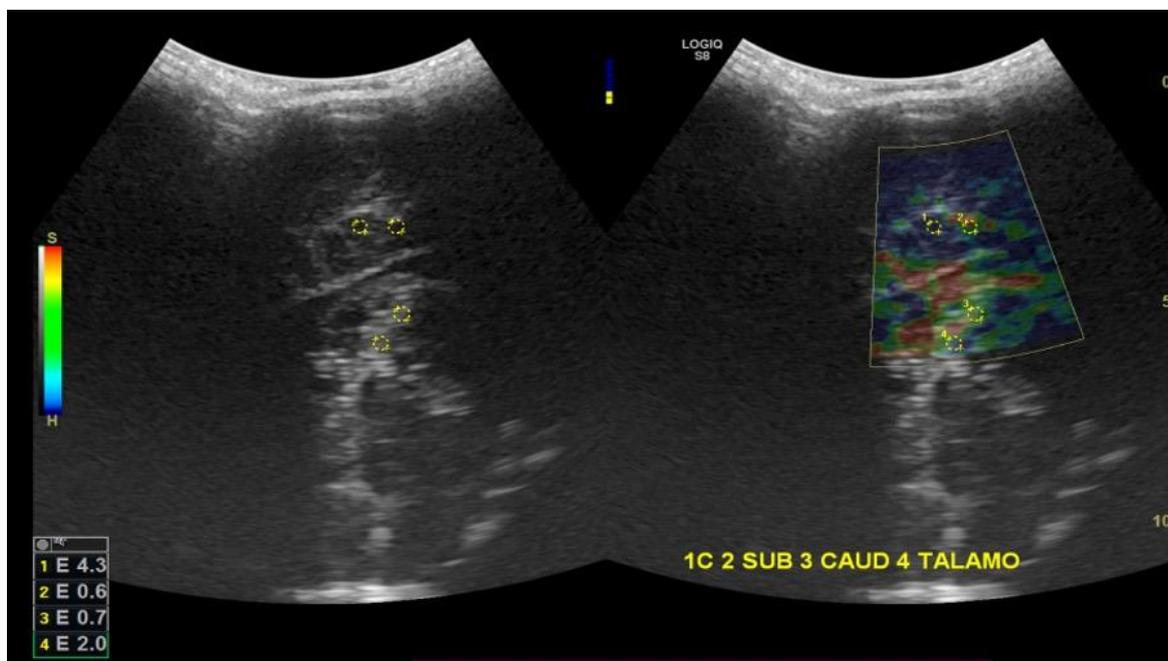


Figure B3. Shear-wave US elastography with color map in the region of the cortex, subcortical white matter, caudate nucleus, and thalamus, demonstrating the acquisition of measurements in four regions of interest (circular ROIs), in the sagittal plane. Elastic modulus measurements in the regions of interest expressed in kilopascals (kPa).

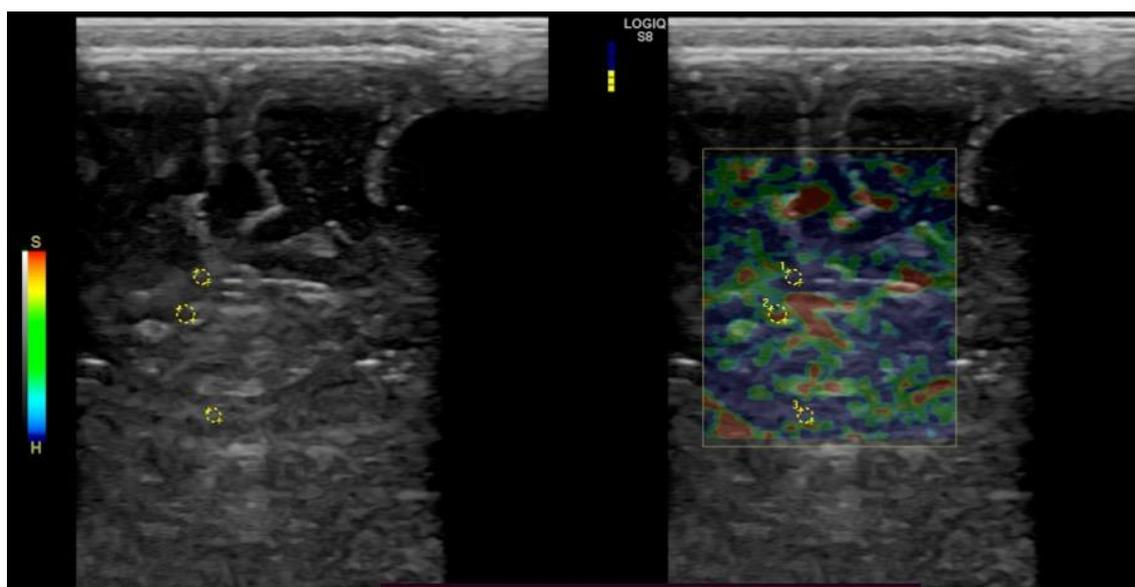


Figure B4. Shear-wave US elastography with color map in the cortico-subcortical interface region, including frontal cortical gray matter, juxtacortical white matter, and deep white matter, demonstrating the acquisition of measurements in three regions of interest (circular ROIs), in the coronal plane. Elastic modulus measurements in the regions of interest expressed in kilopascals (kPa).

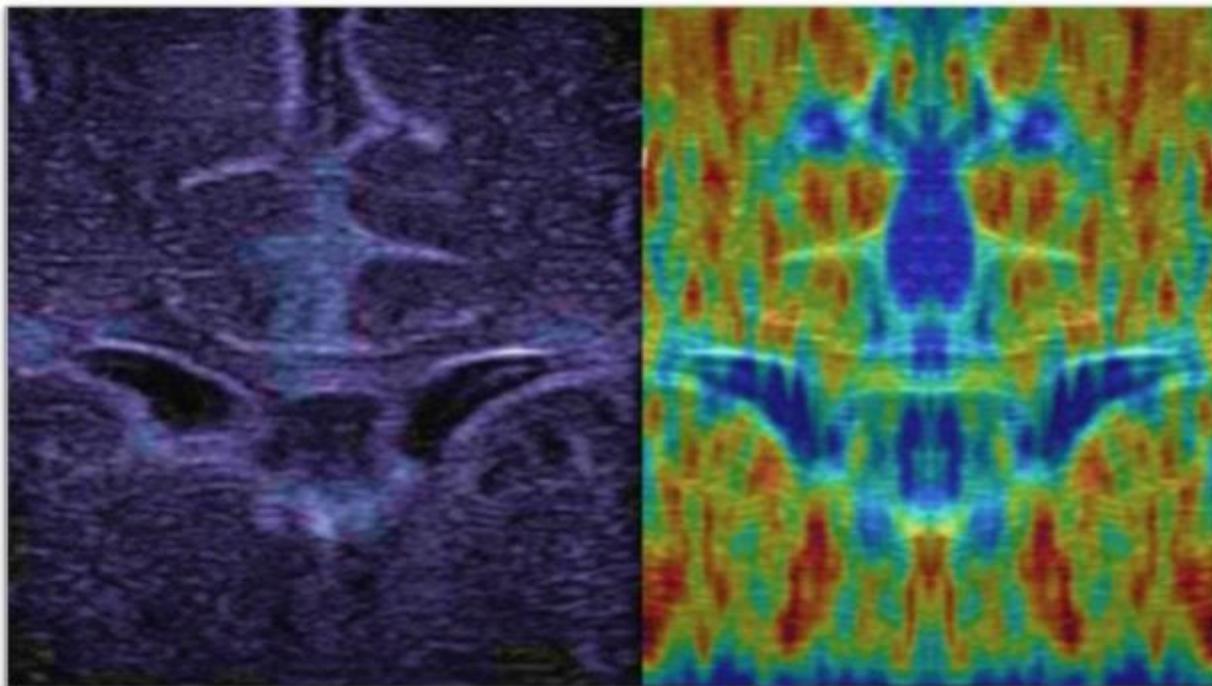


Figure B5. Shear-wave mode US elastography with color map in the cortical-subcortical interface region, including frontal cortical gray matter, juxtacortical white matter, deep white matter, and basal ganglia, showing the variation of the color map according to the elastic modulus of (E) in a patient whose mother was exposed to SARS-Cov-2 infection during pregnancy, with reduced elasticity affecting the basal ganglia bilaterally (areas shown in blue) and some zones of the deep white matter. Other zones in blue correspond to CSF circulation spaces, with mostly low “E” values.

APPENDIX C –

Supplementary Table 1C. Maternal and pediatric clinical conditions/comorbidities distributed between the group exposed to SARS-CoV-2 infection during pregnancy (cases) and the unexposed group (control), according to pre- and post-natal assessments at outpatient clinics.

Groups			
Maternal diseases*	Cases (n= 201)	Control (n = 18)	p-value#
Systemic arterial hypertension	7.4% (15)	5.5% (1)	0.1187
Pregestational diabetes	6.9% (14)	5.5% (1)	0.1174
Pulmonary disease	7.4% (15)	0	0.1335
Cardiac disease	2.9% (6)	0	0.1208
Obesity	10.4% (21)	5.5% (1)	0.1276
Groups			
Infant diseases/comorbidities&	Cases (n= 201)	Control (n = 18)	p-value#
Anemia	18.9% (38)	11.1% (2)	0.1420
Malnutrition	4.9% (10)	5.5% (1)	0.1123
Obesity	2.4% (5)	0	0.1196
Bronchospasm	7.9% (16)	5.5% (1)	0.1201
Miscellaneous	22.3% (45)	16.6% (3)	0.1371

* values expressed as percentage and frequency, as % (n).

p-value calculated by Fisher's test. Level of significance at 0.05 (p-values>0.05 - no significant difference between groups).

&Conditions diagnosed during the first 6 months of clinical follow-up. Anemia was defined as hemoglobin <11 g/dL, undernutrition was defined as weight-for-age z-score <-2 SD, obesity was defined as weight-for-length z-score >2 SD, and bronchospasm was defined as a physician diagnosis of asthma or wheezing. The miscellaneous category included: rhinitis, dermatitis, cow's milk protein allergy (CMPA), and gastroesophageal reflux disease (GERD).

APÊNDICE B – PROTOCOLO PROUDEST - Qualis Capes A3

JMIR RESEARCH PROTOCOLS

Fernandes et al

Protocol

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

Geraldo Magela Fernandes^{1*}, MSc, MD; Felipe Motta^{1*}, MD; Lizandra Moura Paravidine Sasaki^{1*}, MSc, MD; Ângelo Pereira Da Silva², MD; Andreza Monforte Miranda³, MSc; Aleida Oliveira De Carvalho², BSc; Ana Paula Monteiro Gomides⁴, MD, PhD; Alexandre Anderson De Sousa Munhoz Soares¹, MD, PhD; Agenor De Castro Moreira Dos Santos Jr⁵, BSc; Caroline De Oliveira Alves¹, MSc, PhD; Ciro Martins Gomes¹, MD, PhD; Clara Correia De Siracusa¹, MD; David Alves De Araújo Jr², MD; Dayde Lane Mendonça-Silva², MSc, PhD; José Alfredo Lacerda De Jesus¹, MSc, MD, PhD; Karina Nascimento Costa¹, MSc, MD, PhD; Maria Eduarda Canellas De Castro², MD; Patricia Shu Kurizky², MD, PhD; Paulo Sérgio França¹, MSc, MD, PhD; Rosana Tristão¹, MSc, PhD; Yacara Ribeiro Pereira², BSc; Luiz Claudio Gonçalves De Castro¹, MSc, MD, PhD; Alberto Moreno Zaconeta¹, MSc, MD, PhD; Cleandro Pires De Albuquerque², MD; Licia Maria Henrique Da Mota¹, MD, PhD

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

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

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

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

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

*these authors contributed equally

Corresponding Author:

Geraldo Magela Fernandes, MSc, MD

Faculty of Medicine

University of Brasilia

Campus Universitário Darcy Ribeiro, UNB Área 1 - Asa Norte

Brasilia - DF, 70910-900

Brazil

Phone: 55 61981070071

Email: geraldomafer@gmail.com

Abstract

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

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

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

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

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

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

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

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

KEYWORDS

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

Introduction

Background

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Objective

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

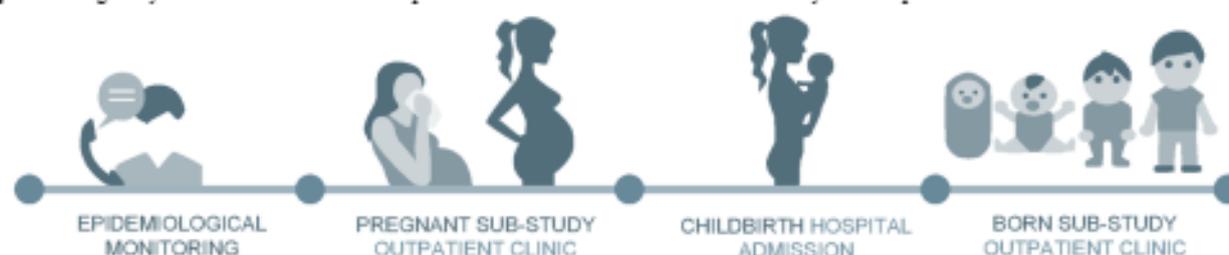
fetal growth, and premature birth; (2) to investigate the presence of SARS-CoV-2 and anti-SARS-CoV-2 antibodies in the cerebrospinal fluid (CSF) of women with symptomatic COVID-19 undergoing spinal anesthesia for a cesarean section; (3) to determine the serum proinflammatory and regulatory cytokine profiles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

Methods

Study Design

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

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



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

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

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

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

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

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

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

Sample Size Calculation

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

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

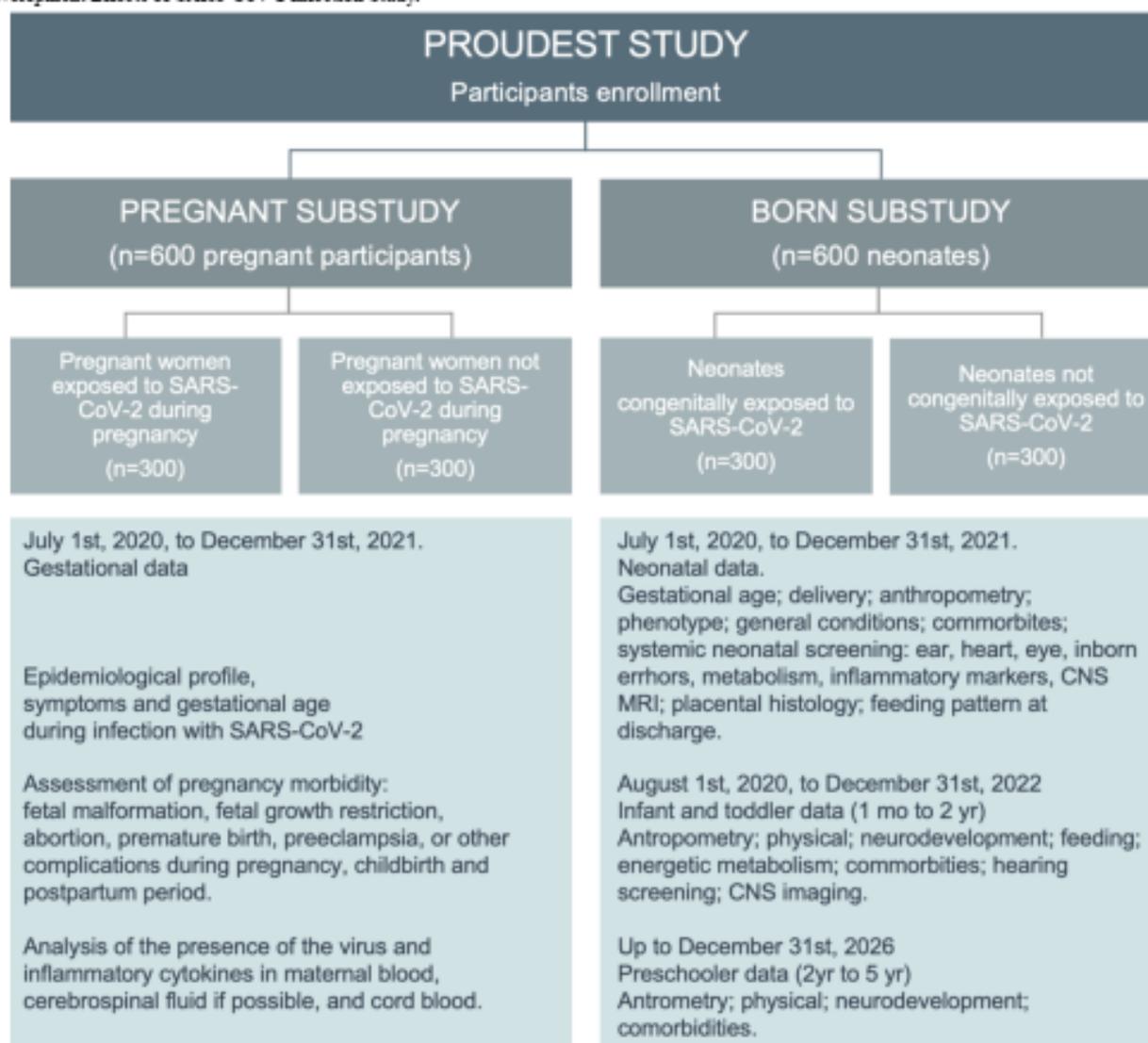
We set an a priori number of 300 SARS-CoV-2–exposed women for the PREGNANT phase. This will result in the inclusion of the expected 300 SARS-CoV-2–exposed children in the BORN phase. The subject allocation rate between the exposed and control groups was 1:1. This indicated the need for an additional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

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

Procedures

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

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



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

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

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

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

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

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

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

The placenta will be subjected to fresh histopathological analyses for assessing possible morphological and histological changes that may be associated with SARS-CoV-2 infection. Histopathological analysis will be conducted according to the Amsterdam protocol [41].

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

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

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

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

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

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

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

Statistical Analysis

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

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

For dichotomous outcomes, binomial regression models, which will be adjusted based on the unbalanced and relevant background features of the comparison groups, will be used to estimate the relative risks between the exposed and nonexposed groups. Partial correlation and general linear models will be used to assess the associations between continuous outcome variables and covariates; adjustments for imbalances will be made as appropriate. A *P* value of <.05 will be considered significant. The control group will be composed of nonexposed mother-child dyads that meet the inclusion criteria. However, those with positive serology tests (IgG and IgM tests conducted at 14-21 days postpartum) will not be included in the control group. The groups will not be matched or paired based on age or other variables. However, any differences between the groups will be adjusted later via statistical means.

Ethics Approval and Consent to Participate

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

Availability of Data and Materials

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

Results

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

Discussion

Study Implications

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Conclusions

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

Acknowledgments

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

Authors' Contributions

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

Conflicts of Interest

None declared.

References

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

11. Naccasha N, Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Berman S, Yoon BH, Maymon E, et al. Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in normal pregnancy and maternal infection. *Am J Obstet Gynecol* 2001 Nov;185(5):1118-1123. [doi: [10.1067/mob.2001.117682](https://doi.org/10.1067/mob.2001.117682)] [Medline: [11717644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11717644/)]
12. Jamieson DJ, Honein MA, Rasmussen SA, Williams JL, Swerdlow DL, Biggerstaff MS, Novel Influenza A (H1N1) Pregnancy Working Group. H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA. *Lancet* 2009 Aug 08;374(9688):451-458. [doi: [10.1016/S0140-6736\(09\)61304-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61304-0)] [Medline: [19643469](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19643469/)]
13. Favre G, Pomar L, Musso D, Baud D. 2019-nCoV epidemic: what about pregnancies? *Lancet* 2020 Feb 22;395(10224):e40 [FREE Full text] [doi: [10.1016/S0140-6736\(20\)30311-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30311-1)] [Medline: [32035511](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32035511/)]
14. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci* 2011 Mar;1221(1):80-87 [FREE Full text] [doi: [10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x)] [Medline: [21401634](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21401634/)]
15. Robson A, Harris LK, Innes BA, Lash GE, Aljunaidy MM, Aplin JD, et al. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *FASEB J* 2012 Dec;26(12):4876-4885. [doi: [10.1096/fj.12-210310](https://doi.org/10.1096/fj.12-210310)] [Medline: [22919072](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22919072/)]
16. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006 Oct;11(5):317-326. [doi: [10.1016/j.siny.2006.05.001](https://doi.org/10.1016/j.siny.2006.05.001)] [Medline: [16839830](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16839830/)]
17. Sacks GP, Studena K, Sargent K, Redman CW. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol* 1998 Jul;179(1):80-86. [doi: [10.1016/s0002-9378\(98\)70254-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(98)70254-6)] [Medline: [9704769](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9704769/)]
18. Kalagiri RR, Carder T, Choudhury S, Vora N, Ballard AR, Govande V, et al. Inflammation in complicated pregnancy and its outcome. *Am J Perinatol* 2016 Dec;33(14):1337-1356. [doi: [10.1055/s-0036-1582397](https://doi.org/10.1055/s-0036-1582397)] [Medline: [27159203](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27159203/)]
19. Yang X, Yang Y, Yuan Y, Liu L, Meng T. The roles of uterine natural killer (NK) cells and KIR/HLA-C combination in the development of preeclampsia: A systematic review. *Biomed Res Int* 2020 Mar 28;2020:4808072 [FREE Full text] [doi: [10.1155/2020/4808072](https://doi.org/10.1155/2020/4808072)] [Medline: [32309433](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32309433/)]
20. Tomimatsu T, Mimura K, Matsuzaki S, Endo M, Kumasawa K, Kimura T. Preeclampsia: Maternal systemic vascular disorder caused by generalized endothelial dysfunction due to placental antiangiogenic factors. *Int J Mol Sci* 2019 Aug 30;20(17):4246 [FREE Full text] [doi: [10.3390/ijms20174246](https://doi.org/10.3390/ijms20174246)] [Medline: [31480243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31480243/)]
21. Gierman LM, Silva GB, Pervaiz Z, Rakner JJ, Mundal SB, Thaning AJ, et al. TLR3 expression by maternal and fetal cells at the maternal-fetal interface in normal and preeclamptic pregnancies. *J Leukoc Biol* 2021 Jan;109(1):173-183. [doi: [10.1002/JLB.3MA0620-728RR](https://doi.org/10.1002/JLB.3MA0620-728RR)] [Medline: [32573856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32573856/)]
22. De Rose DU, Piersigilli F, Ronchetti MP, Santisi A, Bersani I, Dotta A, Study Group of Neonatal Infectious Diseases of The Italian Society of Neonatology (SIN). Novel coronavirus disease (COVID-19) in newborns and infants: what we know so far. *Ital J Pediatr* 2020 Apr 29;46(1):56 [FREE Full text] [doi: [10.1186/s13052-020-0820-x](https://doi.org/10.1186/s13052-020-0820-x)] [Medline: [32349772](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32349772/)]
23. Zeng L, Xia S, Yuan W, Yan K, Xiao F, Shao J, et al. Neonatal early-onset infection with SARS-CoV-2 in 33 neonates born to mothers with COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Pediatr* 2020 Jul 01;174(7):722-725 [FREE Full text] [doi: [10.1001/jamapediatrics.2020.0878](https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2020.0878)] [Medline: [32215598](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32215598/)]
24. Dong L, Tian J, He S, Zhu C, Wang J, Liu C, et al. Possible vertical transmission of SARS-CoV-2 from an infected mother to her newborn. *JAMA* 2020 May 12;323(18):1846-1848 [FREE Full text] [doi: [10.1001/jama.2020.4621](https://doi.org/10.1001/jama.2020.4621)] [Medline: [32215581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32215581/)]
25. Alzamora MC, Paredes T, Caceres D, Webb CM, Valdez LM, La Rosa M. Severe COVID-19 during pregnancy and possible vertical transmission. *Am J Perinatol* 2020 Jun;37(8):861-865 [FREE Full text] [doi: [10.1055/s-0040-1710050](https://doi.org/10.1055/s-0040-1710050)] [Medline: [32305046](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32305046/)]
26. Shanes ED, Mithal LB, Otero S, Azad HA, Miller ES, Goldstein JA. Placental pathology in COVID-19. *Am J Clin Pathol* 2020 Jun 08;154(1):23-32 [FREE Full text] [doi: [10.1093/ajcp/aqaa089](https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa089)] [Medline: [32441303](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32441303/)]
27. Baergen RN, Heller DS. Placental pathology in Covid-19 positive mothers: Preliminary findings. *Pediatr Dev Pathol* 2020;23(3):177-180 [FREE Full text] [doi: [10.1177/1093526620925569](https://doi.org/10.1177/1093526620925569)] [Medline: [32397896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32397896/)]
28. Baud D, Greub G, Favre G, Gengler C, Jaton K, Dubruc E, et al. Second-trimester miscarriage in a pregnant woman with SARS-CoV-2 infection. *JAMA* 2020 Jun 02;323(21):2198-2200 [FREE Full text] [doi: [10.1001/jama.2020.7233](https://doi.org/10.1001/jama.2020.7233)] [Medline: [32352491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32352491/)]
29. Dong Y, Mo X, Hu Y, Qi X, Jiang F, Jiang Z, et al. Epidemiology of COVID-19 among children in China. *Pediatrics* 2020 Jun;145(6):e20200702. [doi: [10.1542/peds.2020-0702](https://doi.org/10.1542/peds.2020-0702)] [Medline: [32179660](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32179660/)]
30. Yang P, Wang X, Liu P, Wei C, He B, Zheng J, et al. Clinical characteristics and risk assessment of newborns born to mothers with COVID-19. *J Clin Virol* 2020 Jun;127:104356 [FREE Full text] [doi: [10.1016/j.jcv.2020.104356](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104356)] [Medline: [32302955](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32302955/)]
31. Liu W, Wang J, Li W, Zhou Z, Liu S, Rong Z. Clinical characteristics of 19 neonates born to mothers with COVID-19. *Front Med* 2020 Apr;14(2):193-198 [FREE Full text] [doi: [10.1007/s11684-020-0772-y](https://doi.org/10.1007/s11684-020-0772-y)] [Medline: [32285380](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32285380/)]
32. Romagano MP, Guerrero K, Spillane N, Kayaalp E, Smilen SW, Alvarez M, et al. Perinatal outcomes in critically ill pregnant women with coronavirus disease 2019. *Am J Obstet Gynecol MFM* 2020 Aug 01;2(3):100151 [FREE Full text] [doi: [10.1016/j.ajogmf.2020.100151](https://doi.org/10.1016/j.ajogmf.2020.100151)]



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

Abbreviations

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

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

Please cite as:

Fernandes GM, Motta F, Sasaki LMP, Silva ÁPD, Miranda AM, Carvalho AOD, Gomides APM, Soares AADSM, Santos Jr ADCMD, Alves CDO, Gomes CM, Siracusa CCD, Araújo Jr DAD, Mendonça-Silva DL, Jesus JALD, Costa KN, Castro MECD, Kurizky PS, França PS, Tristão R, Pereira YR, Castro LCGD, Zaconeta AM, Albuquerque CPD, Mota LMHD

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

JMIR Res Protoc 2021;10(4):e26477

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

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

PMID: [33793409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33793409/)

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

APÊNDICE C - QUALIS CAPES A1

frontiers | Frontiers in Immunology

TYPE Original Research
PUBLISHED 12 April 2023
DOI 10.3389/fimmu.2023.1176898

OPEN ACCESS

EDITED BY
Diana Boraschi,
Chinese Academy of Science (CAS), ChinaREVIEWED BY
Olukemi Amodu,
University of Ibadan, Nigeria
Marcelo Cavalcante,
University of Fortaleza, Brazil*CORRESPONDENCE
Geraldo Magela Fernandes
✉ geraldomafer@gmail.com
Olindo Assis Martins-Filho
✉ olindo.filho@focruz.br†These authors have contributed equally to
this work

‡These authors share senior authorship

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Cytokines and Soluble
Mediators in Immunity,
a section of the journal
Frontiers in ImmunologyRECEIVED 01 March 2023
ACCEPTED 30 March 2023
PUBLISHED 12 April 2023CITATION
Fernandes GM, Sasaki LMP,
Jardim-Santos GP, Schulte HL,
Motta F, da Silva AP, de Carvalho AO,
Pereira YR, Alves CdO,
de Araujo Júnior DA, Mendonça-Silva DL,
Costa KN, de Castro MEC, Lauand L,
Nery RdR, Tristão R, Kurizky PS,
Nóbrega OdT, Espindola LS, de
Castro LCG, Alpoim PN, Godoi LC,
Dusse LMSA, Coelho-dos-Reis JGA,
Amaral LRd, Gomes MdS, Bertarini PLL,
Brito-de-Sousa JP, Costa-Rocha IAd,
Campi-Azevedo AC,
Peruhype-Magalhães V,
Teixeira-Carvalho A, Zaconeta AM,
Soares AAdSM, Valim V, Gomes CM,
de Albuquerque CP, Martins-Filho OA and
da Mota LMH (2023) Panoramic snapshot
of serum soluble mediator interplay in
pregnant women with convalescent
COVID-19: an exploratory study.
Front. Immunol. 14:1176898.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1176898Panoramic snapshot of serum
soluble mediator interplay in
pregnant women with
convalescent COVID-19:
an exploratory studyGeraldo Magela Fernandes^{1*†},
Lizandra Moura Paravidine Sasaki^{1,2†},
Gabriela Profírio Jardim-Santos¹, Heidi Luise Schulte¹,
Felipe Motta¹, Ângelo Pereira da Silva²,
Aleida Oliveira de Carvalho², Yacara Ribeiro Pereira²,
Caroline de Oliveira Alves³, David Alves de Araújo Júnior²,
Dayde Lane Mendonça-Silva², Karina Nascimento Costa³,
Maria Eduarda Canellas de Castro^{1,2}, Lucas Lauand³,
Rodrigo de Resende Nery³, Rosana Tristão³,
Patricia Shu Kurizky^{1,2}, Otávio de Toledo Nóbrega¹,
Laila Salmen Espindola¹, Luiz Cláudio Gonçalves de Castro^{1,3},
Patrícia Nessralla Alpoim⁴, Lara Carvalho Godoi⁴,
Luci Maria Sant Ana Dusse⁴,
Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis⁵,
Laurence Rodrigues do Amaral⁶, Matheus de Souza Gomes⁶,
Pedro Luiz Lima Bertarini⁶, Joaquim Pedro Brito-de-Sousa⁷,
Ismael Artur da Costa-Rocha⁷, Ana Carolina Campi-Azevedo⁷,
Vanessa Peruhype-Magalhães⁷, Andrea Teixeira-Carvalho⁷,
Alberto Moreno Zaconeta^{3†},
Alexandre Anderson de Sousa Munhoz Soares^{1,3},
Valéria Valim^{8,9}, Ciro Martins Gomes^{1,3,10},
Cleandro Pires de Albuquerque^{1,2}, Olindo Assis Martins-Filho^{7*†}
and Licia Maria Henrique da Mota^{1,2,10†}¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Brazil, ²Hospital Universitário de Brasília, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Brazil, ³Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Brazil, ⁴Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁵Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁶Laboratório de Bioinformática e Análises Moleculares, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, Brazil, ⁷Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Minas), Belo Horizonte, Brazil, ⁸Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes, Universidade Federal do Espírito Santo (HUCAM-UFES), Vitória, Brazil, ⁹Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva (PPGSC), Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil, ¹⁰Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Brazil

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

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

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

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

KEYWORDS

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

1 Introduction

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

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

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

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

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

2 Materials and methods

2.1 Study population

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

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

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

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

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

TABLE 1 Demographic and clinical features of the study population.

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

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

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

2.2 Biological samples

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

2.3 Quantification of serum soluble mediators

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

2.4 Statistical analysis

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

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

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

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

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

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

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

3 Results

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

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

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

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

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

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

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

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

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

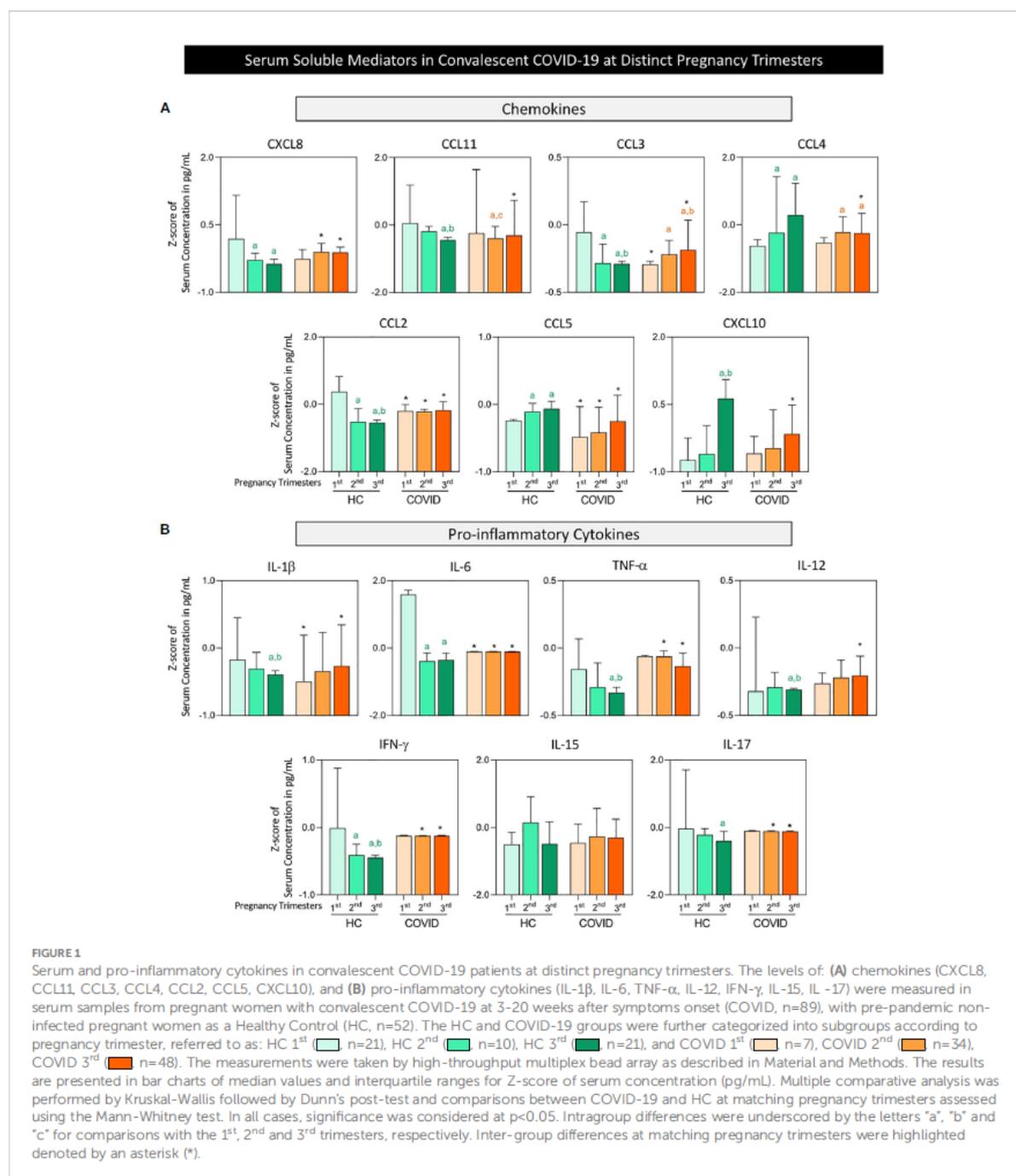
On the other hand, the proportion of pregnant women with convalescent COVID-19 presenting high serum soluble mediator levels progressively increased from the 1st to the 3rd pregnancy trimester (Figure 3A). Heatmap constructs further illustrated that the major increase in serum soluble mediators observed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

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

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

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

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

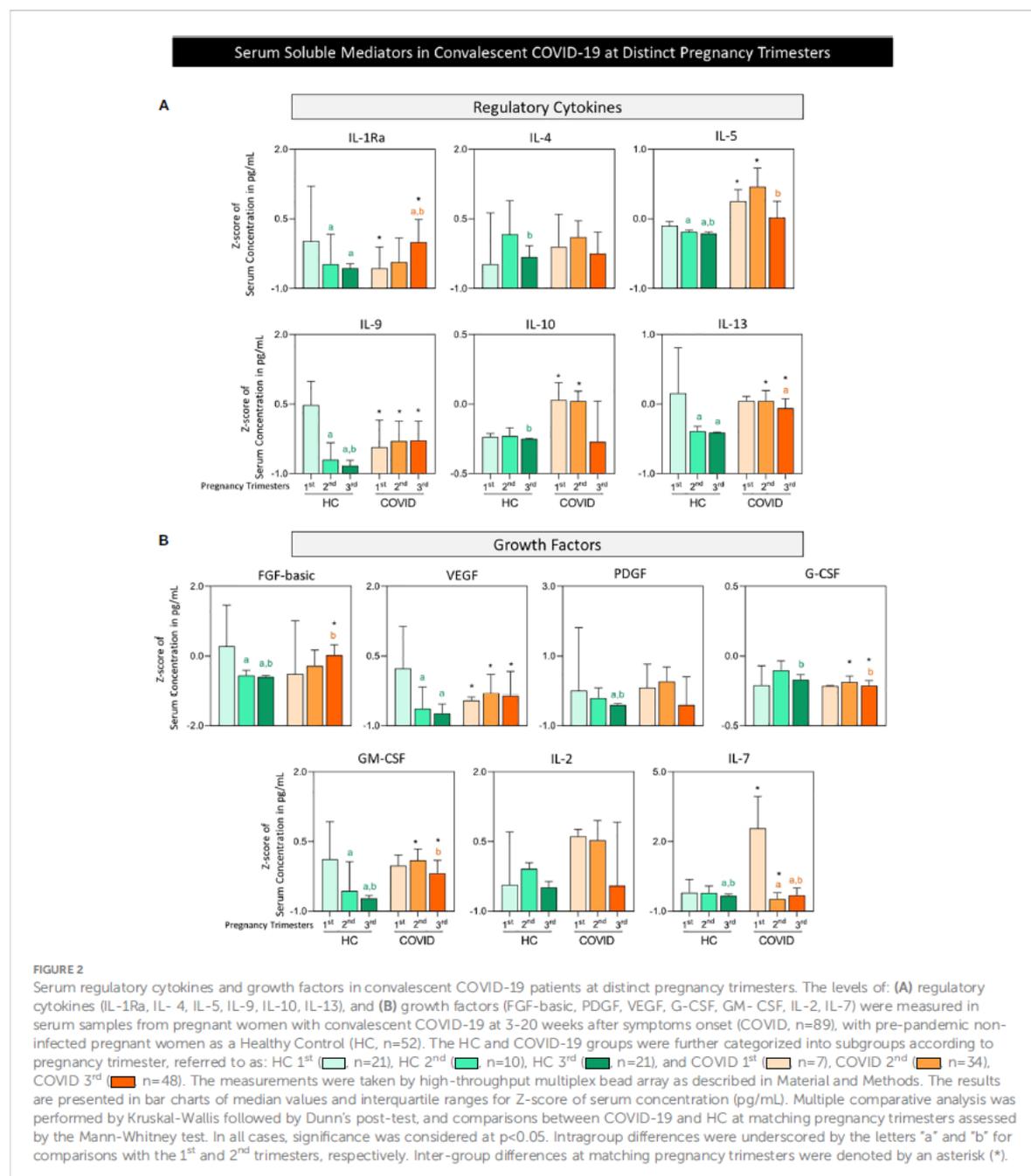


based on the overall correlation between pairs of molecules. The results are presented in **Figure 4**.

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

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

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



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

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

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

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

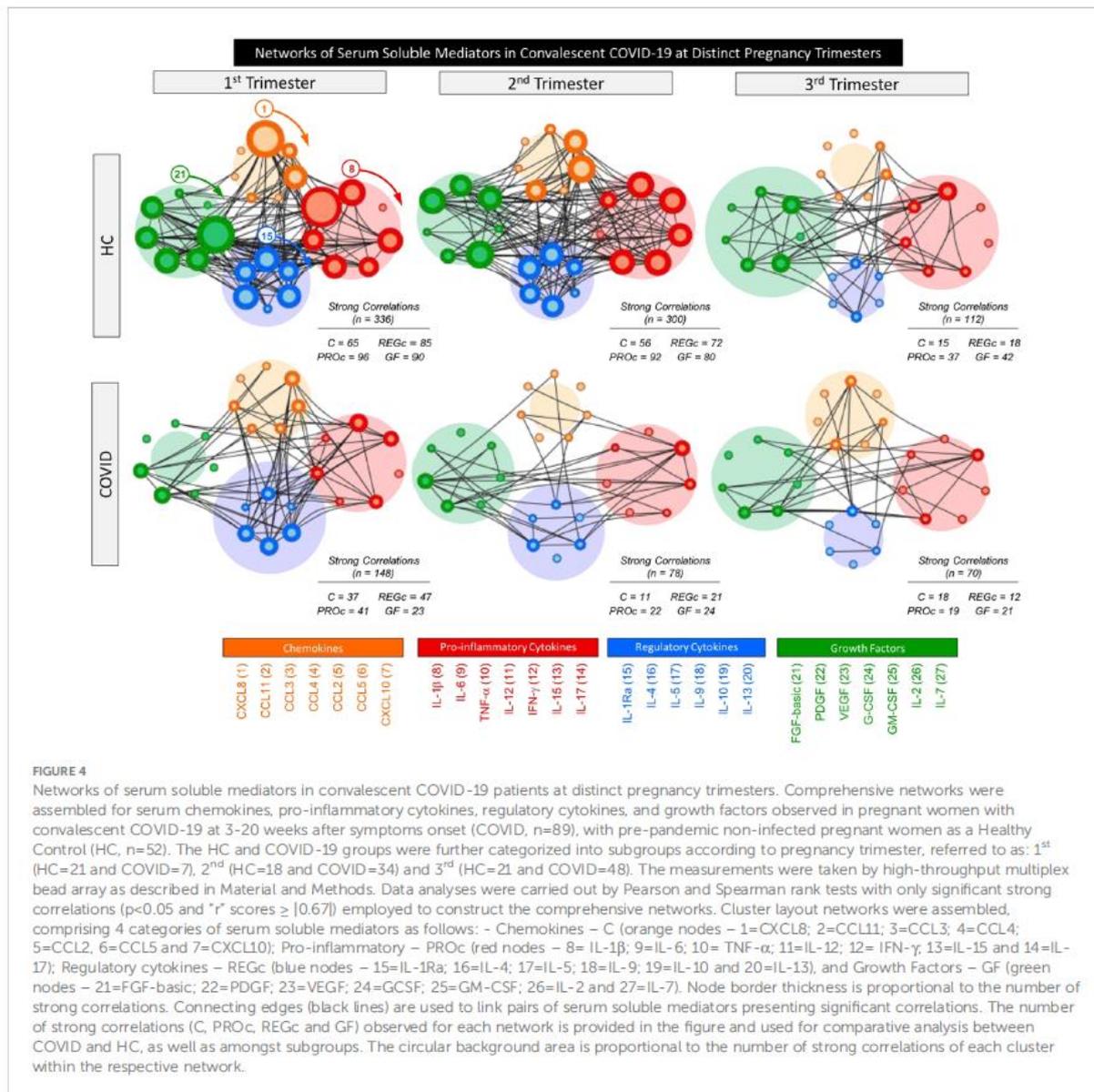


performed to identify the set of biomarkers with preserved (common), lost or acquired (selective) attributes with five or more (≥ 5) strong correlations in COVID subgroups as compared to the trimester-matching HC group. The results are presented in the Figure 5.

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

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

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



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

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

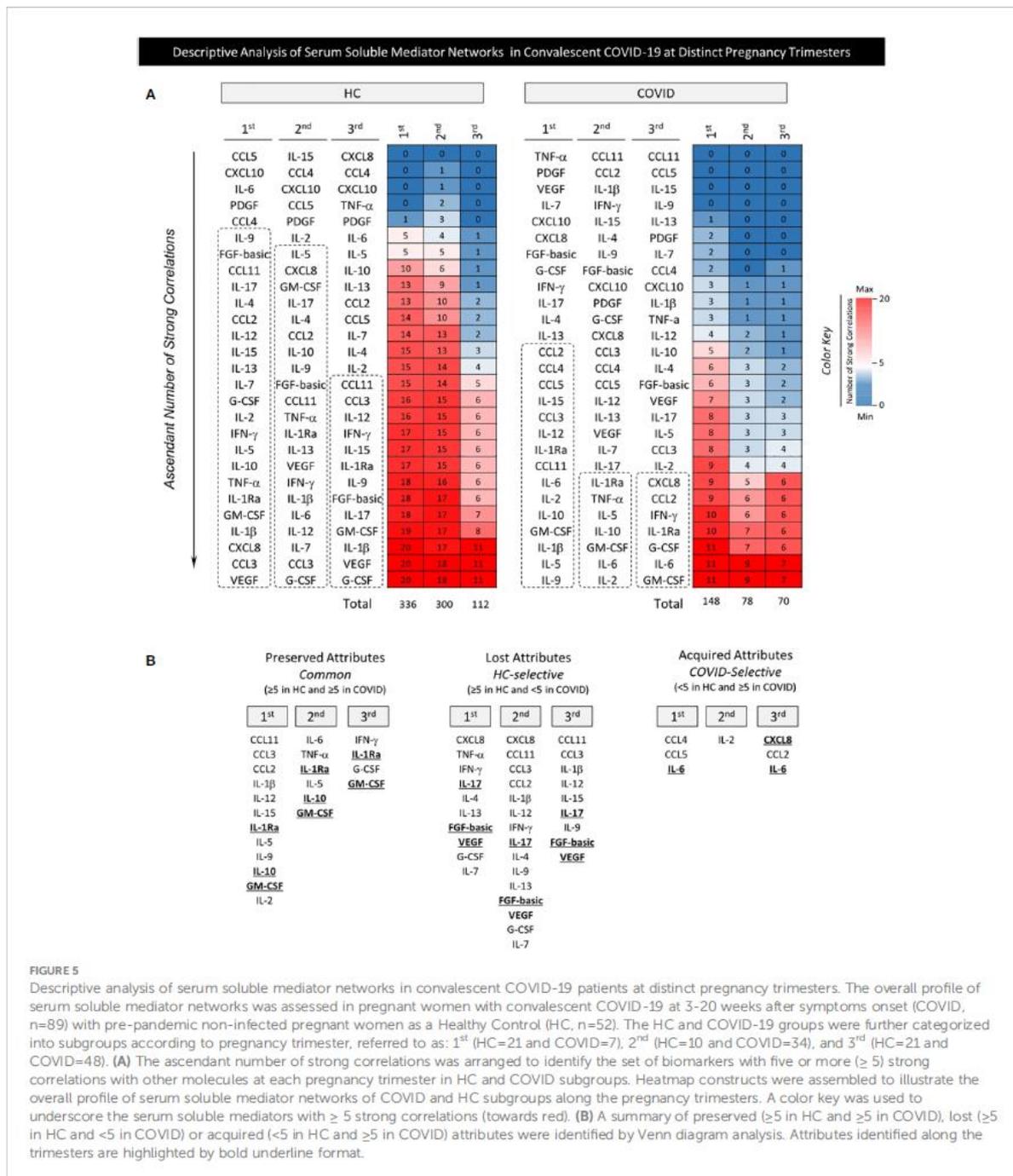


FIGURE 5
Descriptive analysis of serum soluble mediator networks in convalescent COVID-19 patients at distinct pregnancy trimesters. The overall profile of serum soluble mediator networks was assessed in pregnant women with convalescent COVID-19 at 3-20 weeks after symptoms onset (COVID, n=89) with pre-pandemic non-infected pregnant women as a Healthy Control (HC, n=52). The HC and COVID-19 groups were further categorized into subgroups according to pregnancy trimester, referred to as: 1st (HC=21 and COVID=7), 2nd (HC=10 and COVID=34), and 3rd (HC=21 and COVID=48). (A) The ascendant number of strong correlations was arranged to identify the set of biomarkers with five or more (≥ 5) strong correlations with other molecules at each pregnancy trimester in HC and COVID subgroups. Heatmap constructs were assembled to illustrate the overall profile of serum soluble mediator networks of COVID and HC subgroups along the pregnancy trimesters. A color key was used to underscore the serum soluble mediators with ≥ 5 strong correlations (towards red). (B) A summary of preserved (≥5 in HC and ≥5 in COVID), lost (≥5 in HC and <5 in COVID) or acquired (<5 in HC and ≥5 in COVID) attributes were identified by Venn diagram analysis. Attributes identified along the trimesters are highlighted by bold underline format.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Data availability statement

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

Ethics statement

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

Author contributions

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

Funding

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

Acknowledgments

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

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

Conflict of interest

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

Publisher's note

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

Supplementary material

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

References

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

20. Chen G, Zhang Y, Zhang Y, Ai J, Yang B, Cui M, et al. Differential immune responses in pregnant patients recovered from COVID-19. *Signal Transduct Target Ther* (2021) 6(1):289. doi: 10.1038/s41392-021-00703-3
21. Mullins E, Perry A, Banerjee J, Townson J, Grozeva D, Milton R, et al. Pregnancy and neonatal outcomes of COVID-19: The PAN-COVID study. *Eur J Obstetrics Gynecol Reprod Biol* (2022) 276:161–7. doi: 10.1016/j.ejogrb.2022.07.010
22. Jarmund AH, Giskeødegård GF, Ryssdal M, Steinkjer B, Stokkeland LMT, Madsen TS, et al. Cytokine patterns in maternal serum from first trimester to term and beyond. *Front Immunol* (2021) 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.752660
23. Azizieh F, Dingle K, Raghupathy R, Johnson K, VanderPlas J, Ansari A. Multivariate analysis of cytokine profiles in pregnancy complications. *Am J Reprod Immunol* (2018) 79(3):e12818. doi: 10.1111/aji.12818
24. Tartaglia E, Bordoni V, Oliva A, Vergori A, Girardi E, Antinori A, et al. T Helper profile in pregnant women recovered from COVID-19. *J Reprod Immunol* (2022) 153:103661. doi: 10.1016/j.jri.2022.103661
25. Subha M, Pal P, Pal GK, Habeebullah S, Adithan C, Sridhar MG. Decreased baroreflex sensitivity is linked to sympathovagal imbalance, low-grade inflammation, and oxidative stress in pregnancy-induced hypertension. *Clin Exp Hypertens* (2016) 38(8):666–72. doi: 10.1080/10641963.2016.1200596
26. Blackmore ER, Moynihan JA, Rubinow DR, Pressman EK, Gilchrist M, O'Connor TG. Psychiatric symptoms and proinflammatory cytokines in pregnancy. *Psychosom Med* (2011) 73(8):656–63. doi: 10.1097/PSY.0b013e31822fc277
27. Simavli S, Derbent AU, Uysal S, Turhan NÖ. Hepcidin, iron status, and inflammation variables among healthy pregnant women in the Turkish population. *J Maternal-Fetal Neonatal Med* (2014) 27(1):75–9. doi: 10.3109/14767058.2013.804054
28. Björkander S, Bremme K, Persson JO, van Vollenhoven RF, Sverre-remark-Ekström E, Holmlund U. Pregnancy-associated inflammatory markers are elevated in pregnant women with systemic lupus erythematosus. *Cytokine* (2012) 59(2):392–9. doi: 10.1016/j.cyt.2012.04.046
29. Lindsay K, Buss C, Wadhwa P, Entringer S. Maternal stress potentiates the effect of an inflammatory diet in pregnancy on maternal concentrations of tumor necrosis factor alpha. *Nutrients* (2018) 10(9):1252. doi: 10.3390/nu10091252
30. Olimpia SS, Magdalena P, Tomasz P, Piotr W, Elzbieta RW. Changes in the concentration of sHLA-I and selected cytokines in pregnancy complicated by antiphospholipid syndrome. *Ginekol Pol* (2011) 82(5):354–8. doi: 10.3390/nu10091252
31. Stokkeland LMT, Giskeødegård GF, Stridsklev S, Ryan L, Steinkjer B, Tangerås LH, et al. Serum cytokine patterns in first half of pregnancy. *Cytokine* (2019) 119:188–96. doi: 10.1016/j.cyt.2019.03.013
32. Doria A, Cutolo M, Ghirardello A, Zen M, Villalta D, Tincani A, et al. Effect of pregnancy on serum cytokines in SLE patients. *Arthritis Res Ther* (2012) 14(2):R66. doi: 10.1186/ar3782
33. Iaccarino L, Ghirardello A, Zen M, Villalta D, Tincani A, Punzi L, et al. Polarization of TH2 response is decreased during pregnancy in systemic lupus erythematosus. *Reumatismo* (2012) 64(5):314–20. doi: 10.4081/reumatismo.2012.314
34. Yockey LJ, Iwasaki A. Interferons and proinflammatory cytokines in pregnancy and fetal development. *Immunity* (2018) 49(3):397–412. doi: 10.1016/j.immuni.2018.07.017
35. Vilotić A, Nacka-Aleksić M, Pirković A, Bojić-Trbojević Ž, Dekanski D, Jovanović Krivokuća M. IL-6 and IL-8: An overview of their roles in healthy and pathological pregnancies. *Int J Mol Sci* (2022) 23(23):14574. doi: 10.3390/ijms232314574
36. Nayak M, Peinhaupt M, Heinemann A, Eekhoff MEW, van Mechelen W, Desoye G, et al. Sedentary behavior in obese pregnant women is associated with inflammatory markers and lipid profile but not with glucose metabolism. *Cytokine* (2016) 88:91–8. doi: 10.1016/j.cyt.2016.08.031
37. Ross KM, Miller G, Culhane J, Grobman W, Simhan HN, Wadhwa PD, et al. Patterns of peripheral cytokine expression during pregnancy in two cohorts and associations with inflammatory markers in cord blood. *Am J Reprod Immunol* (2016) 76(5):406–14. doi: 10.1111/aji.12563
38. Wilkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin Infect Dis* (2002) 34(2):204–9. doi: 10.1086/338261
39. Steinkasserer A, Spurr NK, Cox S, Jeggo P, Sim RB. The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 alpha and IL-1 beta loci. *Genomics* (1992) 13(3):654–7. doi: 10.1016/0888-7543(92)90137-H
40. Simón C, Valbuena D, Krüssel J, Bernal A, Murphy CR, Shaw T, et al. Interleukin-1 receptor antagonist prevents embryonic implantation by a direct effect on the endometrial epithelium. *Fertil Steril* (1998) 70(5):896–906. doi: 10.1016/S0015-0282(98)00275-1
41. Kimya Y, Akdiş C, Cengiz C, Ozan H, Tatlikazan S, Uncu G, et al. Plasma interleukin-1alpha, interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist levels in pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (1997) 73(1):17–21. doi: 10.1016/S0301-2115(97)02698-5
42. Bowen JM, Chamley L, Mitchell MD, Keelan JA. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women. *Placenta* (2002) 23(4):239–56. doi: 10.1053/plac.2001.0781
43. Numasaki M, Lotze MT, Sasaki H. Interleukin-17 augments tumor necrosis factor-alpha-induced elaboration of proangiogenic factors from fibroblasts. *Immunol Lett* (2004) 93(1):39–43. doi: 10.1016/j.imlet.2004.01.014
44. Numasaki M, Takahashi H, Tomioka Y, Sasaki H. Regulatory roles of IL-17 and IL-17F in G-CSF production by lung microvascular endothelial cells stimulated with IL-1beta and/or TNF-alpha. *Immunol Lett* (2004) 95(1):97–104. doi: 10.1016/j.imlet.2004.06.010
45. Numasaki M. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* (2003) 101(7):2620–7. doi: 10.1182/blood-2002-05-1461
46. Takahashi H, Numasaki M, Lotze MT, Sasaki H. Interleukin-17 enhances bFGF-, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells. *Immunol Lett* (2005) 98(2):189–93. doi: 10.1016/j.imlet.2004.11.012
47. Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, Takahashi H, Nakamura A, McAllister F, et al. IL-17 enhances the net angiogenic activity and *In vivo* growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-Dependent angiogenesis. *J Immunol* (2005) 175(9):6177–89. doi: 10.4049/jimmunol.175.9.6177
48. Cornelius DC, Lamarca B. TH17- and IL-17- mediated autoantibodies and placental oxidative stress play a role in the pathophysiology of pre-eclampsia. *Minerva Ginecol* (2014) 66(3):243–9. doi: 10.4049/jimmunol.175.9.6177
49. Pinheiro MB, Martins-Filho OA, Mota 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) 62(1):165–73. doi: 10.1016/j.cyt.2013.02.027
50. Liu H, Liu A, Kaminga AC, McDonald J, Wen SW, Pan X. Chemokines in gestational diabetes mellitus. *Front Immunol* (2022) 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.705852
51. de Freitas NPA, Carvalho TR, Gonçalves CCRA, da Silva PHA, de Melo Romão LG, Kwak-Kim J, et al. The dietary inflammatory index as a predictor of pregnancy outcomes: Systematic review and meta-analysis. *J Reprod Immunol* (2022) 152:103651. doi: 10.1016/j.jri.2022.103651

COPYRIGHT

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

ANEXO A – Parecer do CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

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

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 32359620.0.0000.5558

Instituição Proponente: EMPRESA BRASILEIRA DE SERVICOS HOSPITALARES - EBSEH

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

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

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 32359620.0.0000.5558

Instituição Proponente: EMPRESA BRASILEIRA DE SERVICOS HOSPITALARES - EBSEH

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:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

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



Continuação do Parecer: 4.055.854

observações elencadas.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1556469.pdf	25/05/2020 14:40:33		Aceito
Cronograma	Cronograma_Proudest.docx	25/05/2020 14:28:52	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	25/05/2020 14:26:43	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.docx	25/05/2020 14:24:27	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_pesquisadores.pdf	25/05/2020 14:20:01	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	resumo_estruturado.docx	25/05/2020 14:16:59	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	12_Termo_de_responsabilidade.docx	25/05/2020 14:15:06	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Zaconeta.pdf	25/05/2020 14:07:51	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores		25/05/2020 14:07:41	GERALDO MAGELA FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores		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		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		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

ANEXO B – FICHA CLÍNICA


PROUDEST

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


7. APÊNDICES E ANEXOS

APÊNDICE 1|

PLANILHA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	
Data / /	
Nome:	
Prontuário:	DN: / /
Telefones:	
Estado civil: Casada () Solteira () União estável () Separada / divorciada ()	
Ocupação:	
Idade gestacional: sem dias G P A	Altura: Peso:
Diagnóstico de COVID-19 realizado por	
<input type="checkbox"/> RT-PCR, sorologia ou teste rápido realizado em pessoa assintomática <input type="checkbox"/> RT-PCR, sorologia ou teste rápido realizado em pessoa com sintomas <input type="checkbox"/> quadro clínico altamente suspeito sem exames diagnósticos disponíveis ou com resultado em andamento	
Para pacientes sintomáticos	
Data de início dos sintomas:	
Sintomas apresentados: Febre <input type="checkbox"/> Tosse () Falta de ar () Dor de garganta () Dor no corpo () Congestão nasal ou coriza <input type="checkbox"/> Diarreia () Outros (descreva)	
Data de internação hospitalar: <input type="checkbox"/> não houve internação hospitalar	
Doença pré-existente: <input type="checkbox"/> Sim () Não	
Se sim: Qual?	
Doenças diagnosticada durante a gestação: <input type="checkbox"/> Sim () Não	
Se sim: Qual?	
Presença de TORSCH diagnosticada no pré-natal: <input type="checkbox"/> Sim () Não	
Se sim: Qual?	
Uso de medicamento durante a gestação: <input type="checkbox"/> Sim () Não	
Se sim: Qual?	
Resumo do quadro clínico e evolução até o presente	



PROUDEST

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



PLANILHA DE SEGUIMENTO AMBULATORIAL DA GESTANTE COVID 19 NO PRÉ-NATAL			
Data da consulta: / /			
Nome:			
Prontuário:		DN: / /	
Telefones:			
IG: <u> </u> sem <u> </u> dias	G	P	A
Altura:			
Doença pré-existente: (<u> </u>) Sim (<u> </u>) Não			
Se sim: Qual?			
Doença diagnosticada durante a gestação: (<u> </u>) Sim (<u> </u>) Não			
Se sim: Qual?			
Presença de TORSCH diagnosticada no pré-natal: (<u> </u>) Sim (<u> </u>) Não			
Se sim: Qual?			
Uso de medicamento durante a gestação: (<u> </u>) Sim (<u> </u>) Não			
Se sim: Qual?			
Cultura para estreptococo positiva na gestação: (<u> </u>) Sim (<u> </u>) Não (<u> </u>) Não realizada			
Apresentou internação hospitalar durante esta gestação: (<u> </u>) Sim (<u> </u>) Não			
Se sim: Qual causa? Quando?			
Queixas clínicas:			
<p>Apresentou algum destes sintomas abaixo desde a última consulta:</p> <p>(<u> </u>) Febre (<u> </u>) Falta de ar (<u> </u>) Dor de garganta (<u> </u>) Tosse (<u> </u>) Coriza (<u> </u>) Cansaço</p> <p>(<u> </u>) Perda de olfato (<u> </u>) Perda de paladar (<u> </u>) Mialgia (<u> </u>) Diarreia</p> <p>(<u> </u>) Outros sintomas gripais: Quais:</p>			
Exame físico:			
AU			
BCF			
PA			
Peso			
Exame ginecológico (se necessário)			
Ecografia obstétrica:			
Data:			
Achados relevantes quanto á morfologia fetal, placentária ou volume de líquido amniótico? (descreva).			
Crescimento fetal: adequado (<u> </u>) <u> </u> atrasado (<u> </u>). Percentil de crescimento:			
Dopplerfluxometria: (<u> </u>) Normal (<u> </u>) Alterada. (descreva).			
Ecocardiograma fetal realizado: (<u> </u>) Sim (<u> </u>) Não			
Se sim: (<u> </u>) Normal (<u> </u>) Alterado. Qual alteração?			
Conduta:			



PROUDEST

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



FICHA DE COLETA DE DADOS - PARTO E PUERPÉRIO IMEDIATO

IDENTIFICAÇÃO GESTANTE COVID-19 POSITIVA

Prontuário:	Nome:
DN: / /	Telefones:
IG: sem dias	Endereço:
G P A	
Doença pré-existente: <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não Se sim: Qual?	
Doença diagnosticada durante a gestação: <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não Se sim: Qual?	
Presença de TORSCH diagnosticada no pré-natal: <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não Se sim: Qual?	
Internação durante a gestação: <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não Se sim: Qual causa?	
Uso de medicamento durante a gestação: <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não Se sim: Qual?	
Cultura de estreptococo positiva na gestação: <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não () Não realizada	
DURANTE INTERNAÇÃO NO CENTRO OBSTÉTRICO	
Indicação da internação:	
Ruptura prematura de membranas: <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não Se sim, por quanto tempo até o parto?	
Sintomas gripais durante a internação: <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não Se sim: Quais sintomas: <input checked="" type="checkbox"/> Febre () Falta de ar () Dor de garganta () Tosse () Coriza () Cansaço () Perda de olfato () Perda de paladar () Mialgia () Diarreia <input checked="" type="checkbox"/> Outros sintomas: Quais:	
Síndrome respiratória presente na internação: <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não Frequência respiratória máxima: <u>imm</u>	
Trabalho de parto: <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não	
Intercorrência no trabalho de parto: <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não Se sim: Qual?	
Indução do parto: <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não	
Tipo de parto: <input checked="" type="checkbox"/> Normal () Cesárea Indicação da cesárea:	
Intercorrências no parto: <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não Se sim: Qual?	
Contato pele a pele realizado: <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não	
Clampamento imediato do cordão: <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não	
Amamentação na primeira hora de vida: <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não	
Intercorrência no pós-parto: <input checked="" type="checkbox"/> Sim () Não Se sim: Qual?	



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: <u>sem</u> dias		Antropometria: P: <u> </u> g E: <u> </u> cm PC: <u> </u> cm					
SALA DE PARTO							
APGAR 1º <input type="checkbox"/> 5º <input type="checkbox"/> 10º <input type="checkbox"/>		Classificação: <input type="checkbox"/> Termo <input type="checkbox"/> Pretermo <input type="checkbox"/> Pós-termo <input type="checkbox"/> PIG <input type="checkbox"/> AIG <input type="checkbox"/> GIG					
EXAME FÍSICO							
Fácies:		<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 <u> </u> dias [Não Invasiva: <u> </u> dias/VM:							
Ecocárdio:		<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		Oxim: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Alterado					
EOA: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Alterado		Pezinho: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Alterado					
Aleitamento na Alta: <input type="checkbox"/> SME <input type="checkbox"/> Misto <input type="checkbox"/> Fórmula							
MONITORAMENTO AUDITIVO							
PEATE automático: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Alterado							
LABORATORIAL							
Leuc.	N/T	I/T	Plaq.	DHL	PCR	FAL	Procalcit.
TGO	TGP	Ferritina	IL-6	IL-10	Covid1	Covid2	Covid3
EXAME DE IMAGEM							
RNM: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Alterado							
ANATOMO PATOLÓGICO DA PLACENTA							
Laudo: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Alterado							



PROUDEST

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



PLANILHA DE SEGUIMENTO AMBULATORIAL DA CRIANÇA					
Prontuário:		Data da consulta: / /			
Identificação					
Nome:		Sexo: <input type="checkbox"/> F () M () I			
Data de Nasc: / /		Nome da mãe:			
IDADE NA CONSULTA					
<input type="checkbox"/> 1 mês () 2 meses () 4 meses () 6 meses () 9 meses () 12 meses <input type="checkbox"/> 18 meses () 24 meses () 30 meses () 36 meses () 42 meses <input type="checkbox"/> 48 meses () 54 meses () 60 meses					
ANTROPOMETRIA					
Peso: ___ Kg	Z-score: ___	Est: ___ cm	Z-score: ___	PC: cm	Z-score: ___
EXAME FÍSICO					
Cabeça/Pescoço: <input type="checkbox"/> Normal () Alterado _____					
Pele: <input type="checkbox"/> Normal () Xerodermia () Outro _____					
ACV: <input type="checkbox"/> Normal () Alterado _____		AR: () Normal () Alterado _____			
ABD: <input type="checkbox"/> Normal () Alterado _____		Genital: G M P			
Musc. Esq: <input type="checkbox"/> Normal () Alterado _____		Neuro: () Normal () Alterado _____			
DIAGNÓSTICOS					
Nutricional		<input type="checkbox"/> Adequado		<input type="checkbox"/> Inadequado	
Crescimento	Peso	<input type="checkbox"/> Obesidade		<input type="checkbox"/> Sobrepeso	
		<input type="checkbox"/> Eutrófico		<input type="checkbox"/> Desnutrido	
	Estatura	<input type="checkbox"/> Alta Estatura			
		<input type="checkbox"/> Normal			
		<input type="checkbox"/> Baixa Estatura			
Perímetro Cefálico	<input type="checkbox"/> Macrocefálico				
	<input type="checkbox"/> Normal				
	<input type="checkbox"/> Microcefálico				
Desenvolvimento (Bayley-III)	Motor	Score: _____			
	Cognitivo	Score: _____			
	Linguagem	Score: _____			
	Adaptativo	Score: _____			
	Socio-emocional	Score: _____			
Vacinal		<input type="checkbox"/> Adequado		<input type="checkbox"/> Atrasado	
Clínico	<input type="checkbox"/> Saudável		<input type="checkbox"/> Rinite		<input type="checkbox"/> Broncoespasmo
	<input type="checkbox"/> DRGE		<input type="checkbox"/> Dermatite		<input type="checkbox"/> APLV
	<input type="checkbox"/> Anemia		<input type="checkbox"/> Bebê chiador		<input type="checkbox"/> Outro _____
USO DE MEDICAÇÕES					
<input type="checkbox"/> Ferro () Polivitamínico () Fósforo () Antiácido () Procinético () Laxativo					
<input type="checkbox"/> B2 de longa () B2 de curta () Corticóide () Outros _____					
INTERCORRENCIAS					
<input type="checkbox"/> Ida ao PS () Internação () IVAS () Uso de ATB					
<input type="checkbox"/> Uso de Medicação Contínua () Outros _____					
MONIT. AUDITIVO AMBULATORIAL <u>PEATE</u> : () Normal () Alterado					
EXAMES LABORATORIAIS <input type="checkbox"/> 12 meses () 24 meses					
glicemia	insulina	colesterol total e frações	triglicédeos	TSH	T4 livre

ANEXO C - TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “PREGNANCY OUTCOME AND CHILD DEVELOPMENT EFFECTS OF SARS-COV-2 INFECTION TRIAL”, que significa “Estudo do impacto da infecção pelo novo coronavírus na gestação e desenvolvimento de crianças” que está sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. LÍCIA MARIA HENRIQUE DA MOTA, Universidade de Brasília. Também participam deste estudo outros pesquisadores, na qualidade de Coordenadores: Dra. LIZANDRA MOURA PARAVIDINE SASAKI, Hospital Universitário de Brasília, e Dr. Geraldo Magela Fernandes, Universidade de Brasília.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com os responsáveis por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e 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 SARS-CoV-2 ainda é muito recente e se sabe muito pouco de sua influência na saúde das gestantes e nos filhos de mães que foram contaminadas durante a gestação. Para participar será necessário, após a leitura e assinatura deste documento, que você faça o seu pré-natal no Hospital Universitário de Brasília (HUB) ou nos serviços supervisionados pela pesquisa e posteriormente leve o seu filho para o seguimento do crescimento e desenvolvimento no Ambulatório do HUB ou nos serviços supervisionados. Os procedimentos do estudo – coletas de informações relativas à sua saúde,

exames laboratoriais, exames radiológicos, coleta de sangue – não são diferentes daqueles que você faria no pré-natal e na avaliação do Crescimento e Desenvolvimento do seu filho.

- **Período de participação no estudo:** após a primeira avaliação, você deverá retornar para as consultas de pré-natal conforme a rotina habitual, ou seja, mensalmente até a 34ª semana de gestação, quinzenalmente até a 36ª semana e semanalmente até o parto. As consultas do seguimento da criança ocorrerão da mesma como orienta o Ministério da Saúde: 1º, 2º, 4º, 6º, 9º e 12º mês no primeiro ano de vida e após 1 ano, de 6 em 6 meses, até completar 5 anos de idade.
- **Riscos para o voluntário da pesquisa:** algumas gestantes podem ter vergonha ou medo de preconceito por terem adquirido a COVID-19. Para evitar isso, criamos um ambulatório de pré-natal especialmente para as participantes deste estudo, além de garantirmos que todos os dados serão tratados em segredo. A coleta de sangue para exames laboratoriais será realizada em uma veia do seu braço, com agulha e seringa esterilizadas, mas pode haver o risco de equimose (mancha roxa) ou sangramento local. Para reduzir esse risco, a coleta será realizada por uma pessoa com experiência. Além do sangue, a placenta e o sangue do cordão umbilical também serão encaminhados para estudos no laboratório. Caso você ou seu bebê precisem fazer uma anestesia ou punção na coluna por outro motivo, o líquido também será estudado. No caso da criança ela será submetida a uma ressonância magnética de crânio ainda na maternidade, o exame é indolor, será realizado com a criança dormindo, não será realizado se for necessária sedação. Não serão solicitados exames de sangue da criança que forem diferentes da rotina clínica habitual, exceto para pesquisa da presença do SARS-CoV-2 ou anticorpos relacionados 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).
- **Benefícios para o voluntário da pesquisa:** o primeiro benefício deste estudo não é apenas para você, mas para toda a sociedade, pois permitirá que os médicos e gestores de saúde entendam melhor a doença e possam tratar melhor outras gestantes infectadas, assim como seus filhos. Outro benefício é que as participantes deste estudo que assim o desejarem terão todas as consultas de pré-natal, exames laboratoriais e ecografias realizadas no Hospital Universitário de Brasília, onde também poderão ter o parto. Igualmente, caso você participe do estudo, o seu

filho poderá fazer todas as consultas de acompanhamento pediátrico no HUB.

- Sobre armazenamento e utilização de material biológico: o sangue que será coletado no seu braço, o sangue do cordão umbilical, o sangue da criança e a placenta servirão para que seja confirmado que você foi infectado pelo novo coronavírus, mas também pode ser utilizado para outros estudos, caso apareçam novas informações e que necessitem ser avaliadas. Ao assinar este documento você concorda que o seu sangue seja guardado e estudado em um outro momento. No entanto, mesmo assinando agora, você poderá voltar atrás a qualquer momento, retirando a autorização.
- Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais (secretas) e serão repassadas apenas em reuniões ou publicações científicas, sem identificar as pessoas. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas e no computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço acima informado, pelo período mínimo de 5 anos.
- A Sra. poderá solicitar, se assim quiser, o relatório final da pesquisa. Também, cópias de todos os resultados dos exames complementares realizados nesta pesquisa poderão ser solicitadas ao pesquisador.
- Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte). Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa do HUB-UnB no endereço: Setor de Grandes Áreas Norte 605 - Asa Norte, Brasília - DF, 70840-901.

Afirmo que recebi uma via deste termo de consentimento para ler antes de assiná-lo, que os detalhes do projeto foram explicados e que manterei uma cópia deste consentimento em meu poder.

Assinatura do participante ou representante

Assinatura do Pesquisador

Local

Data