

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

LETICIA GILBERD

CARACTERIZAÇÃO DE LESÕES E DE BIOMARCADORES DA IMUNIDADE  
INATA EM PLACENTAS EXPOSTAS AO SARS-COV-2

Belo Horizonte

2024

LETICIA GILBERD

CARACTERIZAÇÃO DE LESÕES E DE BIOMARCADORES DA IMUNIDADE  
INATA EM PLACENTAS EXPOSTAS AO SARS-COV-2

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Área de concentração em patologia investigativa.

Orientador: Prof. Marcelo Antônio Pascoal Xavier.

Belo Horizonte

2024

043

Gilberd, Leticia.

Caracterização de lesões e de biomarcadores da imunidade inata em placentas expostas ao SARS-CoV-2 [manuscrito] / Leticia Gilberd. – 2024.  
69 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Marcelo Antônio Pascoal Xavier.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Covid-19. 3. Betacoronavirus. 4. Placenta. 5. Inflamação. 6. Inflamassomos. I. Xavier, Marcelo Antônio Pascoal. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 616

# DECLARAÇÃO DE DEFESA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG - ICB/UFMG

*“Caracterização de lesões e biomarcadores da imunidade inata em placentas expostas ao SARS-CoV-2”*

**LETÍCIA GILBERD**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de **Pós-Graduação em Patologia**, como requisito para obtenção do grau de **Mestre em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 19 de dezembro de 2024, pela banca constituída pelos membros:

**Prof. Dr. Enrrico Bloise – ICB/UFMG**

**Profa. Dra. Paula Piedade Garcia – FM/UFMG**

**Profa. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal – FM/UFMG**

**Prof. Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier - FM/UFMG - ORIENTADOR**

**Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2024.**



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Antonio Pascoal Xavier, Professor do Magistério Superior**, em 16/01/2025, às 07:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Enrrico Bloise, Professor do Magistério Superior**, em 16/01/2025, às 10:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Piedade Garcia, Professora do Magistério Superior**, em 16/01/2025, às 20:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Vieira Teixeira Vidigal, Membro**, em 17/01/2025, às 13:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3829322** e o código CRC **0D0F6F2A**.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e aos meus pais Meyer (*in memorian*) e Ediléia que sempre acreditaram e incentivaram cada passo que trilhei até aqui, meu amor e gratidão eternos.

À meu irmão Wolf e minha avó Glícia por todo amor e apoio, mesmo distantes.

Ao meu noivo Pedro por ser meu companheiro na vida, por estar comigo nos bons e maus momentos e por todo amor, sendo fundamental nesta conquista. Te amo.

Aos meus sogros pelo carinho e amparo sempre.

Ao meu orientador Marcelo por todo o suporte e encorajamento para a realização deste projeto, pelo convite, pela paciência e pela generosidade.

A todos os mestres que tive ao longo desses três anos de aprendizado na anatomia patológica, aos professores da graduação e da pós-graduação da UFMG, aos preceptores da residência e aos patologistas dos laboratórios que estagiei, gratidão por todo o conhecimento.

Aos amigos e colegas que fiz na residência médica de patologia da UFMG que tornaram meus desafios mais leves e os momentos de aprendizados mais ricos.

A todos que participaram do suporte técnico, sendo fundamentais para a realização deste feito.

Aos meus amigos, pelas boas energias e por entenderem meus períodos de ausência.

Aos meus gatos Filomena e Sebastião por transmitirem paz e compaixão depois de um dia cansativo.

Por fim agradeço a todos que mesmo não estando citados aqui diretamente, colaboraram na construção desta obra. Concluir esta etapa tão importante representa não apenas o término de um trabalho acadêmico, mas também a consolidação de um sonho que só foi possível graças à colaboração de muitas pessoas.

Muito obrigada!

*Não pergunte: Como vou escalar a montanha, apenas escale a montanha.*

Friedrich W. Nietzsche

## RESUMO

O conhecimento das consequências da infecção causada pelo SARS-CoV-2, a COVID-19, durante a gravidez é relativamente limitado e existe uma necessidade urgente de se compreender melhor as diversas manifestações dessa nova doença ao longo da gravidez, sobretudo impactos sobre a placenta, como a persistência do SARS-CoV-2 e as respostas inflamatórias desencadeadas nas placentas de mães que tiveram COVID-19 durante a gestação. Para contribuir com a redução dessas lacunas no conhecimento da patologia placentária durante a infecção pela COVID-19, esse estudo caracterizou as lesões morfológicas e a expressão dos receptores da imunidade inata RIG-1 e da via do inflamassoma NLRP3 nas placentas de gestantes expostas e não expostas ao SARS-CoV-2 durante a gestação. Foram incluídas amostras de placenta de 31 gestantes no estudo, sendo 15 expostas e com diagnóstico de COVID-19 leve e 16 não expostas, para análises histopatológica e imuno-histoquímica. Os resultados demonstraram ausência do SARS-CoV-2 e ocorrência de alterações degenerativas, como deposição de fibrina e calcificação, em todas as amostras. Comparando-se as características morfológicas das placentas das gestantes expostas versus não expostas ao SARS-CoV-2, foram observadas proporções maiores e estatisticamente não significativas de lesões inflamatórias, como corioamnionite (26,67% versus 12,5%) e vasculite agudas (33,3% versus 12,5%), corroborando para um padrão inflamatório (57,14% versus 42,85%). Em relação à expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores da imunidade inata, foram observadas hiperexpressão do RIG-1 e expressão basal de NLRP3 e IFN- $\gamma$  em todos os compartimentos da placenta, além de predomínios de hiperexpressão dos biomarcadores Caspase-1 e IL-1 $\beta$  e expressão basal de IL-18 no trofoblasto, indicando presença constitutiva do RIG-1 e ativação de Caspase-1 e IL-1 $\beta$  independente do inflamassoma NLRP3. Em conjunto, os resultados demonstram a não persistência do SARS-CoV-2 na placenta e a presença de maiores proporções relativas de lesões inflamatórias não associadas ao inflamassoma NLRP3.

**PALAVRAS-CHAVE:** COVID-19; SARS-CoV-2, Placenta; Inflamação; RIG-1; Inflamassoma NLRP-3.

## ABSTRACT

Knowledge of the consequences of infection caused by SARS-CoV-2, COVID-19, during pregnancy is relatively limited and there is an urgent need to better understand the various manifestations of this new disease throughout pregnancy, especially its impacts on the placenta, such as the persistence of SARS-CoV-2 and the inflammatory responses triggered in the placentas of mothers who had COVID-19 during pregnancy. To contribute to reducing these gaps in knowledge of placental pathology during COVID-19 infection, this study characterized the morphological lesions and the expression of innate immunity receptors RIG-1 and the NLRP3 inflammasome pathway in the placentas of pregnant women exposed and not exposed to SARS-CoV-2 during pregnancy. Placental samples from 31 pregnant women were included in the study, 15 exposed and diagnosed with mild COVID-19 and 16 unexposed, for histopathological and immunohistochemical analyses. The results demonstrated the absence of SARS-CoV-2 and the occurrence of degenerative changes, such as fibrin deposition and calcification, in all samples. Comparing the morphological characteristics of the placentas of pregnant women exposed versus not exposed to SARS-CoV-2, higher and statistically non-significant proportions of inflammatory lesions were observed, such as chorioamnionitis (26.67% versus 12.5%) and acute vasculitis (33.3% versus 12.5%), corroborating an inflammatory pattern (57.14% versus 42.85%). Regarding the immunohistochemical expression of innate immunity biomarkers, hyperexpression of RIG-1 and basal expression of NLRP3 and IFN- $\gamma$  were observed in all compartments of the placenta, in addition to predominance of hyperexpression of the biomarkers Caspase-1 and IL-1 $\beta$  and basal expression of IL-18 in the trophoblast, indicating constitutive presence of RIG-1 and activation of Caspase-1 and IL-1 $\beta$  independent of the NLRP3 inflammasome. Together, the results demonstrate the non-persistence of SARS-CoV-2 in the placenta and the presence of higher relative proportions of inflammatory lesions not associated with the NLRP3 inflammasome.

**KEYWORDS:** COVID-19; SARS-CoV-2, Placenta; Inflammation; RIG-1; NLRP-3 inflammasome.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Estrutura viral do SARS-CoV-2	16
<b>Figura 2</b> - Faces da placenta humana	19
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática da placenta humana e seus estágios de desenvolvimento	21
<b>Figura 4</b> - Lesões histopatológicas não inflamatórias na placenta	36
<b>Figura 5</b> - Expressão imuno-histoquímica de NLRP	40
<b>Figura 6</b> - Expressão imuno-histoquímica de RIG-1	42
<b>Figura 7</b> - Expressão imuno-histoquímica de IFN- $\gamma$	43
<b>Figura 8</b> - Expressão imuno-histoquímica de Caspase-1	44
<b>Figura 9</b> - Expressão imuno-histoquímica de IL-1 $\beta$	46
<b>Figura 10</b> - Expressão imuno-histoquímica de IL-18	47
<b>Quadro 1</b> - Critérios de intensidade e percentual de análise das amostras de imuno-histoquímica	33
<b>Quadro 2</b> - Critérios de escore final da análise das amostras de imuno-histoquímica	33

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Critérios histopatológicos para exame da placenta	31
<b>Tabela 2</b> - Anticorpos utilizados para marcação imuno-histoquímica	32
<b>Tabela 3</b> - Frequência de alterações placentárias não inflamatórias por grupo de estudo (Caso x Controle)	35
<b>Tabela 4</b> - Estágio e graduação da Corioamnionite por grupo de estudo (Caso x Controle)	37
<b>Tabela 5</b> - Estágio e graduação da Vasculite por grupo de estudo (Caso x Controle).	37
<b>Tabela 6</b> - Deciduíte (Aguda e Crônica) e Perivasculite por Grupo de Estudo (Caso x Controle)	38
<b>Tabela 7</b> - Padrões morfológicos por Grupo de Estudo (Caso x Controle)	39
<b>Tabela 8</b> - Escores da Expressão Imuno-histoquímica de NLRP3	40
<b>Tabela 9</b> - Escore da Expressão Imuno-histoquímica de RIG-1	41
<b>Tabela 10</b> - Escore da Expressão Imuno-histoquímica de IFN- $\gamma$	42
<b>Tabela 11</b> - Escore da Expressão Imuno-histoquímica de Caspase-1	44
<b>Tabela 12</b> - Escore da Expressão Imuno-histoquímica de IL-1 $\beta$	45
<b>Tabela 13</b> - Escore da Expressão Imuno-histoquímica de IL-18	46
<b>Tabela 14</b> - Expressão imuno-histoquímica de RIG-1 por padrão morfológico	48
<b>Tabela 15</b> - Expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores CASP-1, IL-1 $\beta$ e IL-18 por padrão morfológico	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE-2	<i>Angiotensin-converting enzyme 2</i> (Enzima conversora de angiotensina 2)
ATP	Adenosina trifosfato
BEB	<i>Bebbing</i>
CAL	Calcificação
COEP	Comitês de Ética em Pesquisa
CONG	Congestão
COR	Corangiase
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
DA	Deciduíte aguda
DAMPS	Padrões de dano celular
DC	Deciduíte crônica
DF	Deposição de fibrina
E	Proteína envelope
EBSERH	Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
HE	Hematoxilina-eosina
HPV	Papiloma vírus humano
HVD	Hipoplasia vilosa distal
IL	Interleucina
InV	Infarto viloso
LabAPM	Laboratório Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG
M	Proteína de membrana
MERS-CoV	<i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
MVA	Maturação vilosa acelerada
N	Proteína do nucleocapsídeo
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B

NK	<i>Natural Killer</i>
NLR	<i>NOD-like</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor, pyrin domain-containing protein 3</i>
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PER	Perivasculite
PPR	Receptores de reconhecimento de padrões
REBRACO	Rede Brasileira de Estudo sobre COVID-19 em Obstetrícia
RIG-1	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RLR	<i>RIG-I-like</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
S	Glicoproteína <i>spike</i>
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SRA	Sistema renina-angiotensina
TRL	<i>Toll-like</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>15</b>
2.1	SARS-CoV-2 e COVID-19	17
2.2	SARS-CoV-2 e COVID-19 na gravidez	17
2.3	A placenta	19
2.4	A patologia placentária nas infecções	22
2.5	A imunidade inata placentária na infecção por SARS-CoV-2	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
3.1	GERAL:	27
3.2	ESPECÍFICOS:	27
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>28</b>
4.1	APRECIÇÃO ÉTICA	28
4.2	DELINEAMENTO DA PESQUISA	28
4.3	POPULAÇÃO DA PESQUISA	28
4.4	CRITÉRIOS DE SELEÇÃO E DE EXCLUSÃO	29
4.5	DETECÇÃO DO SARS-CoV-2 NA PLACENTA	29
4.6	ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO	30
4.7	ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO	32
4.8	ANÁLISE DOS DADOS	34
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>34</b>
5.1	DETECÇÃO DO SARS-CoV-2 E HISTOPATOLOGIA PLACENTÁRIA	34
5.2	IMUNO-HISTOQUÍMICA	40
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>57</b>
	<b>ANEXO I –</b>	<b>66</b>
	<b>ANEXO II –</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Para compreender o impacto, sobre resultados maternos e perinatais, da infecção causada pelo *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) durante a gravidez e pós parto, a Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO) desenvolveu um protocolo de pesquisa padronizado denominado Rede Brasileira de Estudo sobre COVID-19 em Obstetrícia/WHO - REBRACO/WHO (SOUZA, *et al.* 2022; COSTA, *et al.* 2021), um estudo de coorte prospectivo para investigação dos resultados maternos, gestacionais e neonatais em mulheres e neonatos infectados pelo SARS-CoV-2. Desde o seu surgimento, a *Coronavirus disease 2019* (COVID-19) tem se disseminado pelo mundo e parte expressiva da população, inclusive gestantes, corre risco de adquirir a infecção e a doença (World Health Organization, 2020). Como há poucos conhecimentos sobre o SARS-CoV-2 durante a gravidez, existe uma necessidade urgente de se compreender com mais detalhes a doença na gravidez, podendo assim estabelecer melhores estimativas prognósticas e melhores condutas de tratamento.

As alterações fisiológicas, imunomodulatórias e mecânicas que ocorrem durante a gravidez, podem aumentar tanto a susceptibilidade da mulher à doença quanto à gravidade para certas infecções (LAPINSKY, 2015). De início, as gestantes são mais vulneráveis à angústia respiratória por causa da redução da capacidade residual pulmonar, consumo aumentado de oxigênio, e aumento do volume sanguíneo circulante. Atualmente não está bem definido se as gestantes são mais suscetíveis à infecção e doença grave causadas pelo SARS-CoV-2. Dados limitados de outros coronavírus, como a síndrome respiratória (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus - SARS-CoV*) e síndrome respiratória do oriente médio (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus - MERS-CoV*), sugerem taxas de mortalidade em gestantes na faixa entre 25-30% (WONG, *et al.* 2004; ALFARI, *et al.* 2019).

Especificamente sobre a placenta, os estudos atuais divergem quanto a positividade viral do SARS-CoV-2 em placentas de mães que tiveram COVID-19 durante a gestação, sugerindo que existe um mecanismo/barreira protetora inata dentro da placenta onde a invasão viral é bloqueada por células imunes — principalmente neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células linfoides *natural killer* (NK) — que expressam receptores e/ou vias específicas da imunidade inata, como os receptores *retinoic acid-inducible gene* (RIG-1) e a via do inflamassoma *NOD-like receptor, pyrin domain-containing protein 3* (NLRP3) (ROBBINS, *et al.* 2012; BRYANT, *et al.* 2017; WEEL, *et al.* 2017). O reconhecimento de padrões moleculares

durante a infecção viral aguda desencadearia cascatas de sinalização que aumentariam as propriedades antimicrobianas, como fagocitose, secreção de citocinas pró-inflamatórias e ativação do sistema do complemento (CORNISH, *et al.* 2020).

Neste sentido, alguns estudos afirmam que a transmissão transplacentária do vírus SARS-CoV-2 é rara (WEI, *et al.* 2021). Entretanto, o exame histopatológico das placentas de gestantes que tiveram COVID-19 durante a gestação demonstra tanto evidências de infecção placentária dos constituintes celulares do vilo placentário, quanto a tríade intervilosite histiocítica, aumento da fibrina perivilosa e necrose trofoblástica (BOYRAZ *et al.*, 2022; GLYNN *et al.*, 2022; SHARPS *et al.*, 2020).

Há também, nos casos de infecção por SARS-CoV-2 durante a gravidez, relatos de abortos espontâneos e mortes perinatais. Um aumento de aproximadamente duas vezes de natimortos e um possível aumento na prevalência de neonatos pequenos para a idade gestacional também estão ligados à infecção materna por COVID-19. Os partos prematuros, que são amplamente iatrogênicos, parecem ser duas a três vezes mais comuns em gestantes com COVID-19 sintomático. Outra grave complicação observada na gravidez foi a pré-eclâmpsia, desordem associada à redução da oxigenação do feto e intenso comprometimento vascular da placenta (BOYRAZ *et al.*, 2022; GLYNN *et al.*, 2022).

Então, considerando-se as lacunas no conhecimento da patologia placentária e a importância do exame da placenta na compreensão de possíveis resultados adversos materno-fetais na gravidez, esse trabalho, que representa um subprojeto do estudo REBRACO no centro coparticipante Hospital das Clínicas da Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH) / Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), tem como objetivo descrever as alterações histopatológicas e caracterizar a expressão dos receptores da imunidade inata RIG-1, e da via do inflamassoma NLRP3 observadas nas placentas de gestantes que foram expostas ao SARS-CoV-2 durante a gestação. Espera-se que os achados desse subprojeto, assim como os resultados do estudo REBRACO, possam ser usados para desenvolver recomendações sobre vigilância, tratamento, e aconselhamento de mulheres durante e depois da gravidez, assim como cuidados com seus bebês, no contexto da COVID-19.

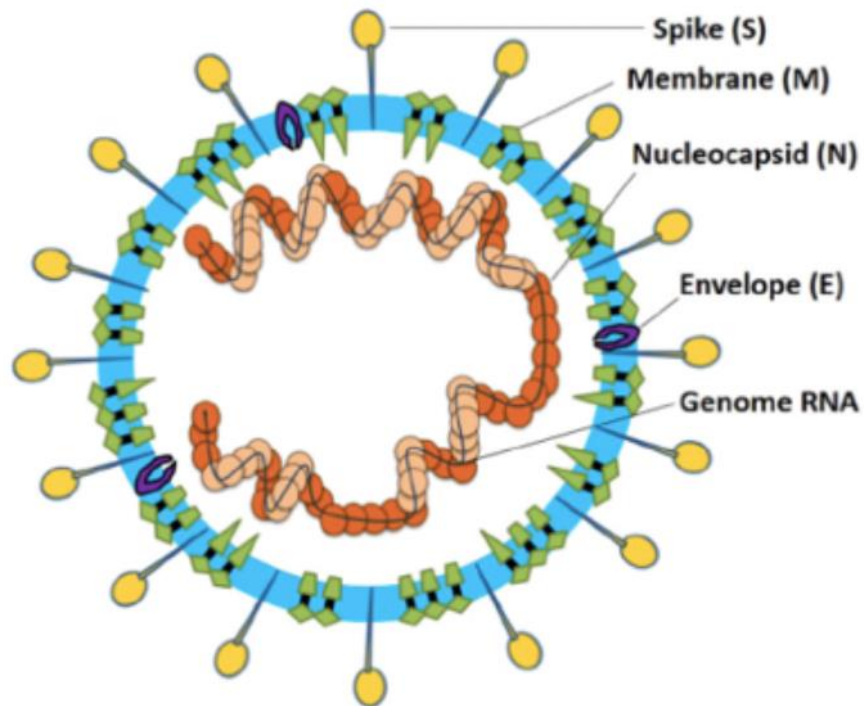
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. SARS-CoV-2 E COVID-19

Em março de 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a pandemia da COVID-19 (PERLMAN, 2020), uma doença causada pela infecção pelo vírus *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) (GUAN, *et al.* 2020). Esse evento mundial desencadeou uma série de impactos tanto sanitários e sociais quanto econômicos, sendo considerado um dos maiores desafios de saúde pública do século XXI (ANDERSON, *et al.* 2020).

O SARS-CoV-2 pertence à família *Coronaviridae* (ZHU, *et al.* 2020). Os coronavírus são assim nomeados devido à sua estrutura superficial, que, quando analisada através da microscopia eletrônica, se assemelha a uma coroa (CUI; LI; SHI, 2019). Houve no passado outros coronavírus que também causaram pandemias, como o *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* (SARS-CoV) em 2002 e o *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV) em 2012, entretanto somente o SARS-CoV-2, sendo altamente infeccioso foi capaz de provocar infecções em larga escala global (HU, *et al.* 2021).

A família *Coronaviridae* é composta por vírus envelopados de ácido ribonucleico (Ribonucleic acid - RNA) de fita simples e sua estrutura consiste em uma região codificadora da glicoproteína *spike* (S), uma região codificadora da proteína envelope (E), uma região codificadora da proteína de membrana (M) e uma região codificadora da proteína do nucleocapsídeo (N). As proteínas M e E estão envolvidas na formação do envelope viral enquanto a proteína N participa da montagem do vírus. (YANG; WANG, 2020). Sabe-se ainda que a proteína S liga-se ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (*angiotensin converting enzyme 2* - ACE2), fixando-se às células do hospedeiro (Figura 1). Esses receptores ACE2 são onipresentes no corpo humano, especialmente nas células epiteliais intestinais e renais, nas células endoteliais dos vasos e nas diversas estruturas do coração e pulmões (SHIRBHATE, *et al.* 2021). Tendo papel fundamental na regulação da pressão arterial e equilíbrio de fluidos no corpo humano (CRACKOWER, *et al.* 2002).

**Figura 1** – Estrutura viral do SARS-CoV-2

**Fonte:** Retirado de LI, *et al.* 2020

A transmissão do coronavírus ocorre por meio de gotículas respiratórias, por aerossóis em ambientes fechados e por superfícies contaminadas por pessoas tanto sintomáticas, quanto assintomáticas ou pré-sintomáticas, assim havendo uma elevada taxa de transmissão o que contribuiu para uma disseminação rápida e extensa da doença (LIU, *et al.* 2020). Esses aspectos epidemiológicos dificultaram a implementação de estratégias eficazes de controle, especialmente nas fases iniciais da pandemia.

Os dados epidemiológicos indicaram que o impacto da COVID-19 não foi homogêneo entre os diferentes grupos populacionais. A análise de fatores de risco revelou que idosos e indivíduos com comorbidades, como doenças respiratórias crônicas, obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes mellitus, apresentaram maior propensão a desenvolver as formas graves e consequentemente aumentando a letalidade da doença (RICHARDSON, *et al.* 2020). Entretanto, uma grande parcela dos casos foi de baixa gravidade ou até assintomática, o que gerou desafios e esforços para rastreamento e controle populacional, dado que muitos indivíduos potencialmente infecciosos não apresentaram sintomas evidentes (MEHTA, *et al.* 2021). Essa heterogeneidade na apresentação clínica reforçou a importância de estratégias de monitoramento em massa e medidas preventivas não farmacológicas, como o distanciamento social, o uso de máscaras e a higienização das mãos visando diminuir a transmissão.

Estudos mostram que mulheres grávidas infectadas pelo SARS-CoV-2 apresentam maior risco de complicações obstétricas. Inicialmente, foram relatados casos de abortos espontâneos e mortes perinatais. Um aumento de aproximadamente duas vezes de natimortos e um possível aumento na prevalência de neonatos pequenos para a idade gestacional também estão ligados à infecção materna por COVID-19. Os partos prematuros podem ser de duas a três vezes mais comuns em gestantes com a doença sintomática. Outra grave complicação observada na gravidez foi a pré-eclâmpsia, desordem associada à redução da oxigenação do feto e intenso comprometimento vascular da placenta (BOYRAZ, *et al.* 2022; GLYNN, *et al.* 2022).

O surgimento de variantes do SARS-CoV-2, como as variantes Alpha, Delta e Ômicron, representou um importante desafio adicional à epidemiologia da COVID-19. Essas variantes demonstraram maior transmissibilidade e, em alguns casos, uma capacidade de evasão imunológica parcial, o que resultou em novas ondas de infecção, mesmo em populações vacinadas (CARABELLI, *et al.* 2023). Embora as vacinas tenham mostrado alta eficácia na prevenção de formas graves da doença e mortalidade, as variantes emergentes exigiram ajustes nas estratégias de vacinação, incluindo a introdução de doses de reforço. O monitoramento epidemiológico contínuo foi essencial para atualizar as intervenções de saúde pública conforme novas informações e desafios surgiam (MOURA, *et al.* 2022).

## **2.2. SARS-COV-2 E COVID-19 NA GRAVIDEZ**

O impacto da COVID-19 em gestantes vem sendo amplamente estudado, hoje sabe-se que embora as gestantes sejam consideradas um grupo de risco para a COVID-19, pesquisas indicam que, na maioria dos casos, as mulheres grávidas infectadas pelo SARS-CoV-2 apresentam sintomas leves os quais no geral não requerem intervenção hospitalar podendo ser realizado ambulatorialmente. (ALFIERI; MANODORO; MARCONI, 2020; AFSHAR, *et al.* 2020; GRECHUKHINA, *et al.* 2020; ASHOKKA, *et al.* 2020). Entretanto uma parcela menor pode desenvolver quadros mais graves como pré-eclâmpsia, restrição de crescimentos intra-uterino, aborto espontâneo, parto prematuro, pneumonia e insuficiência respiratória

(PETTIROSSO, *et al.* 2020). Quanto aos efeitos nos recém-nascidos podem ocorrer complicações como hipotonia, hipóxia perinatal e parto prematuro (YUAN, *et al.* 2021).

A progressão inicial da infecção pelo SARS-CoV-2 é a mesma tanto para gestantes quanto para outros indivíduos, mas apresenta particularidades devido às mudanças fisiológicas que ocorrem na gravidez. Sabe-se que o coronavírus entra nas células hospedeiras por meio da ligação da sua proteína *spike* ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), o que desfavoravelmente aumenta a vulnerabilidade das gestantes à COVID-19, dado que o receptor ACE2 é abundantemente expresso na placenta sendo um componente essencial na manutenção do sistema renina-angiotensina (SRA) materno. (TAVARES, *et al.* 2023).

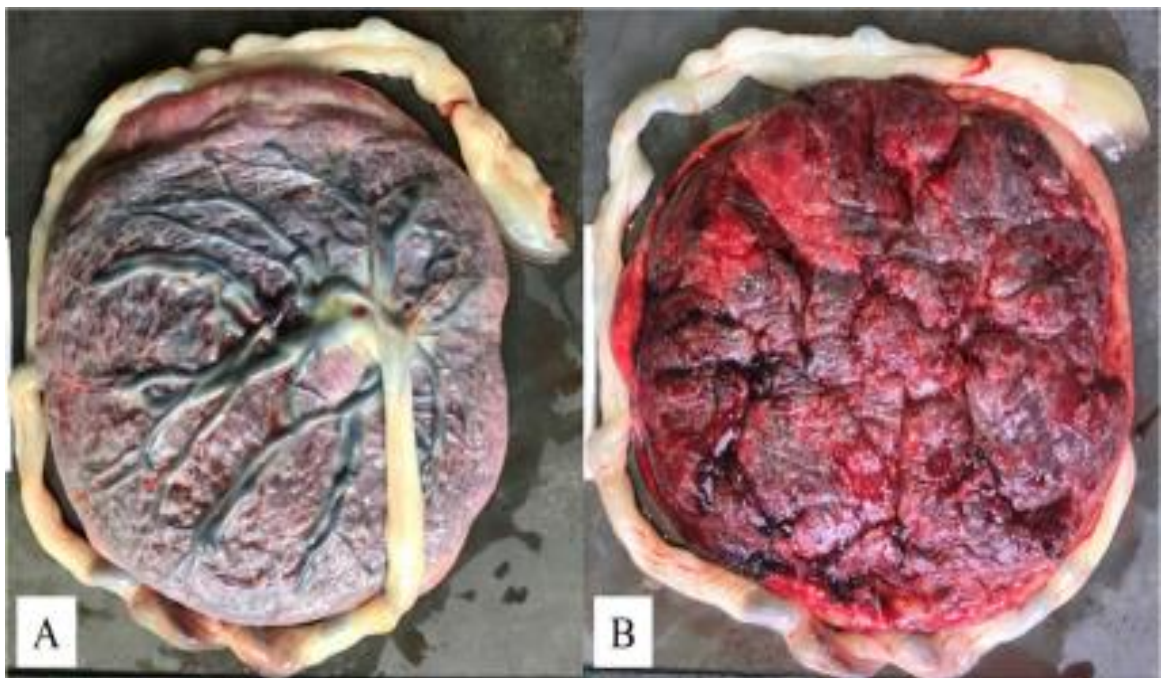
Na gestante, o sistema imunológico sofre uma adaptação para não haver a rejeição do feto (SVENSSON-ARVELUND, *et al.* 2014). Aproximadamente no último trimestre gestacional, observa-se alterações significativas no perfil imunológico materno, como a redução no número das células B e T e diminuição na quantidade e na função das células NK, o que gera um comprometimento da resposta imunológica celular. Por outro lado, há um aumento no número de monócitos, neutrófilos e células dendríticas produtoras de interferon do tipo 1, revelando uma mudança para uma resposta imune mais humoral. Tais alterações podem favorecer uma maior suscetibilidade a infecções virais graves, visto que a imunidade celular foi reduzida, enquanto a resposta humoral foi exacerbada (AREIA; MOTA-PINTO, 2020).

Além disso, a resposta mediada por anticorpos em grávidas infectadas pelo SARS-CoV-2 está associada a uma piora do quadro clínico geral, devido a tempestade de citocinas, que sustenta o estado de inflamação e contribui para uma diminuição no número de linfócitos (LIU, *et al.* 2020). A infecção por COVID-19 também pode afetar a placenta e a circulação uteroplacentária. Estudos indicam alterações histopatológicas nas placentas de mulheres que tiveram COVID-19 durante a gestação. Entre elas, destacam-se a infecção placentária direta de constituintes celulares do vilo placentário e a tríade intervilosite histiocítica, aumento da fibrina perivilosa e necrose trofoblástica (BOYRAZ, *et al.* 2022; GLYNN, *et al.* 2022; SHARPS, *et al.* 2020).

### 2.3. A PLACENTA

A placenta humana é hemocorial, a termo geralmente apresenta forma discóide com peso variando entre 430 e 650 gramas, caracteristicamente possui duas superfícies: a fetal e a materna (Figura 2). A face fetal é lisa, tem coloração vermelho-escura e é recoberta por duas membranas: o âmnio e o córion, que formam as membranas ovulares nas bordas da placenta. O âmnio é uma camada fina, lisa e transparente onde há a visualização dos vasos coriônicos. A face materna, por sua vez, é de tonalidade vermelho-vinhosa e é dividida em lóbulos/cotilédones, que possuem uma superfície macia e esponjosa. O cordão umbilical, pode se inserir na face fetal de diferentes formas sendo a forma excêntrica ou central suas inserções principais, e possui um comprimento médio de 50 a 60 centímetros (BOGLIOLO; BRASILEIRO FILHO, 2016).

**Figura 2** – Faces da placenta humana



**Legenda:** A: Face fetal. B: Face materna

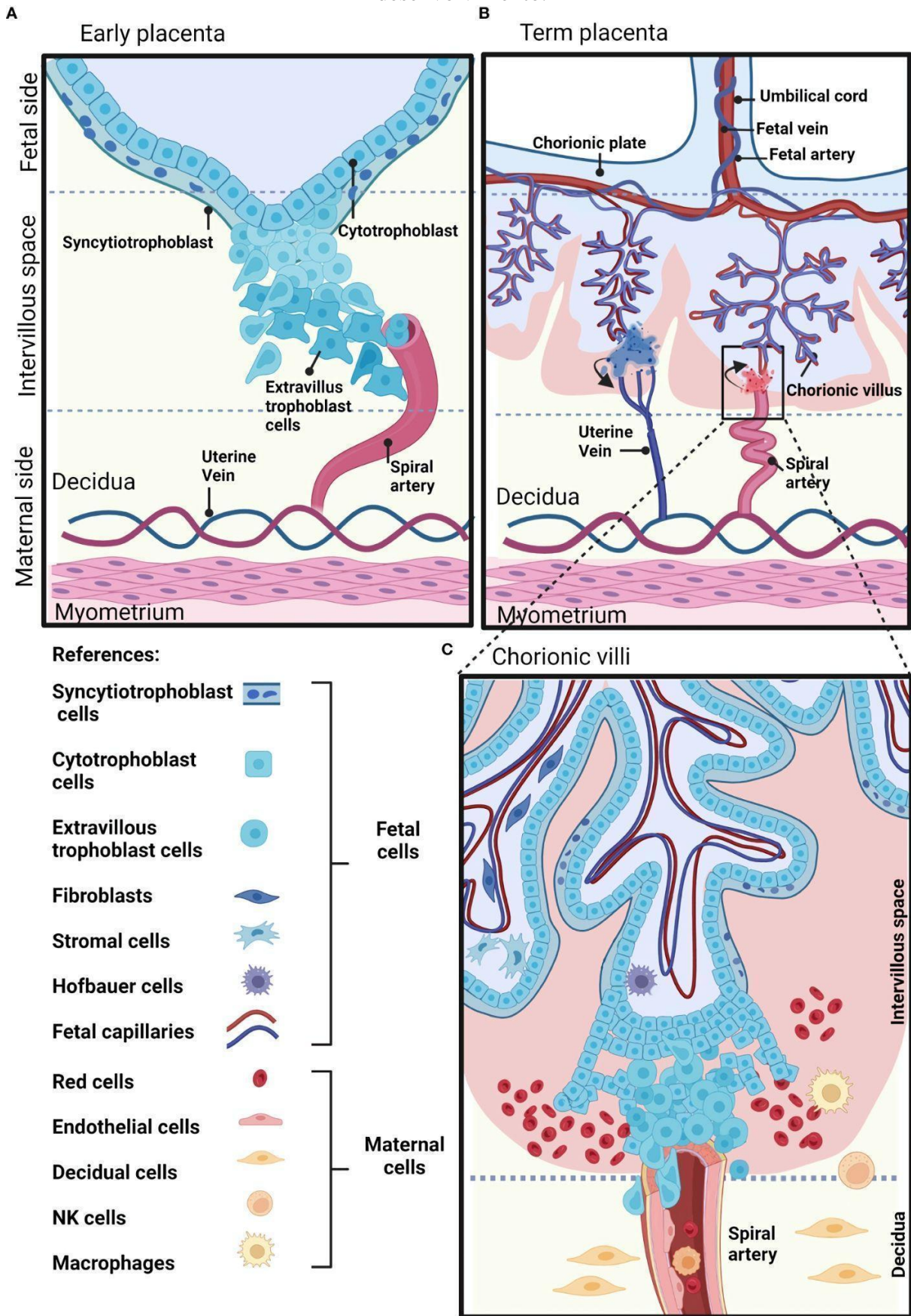
**Fonte:** Retirado de MACIEL, 2021.

Sabe-se que a placenta tem uma função essencial na manutenção do desenvolvimento adequado do feto, caracterizando-se como principal mediadora das trocas materno-fetais e na produção de hormônios durante toda a gravidez. Ela sofre ao longo dos diferentes trimestres gestacionais inúmeras mudanças morfológicas e funcionais (MATTEO; SALA, 1986).

A vilosidade coriônica constitui a unidade funcional da placenta humana, sendo responsável pela troca de gases, nutrientes e hormônios entre mãe e feto. Estruturalmente, é composta por uma camada externa de células trofoblásticas e sua membrana basal, cuja espessura diminui e a superfície de troca aumenta com o progresso gestacional, envolvendo um estroma conjuntivo rico em fibroblastos, células de Hofbauer e vasos capilares revestidos por membranas basais e endotélio (GIACOMO, 1986). Durante o desenvolvimento placentário, alterações histológicas podem ocorrer tanto em gestações normais quanto em condições patológicas, sendo a quantidade dessas alterações geralmente mais relevante do que sua qualidade na associação com doenças específicas (MENEZES, LOPES E MERENCIO, 1986).

O epitélio trofoblástico é formado por duas camadas celulares: o citotrofoblasto, a camada interna de células cuboidais, e o sinciciotrofoblasto, uma camada multinucleada sem limites celulares definidos (GARCIA, 1986). A partir do quarto mês de gestação, o citotrofoblasto torna-se progressivamente mais fino até desaparecer na microscopia óptica ao final da gravidez. Durante esse período, aparecem membranas vâsculo-sinciciais, caracterizadas como uma interface fina entre o endotélio dos vasos fetais e o sinciciotrofoblasto, atuando como barreira entre os sangues da mãe e do feto (BITTENCOURT, 1995). Os mecanismos de defesa da placenta incluem as capacidades fagocíticas e de produção de interferons pelo sinciciotrofoblasto. O estroma das vilosidades contém vasos fetais e células de Hofbauer, que apresentam funções fagocíticas e de apresentação de antígenos (BITTENCOURT, 1995). A figura 3 mostra uma representação esquemática da placenta humana e seus estágios de desenvolvimento.

**Figura 3** – Representação esquemática da placenta humana e seus estágios de desenvolvimento.



**Legenda:** Representação esquemática da placenta humana em seus estágios do desenvolvimento. (A) Placenta prematura: Os citotrofbastos se fundem para formar a camada de sincitiotrofblasto ou se diferenciam em trofbastos extravilosos os quais invadem a decídua materna e promovem a remodelação das artérias maternas. (B) Placenta a termo: A parte fetal é composta por vilosidades coriônicas que se estendem da placa coriônica para o espaço interviloso, sendo imersas em sangue materno. No lado materno, a decídua está em contato direto com as membranas fetais e os trofbastos extravilosos. O sangue materno entra no espaço interviloso através das artérias espirais e sai por meio das veias uterinas. (C) O detalhe mostra os tipos de células maternas e fetais representativas em uma seção longitudinal de uma placenta humana a termo.

**Fonte:** Adaptado de FARAL-TELLO, et al. 2023.

#### 2.4. A PATOLOGIA PLACENTÁRIA NAS INFECÇÕES

Em geral, as alterações encontradas em placentas devido a infecções virais dependerão de idade gestacional, carga viral materna circulante, patogenicidade da cepa, porta de entrada, presença de imunidade parcial, e capacidade fagocitária e do binômio mãe-bebê em desenvolver uma resposta adequada (GARCIA, 1986).

No contexto das patologias placentárias, um aspecto relevante envolve as infecções intrauterinas, que podem afetar o feto por diversas vias: hematogênica, ascendente, transuterina e transtubária. As infecções ascendentes estão frequentemente associadas à ruptura prematura das membranas, parto prematuro e aborto espontâneo no segundo trimestre da gestação. Já as infecções hematogênicas têm como característica principal a vilosite (lesão inflamatória do parênquima viloso) e podem ser causadas por vírus, bactérias, protozoários, fungos e helmintos (BOGLIOLO; BRASILEIRO FILHO, 2016).

Considera-se infecção hematogênica transplacentária quando um microorganismo no espaço interviloso da placenta atravessa, de modo ativo ou passivo, o epitélio trofoblástico até o córion das vilosidades, e de lá alcança o feto por meio dos vasos fetais presentes nas vilosidades. Portanto, muito provavelmente uma infecção que acomete o feto também terá acometido a placenta e suas estruturas anexas (BITTENCOURT, 1995).

O principal mecanismo de placentite viral é a replicação do microorganismo na placenta após viremia materna, constituindo a via hematogênica. A vilosite se caracteriza pela alteração da estrutura própria, pelo comprometimento vascular, pela proliferação macrofágica e aumento do infiltrado inflamatório agudo e/ou crônico. As lesões microscópicas do tipo crônico são as mais frequentes nas infecções hematogênicas e muitas vezes são discretas, focais e não valorizadas ou diagnosticadas, porém devem ser consideradas como evidência de infecção congênita mesmo que não se detecte ou identifique o organismo. Nas infecções hematogênicas, além da vilosite, a microscopia óptica pode evidenciar lesões inespecíficas como retardo da maturação vilosa (também chamada de dismaturidade), aumento de número de macrófagos (células de Hofbauer) e edema estromal (GARCIA, 1986).

Já a placentite ascendente é descrita como a infecção placentária que ocorre via transamniótica, a partir da presença do microorganismo na cérvix uterina que, por sua proximidade, irá infectar primeiramente as membranas extraplacentárias causando a corioamnionite (GARCIA, 1986). Os agentes etiológicos mais comuns deste tipo de infecção são as bactérias (LAJOS, *et al.* 2008).

Dentre as alterações histopatológicas na placenta, não inflamatórias há a hipoplasia vilosa distal que é caracterizada por ocorrer quando há uma diminuição no número adequado de ramificações do tronco viloso, afetando assim a quantidade de vilosidades coriônicas terminais e a troca entre o sangue fetal dentro dos capilares sanguíneos vilosos e o sangue materno do espaço intervilo (PARKS, 2007). Dados na literatura afirmam que tal alteração é mais prevalente em placentas de fetos que tiveram crescimento intrauterino restrito durante a gestação (SPINILLO, *et al.* 2019).

As principais alterações histopatológicas e que levam a um pior prognóstico fetal em casos de mães que contraíram COVID-19 durante a gestação, são a intervilosite, os trombos intervilosos e a deposição de fibrina, estudos relatam que tais alterações podem estar relacionadas à liberação aumentada de citocinas e não à um dano viral direto à placenta (BOUACHBA, *et al.* 2021). Sabe-se que quando há deposição maciça de fibrina perivilosa as vilosidades ficam aprisionadas pelo material fibrinoide e tornam-se fibróticas e avasculares o que eleva o risco de efeitos adversos materno-fetais (SPINILLO, *et al.* 2019).

A corangiose além de estar relacionada ao aumento da morbimortalidade, está relacionada à hipoperfusão, sendo mais prevalente em placentas que sofreram hipóxia, de causas variadas como diabetes mellitus, tabagismo materno, crescimento intrauterino restrito, gestações múltiplas, anemia materna e pré-eclâmpsia (VAF AEI, *et al.* 2021).

O *bebbing* compreende o nome da vacuolização do citoplasma das células do âmnio (KURMAN, 2002) alteração com poucos relatos na literatura e poucas elucidções de possíveis correlações clínicas. O infarto viloso pode ser morfológicamente caracterizado pelo colapso do espaço interviloso com subsequente necrose coagulativa secundária à perda de fluxo sanguíneo interviloso (ERNST, 2018). Alguns autores afirmam que o achado de necrose é relativamente comum, principalmente nos últimos estágios da gravidez, entretanto se ocorre de forma multifocal e em grande parte do disco placentário pode levar à pré-eclâmpsia, retardo do crescimento fetal e alterações neurológicas fetais relacionadas à hipóxia (BECROFT, *et al.* 2002).

As calcificações representam uma lesão que pode representar efeitos adversos, visto que sua presença pode ocasionar um estreitamento progressivo dos vasos da placenta devido ao acúmulo de cálcio e fibrina, resultando na diminuição do fluxo sanguíneo materno-fetal e suas repercussões negativas (CHEN, *et al.* 2011). No entanto, há estudos na literatura que colocam o achado de microcalcificações como sendo apenas um preditor do aumento de risco gestacional por não encontrarem relações estatisticamente significativas com desfechos neonatais adversos (QUINLAN, *et al.* 1982).

A patogênese proposta da maturação acelerada das vilosidades é a remodelação defeituosa das artérias espiraladas, levando à má perfusão da placenta, o que gera, conseqüentemente, perda de função por meio de estresse oxidativo, diminuição de área de superfície de troca, danos ao sincitiotrofoblasto e hipoxemia (BROSENS, *et al.* 2011). Morfológicamente observam-se vilosidades hiper maduras pequenas para a idade gestacional e aumento do número de nós sinciciais. É uma lesão predominantemente presente em casos de insuficiência placentária e pré-eclâmpsia (KHONG, *et al.* 2016). Pode também ser observada em casos de doenças reumáticas maternas, hipertensão materna, gestação múltipla e tabagismo. Os riscos fetais incluem parto prematuro e descolamento prematuro da placenta (VOGEL, 2012).

## 2.5. A IMUNIDADE INATA PLACENTÁRIA NA INFECÇÃO POR SARS-CoV-2

Quando o SARS-CoV-2 infecta o organismo, o sistema imunológico inato é rapidamente ativado, identificando padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões de dano celular (DAMPs) por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PPRs), como os receptores Toll-like (TLRs), RIG-I-like (RLRs) e os NOD-like (NLRs). (TAY, *et al.* 2020).

Entre os receptores NLRs, o NLRP3 e sua via, denominada inflamossoma NLRP3, é um dos mais estudados e pode ser ativado por diversos vírus, incluindo o SARS-CoV-2. Sua ativação completa requer dois sinais distintos. O Sinal 1 (preparação) é iniciado por moléculas do patógeno ou citocinas endógenas que ativam o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), estimulando a produção de pró-caspase-1 e pró-interleucinas como IL-1 $\beta$  e IL-18. Já o Sinal 2 (ativação) envolve estímulos como adenosina trifosfato (ATP), toxinas, RNA viral e danos teciduais, que induzem o recrutamento de pró-caspase-1 para o inflamossoma NLRP3. Esse processo resulta em efluxo de potássio, danos mitocondriais e alterações nos níveis de cálcio, todos essenciais para a ativação da caspase-1, que cliva as pro-interleucinas em suas formas ativas, IL-1 $\beta$  e IL-18. (CHOUDHURY, *et al.* 2021).

Em recente revisão da literatura, GOMEZ-LOPEZ e colaboradores (2019), descreveram que os inflamossomas e seus mediadores caspase-1 e IL-1 $\beta$  são expressos nas vilosidades coriônicas e membranas corioamnióticas durante a gravidez normal. No entanto, apresentam resultados de estudos nos quais a ativação do inflamossoma NLRP3 está envolvida na patogênese da pré-eclâmpsia e outras síndromes de gravidez associadas à inflamação placentária principalmente por bactérias. No caso da infecção placentária por vírus, a participação do inflamossoma NLRP3 permanece indefinida. Dentre a pequena quantidade de estudos sobre a associação do inflamossoma NLRP3 e infecções virais na gravidez, os resultados do trabalho de CREISHER e colaboradores (2022), indicam que, embora a IL-1 $\beta$  esteja hiperexpressa na placenta exposta ao Zika virus, essa observação não se deve à ativação do inflamossoma NLRP3.

No caso do receptor de RIG-1, BRYANT e colaboradores (2017) observaram um aumento estatisticamente significativo na produção de interleucina IL-6 e/ou IL-8 em resposta a agonistas específicos para RIG-I, além dos receptores TLR-3, TLR-7 e TLR-8. A expressão

de RIG-1 em placenta também foi estudada por NIZYAEVA e colaboradores (2019). Eles avaliaram gestantes com pré-eclâmpsia de início precoce e tardio e parto cesáreo com 27-39 semanas de gestação e observaram hiperexpressão de RIG-1 no sinciciotrofoblasto das vilosidades placentárias no grupo com gestação a termo sem complicações e redução na expressão de RIG-1 em grupos com pré-eclâmpsia de início precoce e tardio. Nas células deciduais e endoteliais, também observaram hiperexpressão de RIG-1 nas placentas de gestação normal e redução nas placentas do grupo pré-eclâmpsia, sugerindo participação de RIG-1 nas vias de sinalização que promovem a ativação da regeneração de células-tronco.

Mais recentemente, dois trabalhos sequenciais de RICE e colaboradores (2023a e 2023b), para testar a hipótese que os receptores TLRs e RIG-1 na placenta são biomarcadores precoces de infecções intrauterinas, mostraram, respectivamente, a expressão diferencial de receptores TLRs e RIG-1 em placenta de neonatos com infecções intrauterinas e correlacionaram essa expressão diferenciada com a severidade das infecções. Detalhadamente, eles mostraram que as placentas não infectadas não expressaram os receptores TLR1, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, apresentaram expressão moderada de TLR2 e forte expressão forte de RIG-1. Nos casos com infecção bacteriana e viral, observaram redução na expressão de TLR 2, TLR7 e RIG1, expressão moderada de TLR4 e hiperexpressão de TLR1, TLR3 e TLR8, sugerindo que um painel imuno-histoquímico para análises dos receptores TLRs/RIG-1 pode indicar o diagnóstico de infecção placentária. Em seguida, demonstraram que a expressão imuno-histoquímica de TLRs (TLR1, 2, 3, 4, 7, 8) e RIG-1 em infecções leves e regressivas pelos vírus do molusco contagioso e SARS-CoV2 e lesões escamosas de baixo grau associadas ao papiloma vírus humano (HPV) mostraram o padrão de hiperexpressão de pelo menos três dos TLRs/RIG-1. No caso das infecções graves por SARS-CoV-2 e câncer cervical associado ao HPV, observaram expressão acentuadamente reduzida em pelo menos três dos TLRs/RIG-1.

Assim, procura-se descobrir com este presente trabalho, se a infecção pelo vírus da COVID-19 durante a gestação leva a alguma alteração histopatológica placentária seja ela inflamatória ou não inflamatória.

## **OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL:**

Caracterizar as lesões morfológicas e biomarcadores da imunidade inata em placentas de gestantes expostas ao SARS-CoV-2.

### **2.2 ESPECÍFICOS:**

A- Descrever a presença do SARS-CoV-2 na placenta;

B- Descrever as alterações histopatológicas placentárias;

C- Avaliar a expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores RIG-1 e do inflamassoma NLRP3 na placenta;

D- Comparar as lesões e a expressão de biomarcadores placentários entre as gestantes expostas e não expostas ao SARS-CoV-2.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 APRECIÇÃO ÉTICA**

A pesquisa desta dissertação representa subprojeto do estudo REBRACO/WHO – Rede Brasileira de Estudo sobre COVID-19 em Obstetrícia/WHO, que foi realizado no centro coparticipante Hospital das Clínicas da Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH)/UFMG. O protocolo do estudo multicêntrico REBRACO foi aprovado no Comitês de Ética em Pesquisa do centro coordenador e da UFMG (COEP) (Certificados de apresentação de apreciação ética: 4.047.168, 4.179.679 e 4.083.988) e seguiu todas as normas de pesquisas envolvendo seres humanos contidas na Resolução 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde, para salvaguardar os direitos e o bem-estar das pessoas estudadas. Os exames propostos somente foram realizados após a autorização expressa, mediante consentimento voluntário, das participantes.

### **4.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA**

Trata-se de estudo observacional, transversal e comparativo dos aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos das placentas de gestantes que foram e não foram expostas ao SARS-CoV-2 durante a gestação. Gestantes com infecção confirmada pelo SARS-CoV-2 durante a gravidez foram consideradas expostas e gestantes não diagnosticadas com infecção pelo SARS-CoV-2 durante este período foram consideradas não expostas, baseando-se nos resultados dos testes sorológico, reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e teste rápido para antígeno SARS-Cov-2 do protocolo do projeto REBRACO.

### **4.3 POPULAÇÃO DA PESQUISA**

A população do estudo consiste nas mulheres gestantes e parturientes e puérperas até 2 dias após o parto que estiverem em atendimento pré-natal e/ou para o parto nas instituições participantes no período do estudo.

#### 4.4 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO E DE EXCLUSÃO

Como critério de inclusão optou-se por selecionar as placentas a termo de mulheres que tiveram exames laboratoriais positivos (Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), antígeno ou sorologia) para o vírus SARS-CoV-2 durante a gestação, independentemente do histórico de comorbidades materno, sexo do bebê e momento em que o exame foi positivo durante a gestação. O critério de exclusão foi a negatividade dos exames ou a não informação clínico/laboral de infecção por coronavírus durante a gestação. O período de inclusão nesta pesquisa do mestrado ocorreu entre maio de 2022 e janeiro de 2023 e todas as gestantes realizaram a vacinação contra COVID-19.

#### 4.5 DETECÇÃO DO SARS-CoV-2 NA PLACENTA

Para detecção do SARS-CoV-2 nas amostras de placenta, tubos Eppendorf (2 mL) receberam 5 cortes com espessura de 10 micrômetros. O RNA total foi extraído das amostras de placenta por meio do Kit RNAasy FFPE QIAmp® (QIAGEN®, E.U.A), seguindo todas as orientações do fabricante. Após o processo de extração o material foi estocado a -80°C. Todo o procedimento foi feito de acordo com o protocolo estabelecido pelo CDC (CDC 2019-Novel Coronavirus Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel – Instructions for use). Foi utilizado o GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega). O mix de reação foi constituído de GoTaq® Probe qPCR Master Mix with dUTP (6,0µL), GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR (0,2µL), iniciadores senso e antissenso (0,5µL cada – 500nM de hCOVassay1 R: 5'AGCAGCATCACCGCCATTG 3' e hCOVassay2 R: 5' CCGCCATTGCCAGCCATTC 3'), sonda (0,1µL – 100nM), amostra de RNA (3,0µL) e água livre de nucleases q.s.p 12,0µL. Para cada amostra, o mesmo mix foi feito quatro vezes, já que são quatro genes alvo (RdRP, S, N específico para SARS-CoV-2 e E) mais a reação de controle interno (RNase P). As condições de termociclagem foram as seguintes: transcrição reversa (45°C por 5 min); inativação da transcriptase reversa e ativação da Taq polimerase (95°C por 2 min); 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 s) e pareamento/extensão (60°C por 1min). Para quantificação absoluta, foram utilizadas as curvas de referência do Laboratório de Imunologia de Doenças Virais da FIOCRUZ Minas, que foram válidas para diagnóstico.

#### **4.6 ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO**

As placentas foram coletadas após o parto pela equipe clínica do Hospital das Clínicas da UFMG, mantidas refrigeradas e posteriormente encaminhadas para o Laboratório Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG (LabAPM), em período máximo de 48 horas. No laboratório, a placenta foi examinada macroscopicamente e posteriormente foram coletadas 4 amostras sendo uma de membrana e cordão umbilical e três de parênquima placentário. O material foi fixado em formol (formalina 10%) pelo período de 24 horas e posteriormente processado no autotécnico LEICA® em processos sequenciais de desidratação, diafanização e parafinização. As amostras foram incluídas em blocos de parafina, cortadas em micrótomo com espessura de 5 micrômetros, dispostas em lâminas e desparafinizadas, coradas pela hematoxilina-eosina (HE) e montadas com lamínula em meio próprio (Entellan®) para análise em microscópio óptico (Olympus®) por dois médicos patologistas de acordo com os critérios para análise de lesões proposto por Redline e reportados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Critérios histopatológicos para exame da placenta

Variável	Categoria	Descrição
Hipoplasia vilosa distal	0	Redução das vilosidades em até 30% da espessura total do corte (menor aumento / objetiva de 10x)
	1	Redução das vilosidades entre 30% e 50% da espessura total do corte (menor aumento / objetiva de 10x)
	2	Redução das vilosidades acima de 50% da espessura total do corte (menor aumento / objetiva de 10x)
Maturação vilosa acelerada	0	Até 30% das vilosidades coriônicas apresentando nós sinciciais
	1	Entre 30% e 50% das vilosidades coriônicas apresentando nós sinciciais
	2	Mais que 50% das vilosidades coriônicas apresentando nós sinciciais
Corioamnionite aguda (Estágios da resposta materna)	1	Neutrófilos na região subcoriônica / fibrina coriônica. Grau 1 ou 2
	2	Neutrófilos na placa coriônica e membranas. Grau 1 ou 2
	3	Cariorréxe ou necrose do âmnio. Grau 1 ou 2
Corioamnionite aguda (Graus da resposta materna)	1	Leve a moderado
	2	Intenso (>30 neutrófilos) na placa coriônica e microabscessos subcoriônicos
Corioamnionite crônica (Estágios)	1	Infiltrado linfocitário restrito à camada de trofoblasto coriônico
	2	Infiltrado linfocitário dentro do tecido conjuntivo amniocorial
Corioamnionite crônica (Graus)	1	Três ou mais focos de infiltrado linfocitário (focal / multifocal)
	2	Infiltrado linfocitário difuso
Vilite crônica (Graus)	1	5 - 10 vilos/focos, multifocal
	2	> 10 vilos/focos
Intervilosite aguda	0	Ausência de neutrófilos / fibrina nos vilos e espaço interviloso
	1	Presença de neutrófilos / fibrina nos vilos e espaço interviloso
Intervilosite crônica	0	Ausência de infiltrado misto nos vilos / espaço interviloso
	1	Presença de infiltrado interviloso difuso por linfócitos, macrófagos e eosinófilos
Vasculite aguda aguda (Estágios da resposta fetal)	1	Flebite umbilical e/ou vasculite coriônica. Grau 1 ou 2
	2	Arterite e flebite umbilicais. Grau 1 ou 2
	3	Periflebite concêntrica umbilical e/ funisite necrosante. Grau 1 ou 2
Vasculite aguda (Grau da resposta fetal)	1	Leve a moderado
	2	Intenso (>30 neutrófilos) na placa coriônica e microabscessos subcoriônicos

**Fonte:** adaptado de REDLINE *et al.*, 2008.

Além das variáveis descritas na Tabela 1, também foram analisadas e classificadas como ausente (0) e presente (1) as seguintes variáveis: Deposição de fibrina; Calcificação; Necrose; Hemossiderina; Congestão; Vilo avascular; Cariorrexe; *Bebbing*; Fusão celular; Perda das junções celulares; Aterose; Necrose fibrinóide; Hipertrofia mural; Perivasculite; Infarto viloso; Trombo interviloso; Hemorragia intraparenquimatosa; Hemorragia subcorionica; Aglutinação vilosa; Trombose vascular fetal; Corangioma; Corangiomatose; e Hipoplasia placentária. A descrição detalhada da classificação dessas variáveis encontra-se no Anexo 1.

#### 4.7 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Para a detecção imuno-histoquímica do SARS-CoV-2 nas amostras de tecido, foi empregado o produto *Coronavirus pan Monoclonal Antibody* (FIPV3-70) na diluição de 1/100 em solução de PBS. Para o estudo imuno-histoquímico do receptor RIG-1 e dos integrantes do inflamassoma NLRP3, foram realizadas as avaliações dos alvos RIG-1, IL-1 $\beta$ , IL-18, Caspase 1 e NLRP3. Os anticorpos primários foram provenientes dos fabricantes Santa Cruz Biotechnology e Abcam, conforme especificações da Tabela 2.

**Tabela 2** – Anticorpos utilizados para marcação imuno-histoquímica

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Marcação</b>	<b>Clone</b>	<b>Fabricante</b>
Anti-IL1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$	2h12: sc-130323	Santa Cruz Biotech., INC
Anti-IL18	Interleucina 18	H173: sc-7954	Santa Cruz Biotech., INC
Anti-Caspase 1	Caspase 1	14F468: sc-56036	Santa Cruz Biotech., INC
Anti-NLRP3	NLRP3	Cryopyrin-H-66: sc-66846	Santa Cruz Biotech., INC
Anti-RIG-1	RIG-1	SC376845	Santa Cruz Biotech., INC

Na análise da imuno-histoquímica anti-coronavírus, a imunorreatividade foi considerada detecção positiva. Nas análises de estudo imuno-histoquímico do inflamassoma NLRP3, foram adotados os padrões de intensidade e porcentagem de acordo com Quadro 1.

**Quadro 1** – Critérios de intensidade e percentual de análise das amostras de imuno-histoquímica

<b>Intensidade</b>		<b>Percentual</b>	
<b>0</b>	Ausente	<b>0</b>	Ausente
<b>1</b>	Leve ou uma cruz (+)	<b>1</b>	1 a 25%
<b>2</b>	Moderado ou duas cruzes (++)	<b>2</b>	26 a 50%
<b>3</b>	Intensa ou três cruzes (+++)	<b>3</b>	51 a 75%
		<b>4</b>	76 a 100%

**Fonte:** adaptado de MENDES *et al.*, 2020.

Para as análises de estudo imuno-histoquímico, quando semi-quantitativos, um escore foi estabelecido, baseado no percentual e intensidade da imunomarcção (TAKANO, *et al.* 2016). Dessa forma, multiplicamos os graus de intensidade da marcação com o percentual de tecido positivo, conforme a tabela 4, abaixo. Os valores em menores do que 3 são considerados expressão “basal” (destacados em azul na tabela abaixo) e os valores iguais ou acima de “4” foram considerados com “hiperexpressão” (destacados em vermelho na tabela). Sendo assim, interpretados, finalmente, como “hiperexpressão” (1) e expressão “basal” (0).

**Quadro 2** – Critérios de escore final da análise das amostras de imuno-histoquímica

<b>Intensidade</b>	<b>Percentual</b>				
	0	1	2	3	4
0	0	0	0	0	0
1	0	1	2	3	4
2	0	2	4	6	8
3	0	3	6	9	12

**Fonte:** adaptado de MENDES *et al.*, 2020.

## 4.8 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram armazenados em planilhas do software EXCEL. Testes Z, Qui-quadrado, correlação linear de Spearman (dados não paramétricos) ou de Pearson (dados paramétricos) foram utilizados para comparação das variáveis entre os grupos do estudo. As diferenças estatisticamente significativas quando  $p < 0.05$ . Análise de regressão logística multinomial: programa VGAM do software estatístico R (Versão 3.2; <http://www.r-project.org>) e softwares MINITAB 17 e GraphPad Prism 5.0.1, utilizando-se testes de regressão linear, teste “t” de Student e One Way ANOVA; pós-teste Tukey, foram utilizadas para verificação de variáveis preditivas das anormalidades clínicas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 DETECÇÃO DO SARS-CoV-2 E HISTOPATOLOGIA PLACENTÁRIA

O estudo contou com a participação de 31 gestantes com idade média de 32,25 anos, que foram atendidas e acompanhadas no Serviço de Obstetrícia do HC-EBSERH. Conforme delineamento do estudo, essas participantes foram subdivididas nos grupos de gestantes expostas (Grupo Caso) e não expostas (Grupo Controle) ao vírus SARS-CoV-2 e/ou COVID-19, com 15 (48,39%) e 16 (51,61%) membros, respectivamente. No Grupo Caso, de gestantes expostas, a infecção pelo SARS-CoV-2 provocou quadro clínico de COVID-19 leve em todas as pacientes e ocorreu com proporções iguais no primeiro, segundo e terceiro trimestres gestacionais. Em cada um desses trimestres, foram registrados 5 casos (33,33%) de infecção.

Considerando o primeiro objetivo específico do estudo, as amostras foram submetidas à RT-PCR e imuno-histoquímica para pesquisa do SARS-CoV-2 e todas foram negativas. Não foram observados sinais residuais de material genético ou proteínas do SARS-CoV-2 nas amostras de placenta.

Considerando o segundo e o quarto objetivos específicos do estudo, as amostras das placentas foram examinadas na coloração de rotina do exame histopatológico. A tabela 3 apresenta o resultado das principais variáveis histopatológicas não inflamatórias.

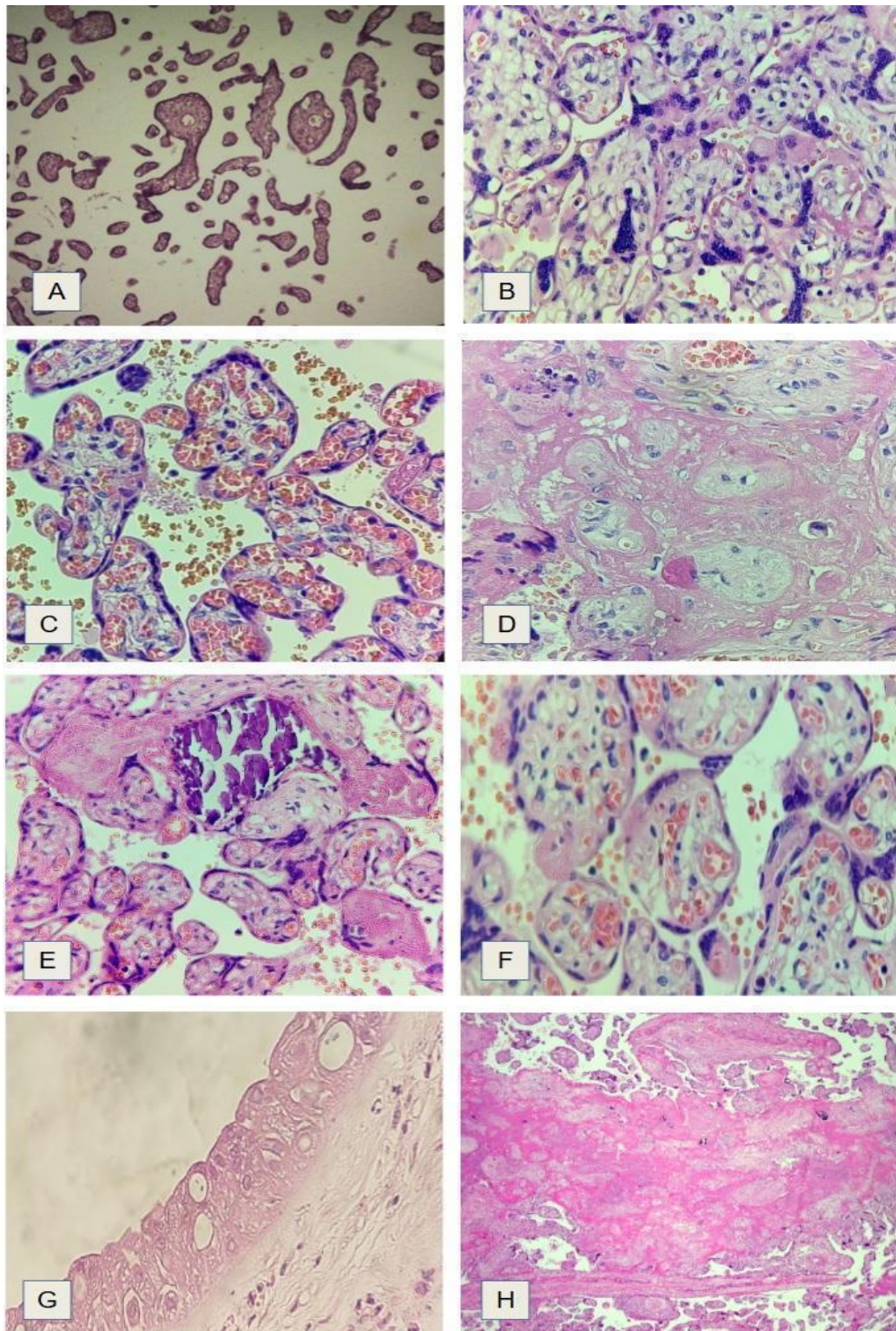
**Tabela 3** - Frequência de alterações placentárias não inflamatórias por grupo de estudo (Caso x Controle).

Variável / Resultado		Caso		Controle		Total	
		n	%	n	%	n	%
HVD	Ausente	8	42,11	11	57,89	19	100
	Presente	7	58,33	5	41,67	12	100
MVA	Ausente	11	50	11	50	22	100
	Presente	4	44,44	5	55,56	9	100
COR	Ausente	13	50	13	50	26	100
	Presente	2	40	3	60	5	100
DF	Ausente	0	0	2	100	2	100
	Presente	15	51,72	14	48,28	29	100
CAL	Ausente	3	75	1	25	4	100
	Presente	12	44,44	15	55,56	27	100
CONG	Ausente	3	33,33	6	66,67	9	100
	Presente	12	54,55	10	45,45	22	100
BEB	Ausente	13	52	12	48	25	100
	Presente	2	33,33	4	66,67	6	100
InV	Ausente	15	51,72	14	48,28	29	100
	Presente	0	0	2	100	2	100

**Legenda:** HVD: Hipoplasia vilosa distal; MVA: Maturação vilosa acelerada; COR: Corangiose; DF: Deposição de fibrina; CAL: Calcificação; CONG: Congestão; BEB: *Bebbing*; InV: Infarto viloso;

As alterações mais observadas nas placentas, independentemente do grupo, foram a deposição de fibrina, calcificação e congestão. Comparando-se as proporções das alterações entre os grupos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das variáveis. A figura 4 ilustra essas alterações histopatológicas não inflamatórias.

**Figura 4** - Lesões histopatológicas não inflamatórias na placenta



**Legenda:** A) Hipoplasia vilosa distal (HE x 10); B) Maturação vilosa acelerada (HE x 40); C) Corangiiose (HE x 40); D) Deposição de fibrina (HE x 40); E) Calcificação (HE x 40); F) Congestão (HE x 40); G) *Bebbing* (HE x 40); H) Infarto viloso (HE x 40);

**Fonte:** Acervo pessoal da autora

Quanto às alterações histopatológicas inflamatórias da placenta, foram avaliadas em estágio e grau a corioamnionite (Tabela 4) e a vasculite aguda (Tabela 5). E quanto a presença ou ausência a deciduíte (aguda e crônica) e a perivasculite (Tabela 6).

**Tabela 4** - Estágio e graduação da Corioamnionite por grupo de estudo (Caso x Controle).

Corioamnionite		Caso		Controle		Total	
		n	%	n	%	n	%
Estágio	0	11	44	14	56	25	100
	1	1	100	0	0	1	100
	2	1	50	1	50	2	100
	3	2	66,67	1	33,33	3	100
Grau	0	11	44	14	56	25	100
	1	1	100	0	0	1	100
	2	3	60	2	40	5	100

A Tabela 4 detalha a presença e a quantificação da corioamnionite quanto ao estágio (de 0 a 3) e grau (de 0 a 2) nos grupos Caso e Controle. A maioria das participantes de ambos os grupos foi classificada no estágio 0 (ausência de inflamação), com apenas algumas placentas mostrando progressão para estágios mais avançados (1 a 3). Da mesma forma, os graus de inflamação também apresentaram predominância do grau 0, com menor incidência de graus 1 e 2. Esses achados sugerem que a corioamnionite esteve pouco presente nas amostras e não apresentou diferenças significativas entre os grupos analisados.

**Tabela 5** - Estágio e graduação da Vasculite por grupo de estudo (Caso x Controle).

Vasculite aguda		Caso		Controle		Total	
		n	%	n	%	n	%
Estágio	0	14	48,28	15	51,72	29	100
	1	0	0	0	0	0	0
	2	1	50	1	50	2	100
	3	0	0	0	0	0	0
Grau	0	14	48,3	15	51,72	29	100
	1	0	0	1	100	1	100
	2	1	100	0	0	1	100

A Tabela 5 descreve a presença e quantificação de vasculite aguda nas placentas de acordo com o estágio (de 0 a 3) e o grau (de 0 a 2). Em ambos os grupos, o estágio e o grau 0 foram predominantes, indicando ausência de inflamação nos vasos na maioria das amostras. Estágios e graus mais elevados foram raros, com apenas dois casos no estágio 2. Esses dados reforçam a baixa ocorrência de alterações inflamatórias vasculares relacionadas ao contexto do estudo, independentemente da exposição ao SARS-CoV-2/COVID-19.

**Tabela 6** - Deciduíte (Aguda e Crônica) e Perivasculite por Grupo de Estudo (Caso x Controle).

Variável / Resultado		Caso		Controle		Total	
		n	%	n	%	n	%
DA	Ausente	10	41,67	14	58,33	24	100
	Presente	5	71,43	2	28,57	7	100
DC	Ausente	12	46,15	14	58,85	26	100
	Presente	3	60	2	40	5	100
PER	Ausente	15	50	15	50	30	100
	Presente	0	0	1	100	1	100

**Legenda:** DA: Deciduíte aguda; DC: Deciduíte crônica; PER: Perivasculite.

A Tabela 6 apresenta a frequência de deciduíte (aguda e crônica) e perivasculite nas amostras de placenta dos grupos Caso e Controle. A deciduíte aguda (DA) foi mais prevalente no grupo Caso (71,43%) em comparação ao grupo Controle (28,57%), enquanto a deciduíte crônica (DC) também mostrou leve predominância no grupo Caso. A perivasculite foi observada em apenas uma amostra do grupo Controle, indicando uma ocorrência muito baixa em geral. Esses achados sugerem uma tendência de maior inflamação decidual nos casos expostos, embora a amostra limitada dificulte a extrapolação.

Considerando a união dos resultados das análises histopatológicas, foi possível agrupar as características morfológicas em padrões inflamatório e usual (Tabela 7).

**Tabela 7-** Padrões morfológicos por Grupo de Estudo (Caso x Controle)

Grupo	Padrão morfológico					
	Usual		Inflamatório		Total	
	n	%	n	%	n	%
Caso	7	46,67	8	53,33	15	100
Controle	10	62,5	6	37,5	16	100
Total	17	54,84	14	45,16	31	100

Conforme observado na tabela 7, há predomínio das placentas com ausência de lesões inflamatórias (54,84%). A proporção de lesões inflamatórias foi maior no grupo de placentas das gestantes expostas ao SARS-CoV-2 (53,33%), em relação ao grupo controle, de gestantes não expostas.

## 5.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA

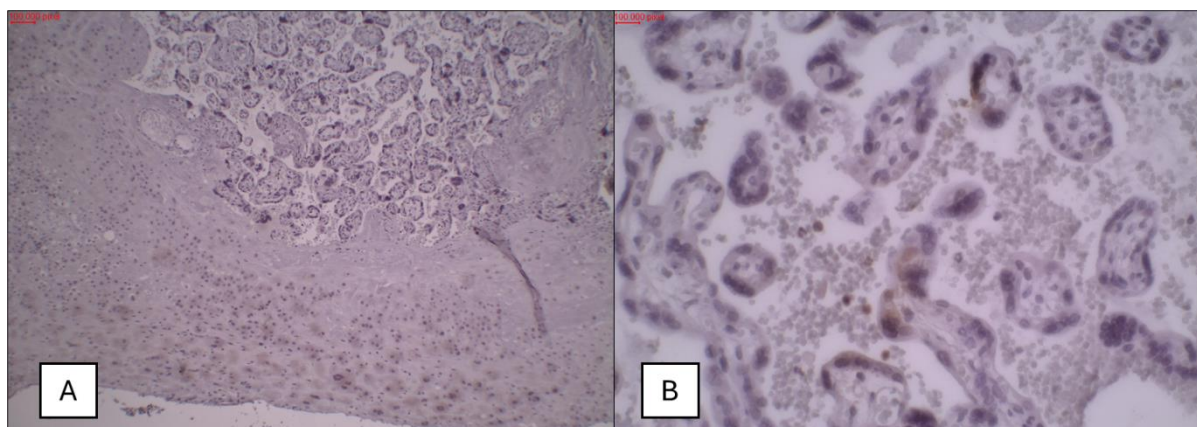
Considerando o terceiro e o quarto objetivos específicos do estudo, os ensaios imuno-histoquímicos nas amostras das placentas dos grupos Caso e Controle foram realizados para os biomarcadores NLRP3, RIG-1, IFN- $\gamma$ , CASP-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 da imunidade inata. Em cada amostra, foram examinadas a intensidade e a distribuição da reatividade separadamente para cada um dos seguintes compartimentos: âmnio e córion; trofoblasto; células de Hofbauer; e decídua.

O exame imuno-histoquímico do marcador NLRP3 apresentou, em todos os compartimentos, o predomínio da ou a completa ausência de reatividade. Somente duas amostras, uma de cada grupo, apresentou reatividade com intensidade leve e distribuição esporádica. A tabela 8 apresenta os escores detalhados da expressão imuno-histoquímica de NLRP3 nos diversos compartimentos da placenta.

**Tabela 8** - Escores da Expressão Imuno-histoquímica de NLRP3

Local	Expressão	Caso		Controle		Total	
		n	%	n	%	n	%
Âmnio e córion	Basal	15	48,39	16	51,61	31	100
	Elevada	0	0	0	0	0	0
Trofoblasto	Basal	15	48,39	16	51,61	31	100
	Elevada	0	0	0	0	0	0
Hofbauer	Basal	15	48,39	16	51,61	31	100
	Elevada	0	0	0	0	0	0
Decídua	Basal	15	48,39	16	51,61	31	100
	Elevada	0	0	0	0	0	0

Os resultados da tabela 8 demonstram a completa presença do escore basal de expressão imuno-histoquímica do marcador NLRP3 nos diversos compartimentos da placenta. Este padrão homogêneo indica ausência de ativação significativa da via inflamatória associada ao NLRP3 nos compartimentos analisados, independentemente da exposição ao SARS-CoV-2 e COVID-19. A figura 5 ilustra as características da reatividade imuno-histoquímica do biomarcador NLRP3 na placenta.

**Figura 5** - Expressão imuno-histoquímica de NLRP3

**Legenda:** A) Reatividade de NLRP3 com leve intensidade e distribuída em cerca de 40% das células da decídua basal (x10); B) Reatividade de NLRP3 com moderada intensidade e distribuída em cerca de 5% do trofoblasto (x40).

**Fonte:** Acervo pessoal da autora.

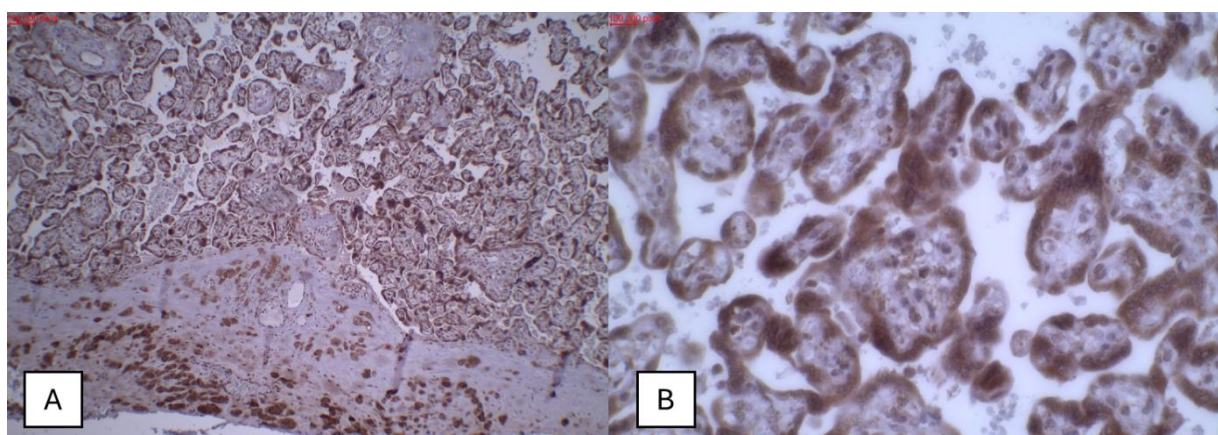
Considerando o produto das categorias da intensidade pela distribuição, todos os compartimentos da placenta (Âmnio e córion; Trofoblasto; Hofbauer; e Decídua) apresentaram escores basais expressão.

A Tabela 9 apresenta os padrões de expressão do marcador RIG-1 em diferentes compartimentos placentários, buscando identificar potenciais diferenças de atividade inflamatória nos grupos Caso e Controle.

**Tabela 9** - Escore da Expressão Imuno-histoquímica de RIG-1

Local	Expressão	Caso		Controle		Total	
		n	%	n	%	n	%
Âmnio e córion	Basal	2	66,67	1	33,33	3	100
	Elevada	13	46,43	15	53,57	28	100
Trofoblasto	Basal	0	0	0	0	0	0
	Elevada	15	48,39	16	51,61	31	100
Hofbauer	Basal	7	58,33	5	41,67	12	100
	Elevada	8	42,11	11	57,89	19	100
Decídua	Basal	2	66,67	1	33,33	3	100
	Elevada	13	46,43	15	53,57	28	100

A Tabela 9 apresenta a análise da expressão do marcador RIG-1 nos diferentes compartimentos da placenta. Nos grupos Caso e Controle, o marcador apresentou predominância de expressão elevada no trofoblasto, células de Hofbauer e decídua, enquanto no compartimento âmnio e córion a expressão basal foi observada em três amostras. Esses resultados sugerem uma resposta inflamatória mais ativa relacionada ao marcador RIG-1, distribuída em vários compartimentos, sem grandes diferenças entre os grupos. A figura 6 ilustra as características da reatividade imuno-histoquímica do biomarcador RIG-1 na placenta.

**Figura 6** - Expressão imuno-histoquímica de RIG-1

**Legenda:** A) Reatividade de RIG-1 com forte intensidade e distribuída em cerca de 60% das células da decídua basal (x10); B) Reatividade de RIG-1 com forte intensidade e distribuída em cerca de 100% do trofoblasto (x40).  
**Fonte:** Acervo pessoal da autora.

Considerando o produto das categorias da intensidade pela distribuição, todos os compartimentos da placenta (Âmnio e córion; Trofoblasto; Hofbauer; e Decídua) apresentaram predomínio de escores de hiperexpressão do biomarcador RIG-1.

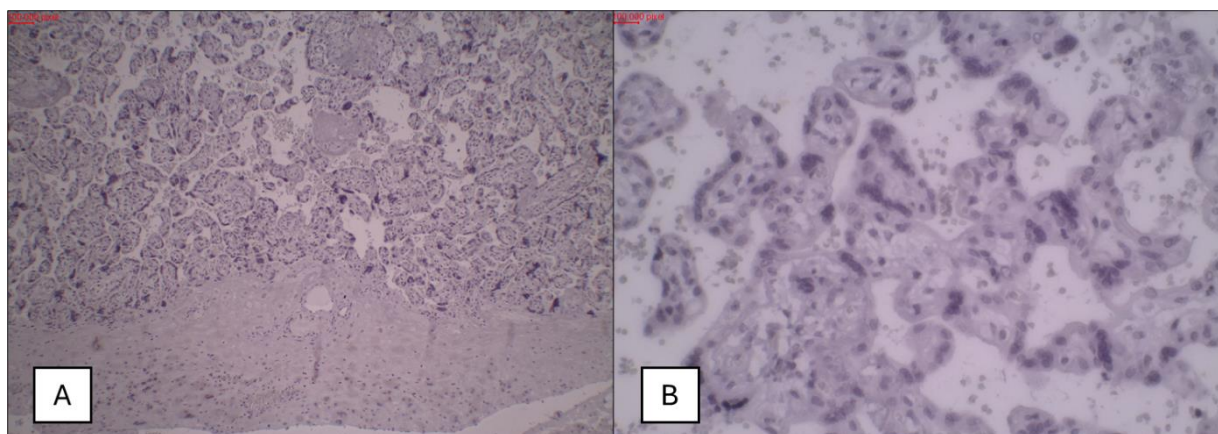
A Tabela 10 fornece informações sobre a expressão do marcador IFN- $\gamma$  nos diversos compartimentos placentários.

**Tabela 10** - Escore da Expressão Imuno-histoquímica de IFN- $\gamma$ 

Local	Expressão	Caso		Controle		Total	
		n	%	n	%	n	%
Âmnio e córion	Basal	15	48,39	16	51,61	31	100
	Elevada	0	0	0	0	0	0
Trofoblasto	Basal	15	48,39	16	51,61	31	100
	Elevada	0	0	0	0	0	0
Hofbauer	Basal	15	48,39	16	51,61	31	100
	Elevada	0	0	0	0	0	0
Decídua	Basal	15	48,39	16	51,61	31	100
	Elevada	0	0	0	0	0	0

A Tabela 10 apresenta os escores de expressão do marcador IFN- $\gamma$  nos compartimentos placentários. Em todos os compartimentos (âmnio e córion, trofoblasto, células de Hofbauer e decídua), tanto no grupo Caso quanto no Controle, a expressão foi exclusivamente basal. Isso demonstra uma ausência de ativação deste marcador inflamatório nas amostras analisadas, indicando que o IFN- $\gamma$  não esteve envolvido significativamente nos processos inflamatórios nas condições avaliadas. A figura 7 ilustra as características da reatividade imuno-histoquímica do biomarcador IFN- $\gamma$  na placenta.

**Figura 7** - Expressão imuno-histoquímica de IFN- $\gamma$



**Legenda:** A) Reatividade de IFN- $\gamma$  com fraca intensidade e distribuída em cerca de 20% das células da decídua basal (x10); B) Ausência de reatividade de IFN- $\gamma$  em cerca de 100% do trofoblasto (x40).

**Fonte:** Acervo pessoal da autora.

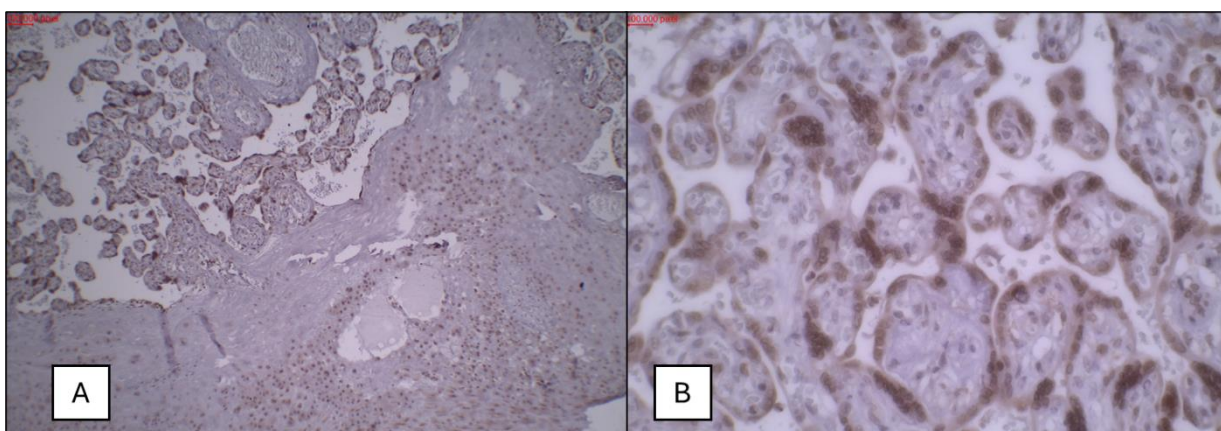
Considerando o produto das categorias da intensidade pela distribuição, todos os compartimentos da placenta (Âmnio e córion; Trofoblasto; Hofbauer; e Decídua) apresentaram predomínio de escores basais de expressão do biomarcador IFN- $\gamma$ .

A Tabela 11 explora a expressão do marcador CASP-1 nos compartimentos analisados, com o objetivo de investigar o envolvimento deste marcador em processos inflamatórios placentários nos grupos Caso e Controle.

**Tabela 11** - Escore da Expressão Imuno-histoquímica de Caspase-1

Local	Expressão	Caso		Controle		Total	
		n	%	n	%	n	%
Âmnio e córion	Basal	15	48,39	16	51,61	31	100
	Elevada	0	0	0	0	0	0
Trofoblasto	Basal	7	41,18	10	58,82	17	100
	Elevada	8	57,14	6	42,86	14	100
Hofbauer	Basal	15	48,39	16	51,61	31	100
	Elevada	0	0	0	0	0	0
Decídua	Basal	14	46,67	16	53,33	31	100
	Elevada	0	0	0	0	0	0

A Tabela 11 descreve os escores de expressão do marcador CASP-1 nos compartimentos analisados. A expressão foi basal na maioria dos compartimentos, exceto no trofoblasto, onde houve maior proporção de expressão elevada no grupo Caso (57,14%) em relação ao grupo Controle (42,86%). Esses resultados indicam uma potencial ativação localizada da via inflamatória associada ao marcador CASP-1, particularmente no trofoblasto de placentas expostas ao SARS-CoV-2/COVID-19. A figura 8 ilustra as características da reatividade imuno-histoquímica do biomarcador Caspase-1 na placenta.

**Figura 8** - Expressão imuno-histoquímica de Caspase-1

**Legenda:** A) Reatividade de Caspase-1 com moderada intensidade e distribuída em cerca de 60% das células da decídua basal (x10); B) Reatividade de Caspase-1 com moderada intensidade e distribuída em cerca de 80% do trofoblasto (x40).

**Fonte:** Acervo pessoal da autora.

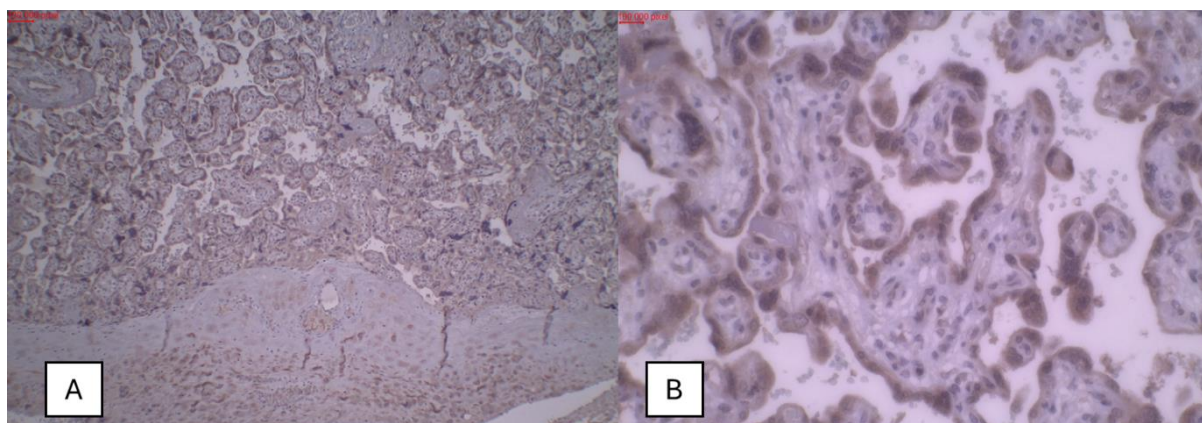
Considerando o produto das categorias da intensidade pela distribuição, somente o compartimento do trofoblasto da placenta apresentou escores de hiperexpressão do biomarcador Caspase-1.

A Tabela 12 apresenta os resultados da análise da expressão do marcador inflamatório IL-1 $\beta$  nos diferentes compartimentos da placenta, comparando as frequências de expressão basal e elevada entre os grupos Caso e Controle.

**Tabela 12** - Escore da Expressão Imuno-histoquímica de IL-1 $\beta$

Local	Expressão	Caso		Controle		Total	
		n	%	n	%	n	%
Âmnio e córion	Basal	14	46,67	16	53,33	30	100
	Elevada	0	0	0	0	0	0
Trofoblasto	Basal	4	50	4	50	8	100
	Elevada	10	45,45	12	54,55	22	100
Hofbauer	Basal	14	46,67	16	53,33	30	100
	Elevada	0	0	0	0	0	0
Decídua	Basal	14	46,67	16	53,33	30	100
	Elevada	0	0	0	0	0	0

A Tabela 12 apresenta os escores de expressão de IL-1 $\beta$ , um importante marcador inflamatório, nos compartimentos placentários. Assim como os marcadores anteriores, a expressão foi predominantemente basal, exceto no trofoblasto, onde a expressão elevada foi observada em maior proporção no grupo Controle (54,55%) do que no grupo Caso (45,45%). Este achado sugere que a ativação de IL-1 $\beta$ , embora moderada, pode não estar diretamente relacionada à exposição ao SARS-CoV-2/COVID-19. A figura 9 ilustra as características da reatividade imuno-histoquímica do biomarcador IL-1 $\beta$  na placenta.

**Figura 9** - Expressão imuno-histoquímica de IL-1 $\beta$ 

**Legenda:** A) Reatividade de IL-1 $\beta$  com moderada intensidade e distribuída em cerca de 50% das células da decídua basal (x10); B) Reatividade de IL-1 $\beta$  com moderada intensidade e distribuída em cerca de 100% do trofoblasto (x40).

**Fonte:** Acervo pessoal da autora.

Considerando o produto das categorias da intensidade pela distribuição, somente o compartimento do trofoblasto da placenta apresentou escore de hiperexpressão do biomarcador IL-1 $\beta$ .

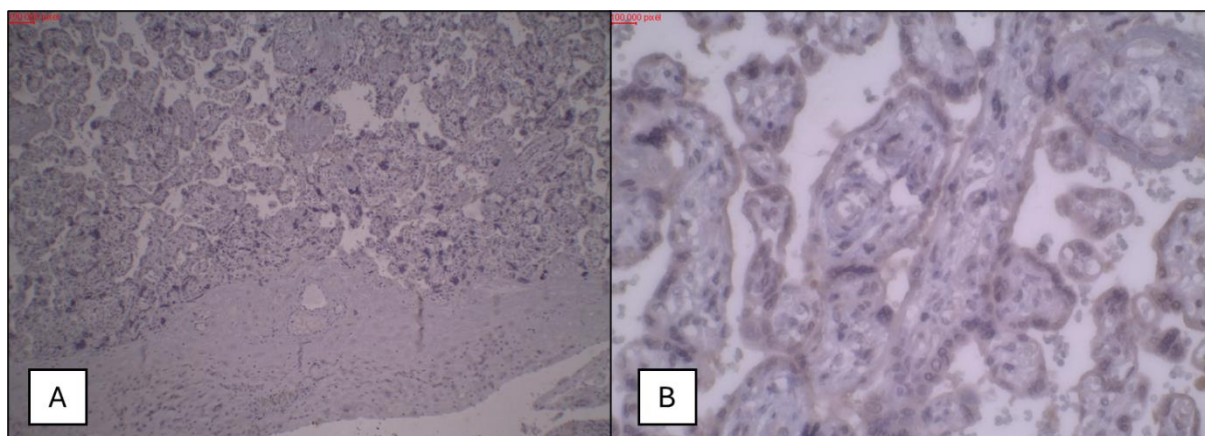
A Tabela 13 detalha os padrões de expressão do marcador IL-18 nos compartimentos placentários, com enfoque na identificação de diferenças entre os grupos expostos e não expostos ao SARS-CoV-2.

**Tabela 13** - Escore da Expressão Imuno-histoquímica de IL-18

Local	Expressão	Caso		Controle		Total	
		n	%	n	%	n	%
Âmnio e córion	Basal	14	46,67	16	53,33	30	100
	Elevada	0	0	0	0	0	0
Trofoblasto	Basal	5	62,5	3	37,5	8	100
	Elevada	9	40,91	13	59,09	22	100
Hofbauer	Basal	14	46,67	16	53,33	30	100
	Elevada	0	0	0	0	0	0
Decídua	Basal	14	46,67	16	53,33	30	100
	Elevada	0	0	0	0	0	0

A Tabela 13 resume os escores de expressão de IL-18 nos compartimentos placentários. Observou-se expressão basal na maioria dos compartimentos, com expressão elevada registrada apenas no trofoblasto. No grupo Controle, a expressão elevada foi ligeiramente mais prevalente (59,09%) do que no grupo Caso (40,91%). Esses resultados indicam uma ativação discreta do marcador IL-18 no trofoblasto, sem associação clara com a exposição ao SARS-CoV-2/COVID-19. A figura 10 ilustra as características da reatividade imuno-histoquímica do biomarcador IL-18 na placenta.

**Figura 10** - Expressão imuno-histoquímica de IL-18



**Legenda:** A) Reatividade de IL-18 com fraca intensidade e distribuída em cerca de 20% das células da decídua basal (x10); B) Reatividade de IL-18 com moderada intensidade e distribuída em cerca de 100% do trofoblasto (x40).

**Fonte:** Acervo pessoal da autora.

Considerando o produto das categorias da intensidade pela distribuição, somente o compartimento do trofoblasto da placenta apresentou escore de hiperexpressão do biomarcador IL-18.

Por fim, são apresentados os resultados dos escores imuno-histoquímicos dos biomarcadores RIG-1, CASP-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 de acordo com o padrão morfológico das lesões. A Tabela 14 compara a expressão do marcador RIG-1 entre padrões inflamatórios e padrões usuais.

**Tabela 14** - Expressão imuno-histoquímica de RIG-1 por padrão morfológico

Local	Expressão	Usual		Inflamatório		Total	
		n	%	n	%	n	%
Âmnio e córion	Basal	1	33,33	2	66,67	3	100
	Elevada	16	57,14	12	42,86	28	100
Trofoblasto	Basal	0	0	0	0	0	0
	Elevada	17	54,84	14	45,16	31	100
Hofbauer	Basal	7	58,33	5	41,67	12	100
	Elevada	10	52,63	9	47,37	19	100
Decídua	Basal	1	33,33	2	66,67	3	100
	Elevada	16	57,14	12	42,86	28	100

A Tabela 14 compara a expressão do marcador RIG-1 entre os padrões inflamatório e usual nos compartimentos analisados. A expressão elevada foi predominante em todos os compartimentos nos padrões inflamatório e usual, com maior proporção de expressão elevada observada nos grupos com padrão usual. Os achados sugerem que o padrão usual pode estar associado a uma regulação mais homogênea do RIG-1, mesmo em contextos inflamatórios.

A Tabela 15 avalia a expressão dos marcadores inflamatórios CASP-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 em padrões usuais e inflamatórios, explorando o papel desses mediadores no contexto de processos inflamatórios placentários.

**Tabela 15** - Expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores CASP-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 por padrão morfológico

Marcador	Expressão	Usual		Inflamatório		Total	
		n	%	n	%	n	%
CASP-1	Basal	11	64,71	6	35,29	17	100
	Elevada	6	42,86	8	57,14	14	100
IL-1 $\beta$	Basal	5	62,5	3	37,5	8	100
	Elevada	12	54,55	10	45,45	22	100
IL-18	Basal	4	50	4	50	8	100
	Elevada	13	59,09	9	40,91	22	100

A Tabela 15 apresenta a relação dos marcadores CASP-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 com os padrões usual e inflamatório. Observou-se que a expressão basal foi predominante para todos os marcadores no padrão usual, enquanto a expressão elevada foi mais frequente no padrão inflamatório. Estes resultados reforçam o papel desses marcadores na mediação de processos inflamatórios, com diferenças evidentes entre os padrões analisados.

As tabelas que apresentam os resultados detalhados das análises de imunorreatividade dos marcadores inflamatórios (NLRP3, RIG-1, IFN- $\gamma$ , CASP-1, IL-1 $\beta$  e IL-18) em diferentes compartimentos placentários, bem como suas respectivas distribuições e intensidades, foram incluídas em um anexo separado (ANEXO 1).

## 6 DISCUSSÃO

De forma geral, o estudo demonstrou a ausência da persistência do SARS-CoV-2 na placenta nos casos de COVID-19 leve e ocorrência de proporções maiores e estatisticamente não significativas de lesões inflamatórias, como corioamnionite e vasculite agudas, corroborando para um padrão inflamatório na placenta das gestantes expostas ao SARS-CoV-2, além das observações de hiperexpressão do RIG-1 e expressão basal de NLRP3 e IFN- $\gamma$  em todos os compartimentos da placenta e hiperexpressão dos biomarcadores Caspase-1 e IL-1 $\beta$  no trofoblasto, indicando ativação de Caspase-1 e IL-1 $\beta$  independente do inflamassoma NLRP3. Todos esses resultados foram obtidos seguindo as recomendações de boas práticas em pesquisa.

A presença do vírus SARS-CoV-2 na placenta humana tem sido objeto de estudos científicos desde o início da pandemia, havendo inúmeros trabalhos evidenciando a presença do vírus na placenta de mães infectadas e correlacionando com diversas alterações histopatológicas (ARGUETA, *et al.* 2022; BOYRAZ, *et al.* 2022; GLYNN, *et al.* 2022; SHARPS, *et al.* 2020). Entretanto, há outros estudos que observaram que não é comum a infecção feto-placentária em casos de mães com a doença (REAGAN-STEINER, *et al.* 2022; OLIVEIRA, *et al.* 2021). Outros ainda afirmam que a mesmo quando presente a infecção do

SARS-CoV-2 na placenta ocorre de maneira irregular, podendo não coincidir com o local da biópsia, e dependem da carga viral materna (HANNA, *et al.* 2021). Este presente trabalho após a realização de testes RT-PCR não identificou a presença viral nas placentas de ambos os grupos (caso e controle).

Mais detalhadamente sobre os resultados da análise histopatológica, a hipoplasia vilosa distal, que é caracterizada por ocorrer quando há uma diminuição no número adequado de ramificações do tronco viloso, afetando assim a quantidade de vilosidades coriônicas terminais e a troca entre o sangue fetal dentro dos capilares sanguíneos vilosos e o sangue materno do espaço interviloso (PARKS, 2007), foi a alteração é mais prevalente em placentas de fetos que tiveram crescimento intrauterino restrito durante a gestação (SPINILLO, *et al.* 2019). Estudos que comparam placentas de mães infectadas e não infectadas pelo SARS-CoV-2 afirmaram que o achado histopatológico de hipoplasia das vilosidades distais foram observados com mais frequência no grupo de mulheres que testaram negativo para COVID-19 (DEBELENKO, *et al.* 2021). Assim é necessário a análise pregressa completa para melhor interpretação, dados como peso ao nascer, idade gestacional ao nascimento e aspectos macroscópicos das placentas são de grande importância na correlação deste achado histopatológico. Justificando desta forma o resultado de não ter encontrado prevalência da hipoplasia vilosa distal em nenhum dos grupos de estudo.

Bouachba e colaboradores (2020) observaram que as principais alterações histopatológicas e que levam a um pior prognóstico fetal em casos de mães que contraíram COVID-19 durante a gestação, são a intervilosite, os trombos intervilosos e a deposição de fibrina, os autores relatam que tais alterações podem estar relacionadas à liberação aumentada de citocinas e não a um dano viral direto à placenta. Sabe-se que quando há deposição maciça de fibrina perivilosa as vilosidades ficam aprisionadas pelo material fibrinoide e tornam-se fibróticas e avasculares o que eleva o risco de efeitos adversos materno-fetais (SPINILLO, *et al.* 2019). No presente trabalho não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, havendo autores que afirmam que a fibrina intervilosa é parte fundamental da placenta a termo, fazendo o papel de ponte para realização de trocas intervilosas (LANIR, *et al.* 2003), sendo assim um achado pouco específico, por ser fisiológico, justificando assim o resultado encontrado de estar presente nos dois grupos estudados.

A corangiose além de estar relacionada ao aumento da morbimortalidade, está relacionada à hipoperfusão, sendo mais prevalente em placentas que sofreram hipóxia, de causas variadas como diabetes mellitus, tabagismo materno, crescimento intrauterino restrito, gestações múltiplas, anemia materna e pré-eclâmpsia (VAFEI, *et al.* 2021). Apesar de alguns estudos

associarem o achado com a infecção materna por COVID-19 (SHANES, *et al.* 2020). Neste trabalho não houve uma correlação estatisticamente significativa, possivelmente por se tratar de um achado de origem secundária à história clínica prévia das mulheres do estudo, tal qual o achado de congestão. Baergen (2007) afirma que a alteração está relacionada a uma perfusão sanguínea inadequada ou obstruções no fluxo de retorno venoso sendo uma resposta compensatória de dilatação ou estase sanguínea que pode estar relacionada a inúmeras comorbidades pregressas maternas.

O *bebbing* compreende o nome da vacuolização do citoplasma das células do âmnio (KURMAN, 2002) alteração com poucos relatos na literatura e poucas elucidções de possíveis correlações clínicas. O infarto viloso pode ser morfológicamente caracterizado pelo colapso do espaço interviloso com subsequente necrose coagulativa secundária à perda de fluxo sanguíneo interviloso (ERNST, 2018). Estudos correlacionam esse achado anatomopatológico com placentas infectadas pelo SARS-CoV-2 (MENTER, *et al.* 2020). Entretanto neste presente trabalho não houveram diferenças estatísticas entre os grupos, assim como quase não foi detectado (ausente em 29 casos e presente somente em 2 casos do grupo controle). Sabe-se que o achado de necrose é relativamente comum, principalmente nos últimos estágios da gravidez, e caso venha a ocorrer de forma multifocal e em grande parte do disco placentário pode levar à pré-eclâmpsia, retardo do crescimento fetal e alterações neurológicas fetais relacionadas à hipóxia (BECROFT, *et al.* 2002).

As calcificações representam uma lesão que pode representar efeitos adversos, visto que sua presença pode ocasionar um estreitamento progressivo dos vasos da placenta devido ao acúmulo de cálcio e fibrina, resultando na diminuição do fluxo sanguíneo materno-fetal e suas repercussões negativas (CHEN, *et al.* 2011). No entanto, há estudos na literatura que colocam o achado de calcificações como sendo apenas um preditor aumento de risco gestacional por não encontrarem relações estatisticamente significativas com desfechos neonatais adversos (QUINLAN, *et al.* 1982). Zhao e colaboradores (2022) observaram que apesar de haver associação da calcificação com o aumento da chance de gravidez de risco, não houve relação estatisticamente significativa do achado histopatológico com resultados neonatais adversos. No grupo de placentas incluídas neste trabalho a presença ou não da calcificação não se correlaciona exclusivamente com casos de mães que tiveram COVID-19 durante a gestação.

A patogênese proposta da maturação acelerada das vilosidades é a remodelação defeituosa das artérias espiraladas, levando à má perfusão da placenta, o que gera, conseqüentemente, perda de função por meio de estresse oxidativo, diminuição de área de superfície de troca, danos ao sinciciotrofoblasto e hipoxemia (BROSENS, *et al.* 2011).

Morfologicamente observa-se vilosidade hiperamaduras pequenas para a idade gestacional e aumento do número de nós sinciciais. É uma lesão predominantemente presente em casos de insuficiência placentária e pré-eclâmpsia (KHONG, *et al.* 2016). Estudos afirmam que a maturação vilosa acelerada encontrou-se aumentada nas placentas de mães com COVID-19 moderada e grave. Entretanto sabe-se que esta alteração histopatológica também pode ser observada em casos de doenças reumáticas maternas, hipertensão materna, gestação múltipla e tabagismo. Os riscos fetais incluem parto prematuro e descolamento prematuro da placenta (VOGEL, 2012). O presente não encontrou diferença estatisticamente significativa na comparação das placentas do grupo em as gestantes tiveram COVID-19 durante a gestação com o grupo controle, não houve também relato de casos de gravidade nas mães infectadas por SARS-CoV-2 do presente estudo.

A corioamnionite é caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório envolvendo âmion e córion da placa e/ ou membranas (BENIRSCHKE; KAUFMANN, 1995; FOX, 1997). A decíduite é caracterizada por um processo inflamatório somente na decídua (BENIRSCHKE; KAUFMANN, 1995). Sabe-se que a ocorrência destes processos inflamatórios entre as gestantes deve sempre ser levada em consideração por ter estreita correlação com aumento de risco para parto prematuro, além de estudos apontarem a possibilidade de indução de alterações no sistema cardiovascular, imunológico e nervoso do feto (GUSSENHOVEN, *et al.* 2018; MITCHELL, *et al.* 2018). Alguns estudos apontaram que a corioamnionite foi um achado relativamente comum nas placentas de mães que tiveram COVID-19 durante a gestação (SUHREN, *et al.* 2022). No presente trabalho não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos caso e controle, nem quanto a corioamnionite, nem quanto a decíduite, resultado este em semelhança a publicações que afirmam que mesmo para casos de mães que tiveram COVID-19 durante a gestação o achado histopatológico de corioamnionite é ocasionado principalmente por microrganismos ascendentes do trato genital inferior (CAPPELLETTI, *et al.* 2020). Outros estudos ainda apontam que no fluido genital de gestantes não identificou-se a presença do vírus SARS-CoV-2 indicando que quando a placenta encontra-se acometida o processo de invasão promovido pelo vírus é exclusivamente por via hematogênica (ASLAN, *et al.* 2020). Quanto a vasculite, tem-se que alguns trabalhos correlacionam a infecção do COVID-19 como indutora da trombose e da endotelite (CASELLA, 2020), entretanto não foi vista diferença estatisticamente significativa entre os grupos, podendo ser uma alteração relacionada às outras alterações histopatológicas inflamatórias como a decíduite e a corioamnionite, essa visão integrada já foi abordada em outros trabalhos (BLANC, 1981).

Na literatura pouco se discute sobre a capacidade regenerativa da placenta diante de agressões durante a gestação. Estudos realizados “*in vitro*” demonstraram que o tecido placentário foi capaz de restaurar o dano severo causado, ocorrendo a visualização da morte e reparação do sinciotrofoblasto (SIMÁN, *et al.* 2001). Assim, é possível que tenha existido alterações relacionadas ao dano placentário nas placentas estudadas, mas que foram resolvidos ao longo da gestação não sendo detectáveis na placenta a termo.

O inflamassoma NLRP3 é uma estrutura complexa do sistema imunológico inato, composta por proteínas que desempenham um papel central na resposta inflamatória. Que é ativado por uma variedade de estímulos, como patógenos, danos celulares e estresse, e está envolvido na liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e IL-18. Sabe-se que quando o inflamassoma NLRP3 encontra-se excessivamente ativado observa-se complicações gestacionais, como a restrição do crescimento fetal, pré-eclâmpsia e partos prematuros (ALFIAN, *et al.* 2022; SHIRASUNA, *et al.* 2020). Há especulações sobre a correlação do NLRP3 com a COVID-19 ter comportamento semelhante à pré-eclâmpsia (NUNES, *et al.* 2022). Contudo o presente trabalho mostrou uma ausência de ativação significativa do NLRP3 em diferentes compartimentos da placenta (âmnio, córion, trofoblasto, células de Hofbauer e decídua).

Os RLRs desempenham um papel fundamental no controle da resposta antiviral inflamatória durante uma gravidez saudável. Respostas inadequadas desses receptores podem resultar em uma infecção generalizada, enquanto uma atividade pró-inflamatória excessiva pode causar danos aos tecidos maternos (CORNISH, *et al.* 2020). Os resultado encontrados demonstram uma expressão imunohistoquímica elevada em vários compartimentos placentário, o que é congruente com a literatura, visto que a expressão de RIG-I no tecido placentário é essencial para a manutenção da gravidez normal (NIZYAEVA, *et al.* 2019) e explica a ausência de diferença significativa entre os grupos de estudo (caso e controle), uma vez que nenhuma das participantes apresentou casos graves de infecção por COVID-19.

Muito pouco se sabe sobre a regulação placentária da expressão de IFN- $\gamma$  e seus receptores na gravidez humana, sendo sabido apenas que está presente na placenta ao longo de toda a gestação (PAULESU, *et al.* 1994). No presente trabalho constatou-se que houve falta de ativação do IFN- $\gamma$  nas amostras analisadas, tanto grupo caso, quanto controle, o que pode-se inferir que esse marcador inflamatório não esteve envolvido significativamente nos processos inflamatórios nas condições avaliadas.

Há estreita correlação entre o aumento da Caspase-1 e o processo de destruição placentária, o estudo que correlacionam esse marcador inflamatório em placentas de mães que

tiveram COVID-19 afirma que a expressão de Caspase-1 encontra-se aumentada e pode ser ainda maior se tiver como comorbidade a pré-eclâmpsia associada. (BACHNAS, *et al.* 2023). Neste presente trabalho não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados.

A IL-1 $\beta$  é uma das principais citocinas inflamatórias associadas à obesidade e às complicações na gravidez (SENO, *et al.* 2017), sendo visto com expressão aumentada em gestantes com pré-eclâmpsia (RINEHART, *et al.* 1999). Entretanto sabe-se que quando secretado pelas diferentes células uterinas em níveis habituais é essencial nos processos de decidualização e implantação (PRUTSCH, *et al.* 2012). Sua correlação específica na placenta de mães infectadas com SARS-CoV-2 não é bem documentada na literatura, no presente trabalho apesar da expressão mais elevada no trofoblasto não foram observadas diferenças significativas entre as placentas caso e controle.

A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória predominantemente sintetizada por macrófagos e monócitos (HUANG, *et al.* 2005), e encontra-se presente na placenta, sendo expressa pelo córion e pela decídua (HUANG, *et al.* 2005). Os níveis séricos de IL-18 são significativamente elevados durante a gestação normal, com elevações ainda maiores no momento do parto e em algumas complicações gestacionais (IDA, *et al.* 2000; PACORA, *et al.* 2000). Assim como com a IL-1 $\beta$  carece estudos com sua correlação específica nas placentas de mães que tiveram COVID-19 durante a gestação. A análise deste mestrado não encontrou achados estatisticamente significativos sobre a expressão de IL-18.

Ao longo do seu desenvolvimento, o estudo apresentou limitações, como o número relativamente pequeno de participantes durante o período destinado à realização do subprojeto. Entretanto, o número de amostras examinadas se aproxima de outros estudos sobre a COVID-19 na gravidez. Quanto à história clínica pregressa das pacientes não houve a exclusão de pacientes com comorbidades, havendo a possibilidade de que tais achados clínicos como doenças crônicas tenham impactado no desenvolvimento da placenta. Outra limitação se deve exatamente ao número relativamente pequeno de estudos sobre patologia placentária no contexto da COVID-19 e também outras infecções virais, em particular quanto à análise imunohistoquímica de biomarcadores imunológicos e inflamatórios. Entretanto, essas limitações não prejudicaram as análises morfológicas e interpretações dos resultados.

## 7 CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados demonstram a não persistência do SARS-CoV-2 na placenta na COVID-19 leve e a presença de maiores proporções relativas de lesões inflamatórias não associadas ao inflamassoma NLRP3.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFSHAR, Y. et al. Clinical guidance and perinatal care in the era of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Journal of Perinatal Medicine*, v. 48, n. 9, p. 925–930, 2020.
- ALFARI, S.; AL-TAWFIQ, J.; MEMISH, Z. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infection during pregnancy: report of two cases & review of the literature. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 52, p. 501–503, 2019.
- ALFIERI, N.; MANODORO, S.; MARCONI, A. M. COVID-19 does not stop obstetrics: what we need to change to go on safely birthing: the experience of a University Obstetrics and Gynecology Department in Milan. *Journal of Perinatal Medicine*, v. 48, n. 9, p. 997–1000, 2020.
- ALFIAN, I. et al. O inflamossomo NLRP3 placentário e seus alvos a jusante, caspase-1 e interleucina-6, são aumentados na restrição do crescimento fetal humano: implicações para a disfunção trofoblástica induzida por inflamação aberrante. *Cells*, v. 11, p. 1413, 2022.
- ANDERSON, R. M. et al. How will country-based mitigation measures influence the course of the COVID-19 epidemic? *The Lancet*, v. 395, n. 10228, p. 931–934, 2020.
- AREIA, A. L.; MOTA-PINTO, A. Can immunity during pregnancy influence SARSCoV-2 infection? – A systematic review. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 142, p. 103215, nov. 2020.
- ARGUETA, L. B. et al. Inflammatory responses in the placenta upon SARS-CoV-2 infection late in pregnancy. *iScience*, v. 25, n. 5, 104223, 2022.
- ASHOKKA, B. et al. Care of the pregnant woman with coronavirus disease 2019 in labor and delivery: anesthesia, emergency cesarean delivery, differential diagnosis in the acutely ill parturient, care of the newborn, and protection of the healthcare personnel. *American Journal of Obstetrics Gynecology*, v. 223, n.1, p. 66-74, 2020.
- ASLAN, M. M. et al. SARS-CoV-2 is not present in the vaginal fluid of pregnant women with COVID-19. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, p. 1–3, 2020.
- BACHNAS, M. A. et al. Placental damage comparison between preeclampsia with COVID-19, COVID-19, and preeclampsia: analysis of caspase-3, caspase-1, and tumor necrosis factor-alpha expression. *AJOG Global Reports*, v. 3, n. 3, p. 100234, 2023.
- BAERGEN, Rebecca N. The placenta as witness. *Clinics in Perinatology*, v. 34, n. 3, p. 393–407, 2007.
- BECROFT, D. M. O.; THOMPSON, J. M. D.; MITCHELL, E. A. The epidemiology of placental infarction at term. *Placenta*, v. 23, p. 343–351, 2002.

BENIRSCHKE, K.; KAUFMANN, P. *Pathology of the human placenta*. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 1995.

BHARDWAJ, A. et al. COVID-19: immunology, immunopathogenesis and potential therapies. *International Reviews of Immunology*, v. 41, n. 2, p. 171-206, 2022.

BITTENCOURT, A. L. Infecções congênitas transplacentárias. In: BITTENCOURT, Achiléa Lisboa. Infecções congênitas transplacentárias. Rio de Janeiro: Revinter, 1995. p. 1-196

BLANC, W. A. Pathology of the placenta, membranes, and umbilical cord in bacterial, fungal, and viral infections in man. In: NAEYE, Richard L.; KISSANE, John M. (Ed.). International Academy of Pathology monograph: Perinatal diseases by 14 authors. Baltimore: Williams and Wilkins, 1981.

BOUACHBA, A.; ALLIAS, F.; NADAUD, B.; et al. Placental lesions and SARS-CoV-2 infection: diffuse placenta damage associated to poor fetal outcome. *Placenta*, v. 112, p. 97–104, 2021.

BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G. *Patologia*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

BOYRAZ, B.; JAMES, K.; HORNICK, J. L.; ROBERTS, D. J. Placental pathology from COVID-19 recovered (nonacute) patients. *Human Pathology*, v. 125, p. 18–20, 2022.

BROSENS, I.; PIJNENBORG, R.; VERCRUYSSSE, L.; ROMERO, R. The "Great Obstetrical Syndromes" are associated with disorders of deep placentation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 204, p. 193–201, 2011.

BRYANT, A. H.; MENZIES, G. E.; SCOTT, L. M.; et al. Human gestation-associated tissues express functional cytosolic nucleic acid sensing pattern recognition receptors. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 189, n. 1, p. 36–46, jul. 2017.

CAPPELLETTI, M.; PRESICCE, P.; KALLAPUR, S. G. Immunobiology of acute chorioamnionitis. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 649, 2020.

CARABELLI, A. M.; PEACOCK, T. P.; THORNE, L. G.; et al. SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nature Reviews Microbiology*, v. 21, p. 162–177, 2023.

CASELLA, I. B. Fisiopatologia da trombose associada à infecção pelo SARS-CoV-2. *Jornal Vascular Brasileiro*, v. 19, 2020.

CHEN, K. H.; CHEN, L. R.; LEE, Y. H. Exploring the relationship between preterm placental calcification and adverse maternal and fetal outcome. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, v. 37, n. 3, p. 328–334, 2011.

CHOI, C. W. Chorioamnionitis: is a major player in the development of bronchopulmonary dysplasia? *Korean Journal of Pediatrics*, v. 60, n. 7, p. 203–207, 2017.

CHOUDHURY, S. M.; MA, X.; ABDULLAH, S. W.; ZHENG, H. Activation and inhibition of the NLRP3 inflammasome by RNA viruses. *Journal of Inflammation Research*, v. 14, p. 1145–1163, 2021.

CORNISH, E. F.; FILIPOVIC, I.; ÅSENIUS, F.; et al. Innate immune responses to acute viral infection during pregnancy. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 572567, 2020.

COSTA, M. L.; SOUZA, R. T.; PACAGNELLA, R. C.; et al. REBRACO Study Group. Brazilian network of COVID-19 during pregnancy (REBRACO: a multicentre study protocol). *BMJ Open*, v. 11, n. 12, 2021.

CRACKOWER, M. A. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, v. 417, n. 6891, p. 822–828, 2002.

CREISHER, P. S.; LEI, J.; SHERER, M. L.; et al. Downregulation of transcriptional activity, increased inflammation, and damage in the placenta following in utero Zika virus infection is associated with adverse pregnancy outcomes. *Frontiers in Virology*, v. 2, art. 782906, 2022.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, p. 181–192, 2019.

DEBELENKO, L.; KATSYV, I.; CHONG, A. M.; et al. Trophoblast damage with acute and chronic intervillitis: disruption of the placental barrier by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Human Pathology*, v. 109, p. 69–79, 2021.

ERNST, L. M. Maternal vascular malperfusion of the placental bed. *APMIS*, v. 126, p. 551–560, 2018.

FARAL-TELLO, Paula; PAGOTTO, Romina; BOLLATI-FOGOLÍN, Mariela; FRANCIÁ, Maria. Modeling the human placental barrier to understand *Toxoplasma gondii*'s vertical transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 13, p. 1130901, 2023.

FOX, H. *Pathology of the placenta*. 2. ed. London: W.B. Saunders, 1997.

GARCIA, A. G. P. Infecções placentárias. In: GARCIA, Aparecida Gomes Pinto; AZOUBEL, Reynaldo. A placenta humana: Morfologia e patologia fetal e perinatal. Rio de Janeiro: Atheneu, 1986. p. 139–149.

- GIACOMO, K. Fisiologia placentária. In: GARCIA, Aparecida; AZOUBEL, Reynaldo. A placenta humana: Morfologia e patologia fetal e perinatal. Rio de Janeiro: Atheneu, 1986. p. 15-19.
- GLYNN, S. M.; YANG, Y. J.; THOMAS, C.; et al. SARS-CoV-2 and placental pathology: malperfusion patterns are dependent on timing of infection during pregnancy. *American Journal of Surgical Pathology*, v. 46, p. 51–57, 2022.
- GOMEZ-LOPEZ, N.; MOTOMURA, K.; MILLER, D.; et al. Inflammasomes: their role in normal and complicated pregnancies. *Journal of Immunology*, v. 203, n. 11, p. 2757–2769, 2019.
- GRECHUKHINA, O.; et al. Coronavirus disease 2019 pregnancy outcomes in a racially and ethnically diverse population. *American Journal of Obstetrics & Gynecology MFM*, v. 2, n. 4, p. 100246, 2020.
- GUSSENHOVEN, R. et al. Chorioamnionitis, neuroinflammation, and injury: timing is key in the preterm ovine fetus. *Journal of Neuroinflammation*, v. 15, n. 1, 2018.
- HANNA, N. et al. Underestimation of SARS-CoV-2 infection in placental samples. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 225, n. 5, p. 572-575.e1, nov. 2021.
- HU, B.; et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, p. 141–154, 2021.
- HUANG, X.; HUANG, H.; DONG, M. et al. Serum and placental interleukin-18 are elevated in preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 65, n. 1, p. 77-87, 2005.
- IDA, A.; TSUJI, Y.; MURANAKA, J. et al. IL-18 in pregnancy: the elevation of IL-18 in maternal peripheral blood during labour and complicated pregnancies. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 47, n. 1, p. 65-74, 2000.
- KHONG, T. Y.; MOONEY, E. E.; ARIEL, I.; et al. Sampling and definitions of placental lesions: Amsterdam placental workshop group consensus statement. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 140, p. 698–713, 2016.
- KURMAN, J. R. (Ed.). *Blaustein's pathology of the female genital tract*. 5. ed. New York: Springer, 2002.
- LAJOS, G. J. et al. Colonização bacteriana do canal cervical em gestantes com trabalho de parto prematuro ou ruptura prematura de membranas. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 30, n. 8, p. 393–399, 2008.

LANIR, N.; AHARON, A.; BRENNER, B. Haemostatic mechanisms in human placenta. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, v. 16, p. 183-195, 2003.

LAPINSKY, S. E. Acute respiratory failure in pregnancy. *Obstetric Medicine*, v. 8, p. 126–132, 2015.

LI, G.; et al. Coronavirus infections and immune responses. *Journal of Medical Virology*, v. 92, n. 4, p. 424–432, 2020.

LITTAUER, E. Q.; SKOUNTZOU, I. Hormonal Regulation of Physiology, Innate Immunity and Antibody Response to H1N1 Influenza Virus Infection During Pregnancy. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 2455, 29 out. 2018.

LIU, H.; et al. Why are pregnant women susceptible to COVID-19? An immunological viewpoint. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 139, p. 103122, 2020.

LIU, Y.; NING, Z.; CHEN, Z.; et al. Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature*, v. 582, n. 7813, p. 557–560, 2020.

MACIEL, G. Aspectos anatomoclínicos e laboratoriais de gestantes infectadas pelo HIV e expostas ao ZIKA vírus. Trabalho de conclusão de curso (Pós-Graduação em Patologia) – UFMG, Belo Horizonte, 2021.

MATTEO, M.; SALA, M. . Desenvolvimento e Estrutura da Placenta. In: GARCIA, Aparecida; AZOUBEL, Reynaldo. A placenta humana: Morfologia e patologia fetal e perinatal. Rio de Janeiro: Atheneu, 1986. p. 1-12.

MEHTA, O. P.; BHANDARI, P.; RAUT, A. et al. Coronavirus disease (COVID-19): comprehensive review of clinical presentation. *Frontiers in Public Health*, v. 8, p. 582932, 2021.

MENDES, A. L. G., JOAQUIM, H. D. M., ZAMAE, M. I. S. et al. Expression of NLRP3 inflammasome in leprosy indicates immune evasion of *Mycobacterium leprae*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2020; 115.

MENEZES, D. M. F.; LOPES, V. G. S.; MERÊNCIO, J. P. C.. Aspectos histopatológicos da placenta. In: GARCIA, Aparecida; AZOUBEL, Reynaldo. A placenta humana: Morfologia e patologia fetal e perinatal. Rio de Janeiro: Atheneu, 1986. p. 41-49.

MENTER, T.; et al. Achados de patologia placentária durante e após a infecção por SARS-CoV-2: características de vilosidade e má perfusão. *Pathobiology*, p. 1–9, 2020.

MITCHELL, T. et al. Evidence of cardiac involvement in the fetal inflammatory response syndrome: disruption of gene networks programming cardiac development in nonhuman primates. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 218, n. 4, p. 438, 2018.

MOURA, Erly Catarina; CORTEZ-ESCALANTE, Juan; CAVALCANTE, Fabrício Vieira; BARRETO, Ivana Cristina de Holanda Cunha; SANCHEZ, Mauro Niskier; SANTOS, Leonor Maria Pacheco. Covid-19: evolução temporal e imunização nas três ondas epidemiológicas, Brasil, 2020–2022. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, Brasil, v. 56, p. 105, 2022.

NIZYAEVA, N. V.; LOMOVA, N. A.; AMIRASLANOV, E. Y.; et al. Peculiarities of RIG-1 expression in placental villi in preeclampsia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 167, n. 6, p. 791–794, out. 2019.

NUNES, P. R. et al. COVID-19: A new risk factor or just a new imitator of preeclampsia? NLRP3 activation: A possible common mechanism. *Journal of Medical Virology*, v. 94, n. 5, p. 1813-1814, maio 2022.

OLIVEIRA, K. F. et al. Transmission vertical and COVID-19: scoping review. *Revista Brasileira de Enfermagem*, v. 74, Suppl. 1, e20200849, 2021.

PACORA, P.; ROMERO, R.; MAYMON, E.; et al. Participation of the novel cytokine interleukin 18 in the host response to intra-amniotic infection. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 183, n. 5, p. 1138–1143, 2000.

PARKS, W. T. Manifestations of hypoxia in the second and third trimester placenta. *Birth Defects Research*, v. 109, p. 1345–1357, 2007.

PAULESU, L. et al. First trimester human trophoblast expresses both interferon- $\gamma$  and interferon- $\gamma$ -receptor. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 27, p. 37-48, 1994.

PEREIRA, F. E. L.; PASCOAL-XAVIER, M. A. Etiogênese Geral das Lesões. In: BRASILEIRO FILHO Geraldo. *Bogliolo Patologia*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021. p. 31-64.

PERLMAN, S.; DANDEKAR, A. A. Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS. *Nature Reviews Immunology*, v. 5, n. 12, p. 917-927, dez. 2005.

PERLMAN, S. Another decade, another coronavirus. *New England Journal of Medicine*, v. 382, p. 760–762, 2020.

PETTIROSSO, E.; GILES, M.; COLE, S.; REES, M. COVID-19 and pregnancy: A review of clinical characteristics, obstetric outcomes and vertical transmission. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 60, n. 5, p. 640-659, 2020.

PRUTSCH, N.; FOCK, V.; HASLINGER, P.; et al. The role of interleukin-1 $\beta$  in human trophoblast motility. *Placenta*, v. 33, n. 9, p. 696–703, 2012.

- QUINLAN, R. W.; CRUZ, A. C.; BUHI, W. C.; MARTIN, M. Changes in placental ultrasonic appearance. I. Incidence of Grade III changes in the placenta in correlation to fetal pulmonary maturity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 144, p. 468–470, 1982.
- REAGAN-STEINER, S. et al. Detection of SARS-CoV-2 in Neonatal Autopsy Tissues and Placenta. *Emerging Infectious Diseases*, v. 28, n. 3, p. 510-517, 2022.
- REDLINE, Raymond. Placental pathology: a systematic approach with clinical correlations. ScienceDirect. *Placenta* 29, supplement A, Trophoblast Research, Vol. 22, S86 a S91. 2008.
- RICE, M.; NICOL, A.; NUOVO, G. J. The differential expression of toll-like receptors and RIG-1 in the placenta of neonates with in utero infections. *Annals of Diagnostic Pathology*, v. 62, art. 152080, fev. 2023.
- RICE, M.; TILI, E.; LOGHMANI, H.; NUOVO, G. J. The differential expression of toll-like receptors and RIG-1 correlates to the severity of infectious diseases. *Annals of Diagnostic Pathology*, v. 63, art. 152102, abr. 2023.
- RICHARDSON, S.; HIRSCH, J. S.; NARASIMHAN, M.; et al. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City area. *JAMA*, v. 323, n. 20, p. 2052–2059, 2020.
- RINEHART, B. K.; TERRENE, D. A.; LAGOO-DEENADAYALAN, S. et al. Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin  $1\beta$ , and interleukin 10 is increased in preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 181, n. 4, p. 915-920, 1999.
- ROBBINS, J. R.; BAKARDJIEV, A. I. Pathogens and the placental fortress. *Current Opinion in Microbiology*, v. 15, n. 1, p. 36–43, 2012.
- SENO, K.; SASE, S.; OZEKI, A.; et al. Advanced glycation end products regulate interleukin- $1\beta$  production in human placenta. *Journal of Reproduction and Development*, 2017, v. 63.
- SHANES, E. D. et al. Placental pathology in COVID-19. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 154, p. 23-32, 2020.
- SHANES, E. D. et al. Placental pathology after SARS-CoV-2 infection in the pre-variant of concern, Alpha / Gamma, Delta, or Omicron eras. *International Journal of Surgical Pathology*, v. 31, n. 4, p. 387-397, jun. 2023.

- SHARPS, D. F.; HAYES, D. J. L.; LEE, S.; et al. A structured review of placental morphology and histopathological lesions associated with SARS-CoV-2 infection. *Placenta*, v. 101, p. 13–29, 2020.
- SHARPS, E. D.; et al. Placental pathology in COVID-19. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 154, p. 23–32, 2020.
- SHARPS, D. F. et al. A structured review of placental morphology and histopathological lesions associated with SARS-CoV-2 infection. *Placenta*, v. 101, p. 13-29, 2020.
- SHIRBHATE, E.; et al. Understanding the role of ACE-2 receptor in pathogenesis of COVID-19 disease: a potential approach for therapeutic intervention. *Pharmacological Reports*, v. 73, n. 6, p. 1539–1550, 2021.
- SHIRASUNA, K.; KARASAWA, T.; TAKAHASHI, M. Role of the NLRP3 inflammasome in preeclampsia. *Frontiers in Endocrinology*, v. 11, p. 80, 2020.
- SIMÁN, C. M. et al. The functional regeneration of syncytiotrophoblast in cultured explants of term placenta. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v.4, 2001.
- SOUZA, R. T.; CECATTI, J. G.; PACAGNELLA, R. C.; et al. The COVID-19 pandemic in Brazilian pregnant and postpartum women: results from the REBRACO prospective cohort study. *Scientific Reports*, v. 12, 2022.
- SPINILLO, A.; GARDELLA, B.; MUSCETTOLA, G.; et al. The impact of placental massive perivillous fibrin deposition on neonatal outcome in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Placenta*, v. 87, p. 46–52, 2019.
- SUHREN, J.T.; et al. Meta-analysis on COVID-19-pregnancy-related placental pathologies shows no specific pattern. *Placenta*, v. 117, p. 72–77, 2022.
- SVENSSON-ARVELUND, J. et al. The placenta in toxicology. Part II: Systemic and local immune adaptations in pregnancy. *Toxicologic Pathology*, v. 42, n. 2, p. 327-338, 2014.
- TAKANO K, KONDO A, KUROSE M, YAMASHITA K, NOMURA K, OBATA K, MURAYAMA K, ITO F, HIMI T. Expression of Inflammasome-Associated Proteins in Human Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Adv Otorhinolaryngol*. 2016;77:98-104.
- TAVARES, C. L. C. et al. Relação entre restrição de crescimento intrauterino com infecção materna por Covid-19. *Brazilian Journal of Development*, v. 9, n. 6, p. 20037-20051, 2023.
- TAY, M. Z. et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*, v. 20, p. 363-374, 2020.

- VAF AEI, H.; KARIMI, Z.; AKBARZADEH-JAHROMI, M. Association of placental chorangiosis with pregnancy complication and prenatal outcome: a case-control study. *BMC Pregnancy and Childbirth*, v. 21, p. 2–8, 2021.
- VOGEL, M. Pathologie der Schwangerschaft, der Plazenta und des Neugeborenen. Pathologie. Springer, 2012. p. 510-583.
- WEEL, I. C.; ROMÃO-VEIGA, M.; MATIAS, M. L.; et al. Increased expression of NLRP3 inflammasome in placentas from pregnant women with severe preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 123, p. 40–47, set. 2017.
- WEI, S. Q.; BILODEAU-BERTRAND, M.; LIU, S.; AUGER, N. The impact of COVID-19 on pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Canadian Medical Association Journal*, v. 193, p. 540–548, 2021.
- WONG, S. F.; CHOW, K. M.; LEUNG, T. N.; et al. Pregnancy and perinatal outcomes of women with severe acute respiratory syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 191, p. 292–297, 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. Disponível em: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it). Acesso em: 8 dez. 2024.
- YANG, Penghui; WANG, Xiliang. COVID-19: a new challenge for human beings. *Cell & Molecular Immunology*, v. 17, n. 5, p. 555-557, 2020.
- YUAN, J. et al. Is there possibility of vertical transmission of COVID-19: A systematic review. *Translational Pediatrics*, v. 10, n. 2, p. 423-434, 2021.
- ZHAO, Y.; et al. Choosing placental hypoxic-ischemic measures that have clinical implications in child development and diseases. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, v. 35, n. 25, p. 7238–7247, 2022.
- ZHU, N.; et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, v. 382, p. 727–733, 2020.

### ANEXO 1 – DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS

Variável	Categoria	Descrição
Deposição de fibrina	0	Ausência de depósitos de exsudato fibrinoso
	1	Presença de depósitos de fibrina em 3% ou mais das vilosidade coriônica
Calcificação	0	Ausência de focos de calcificação
	1	Presença de pequenos focos (>5 focos) ou um grande foco de calcificação
Necrose	0	Ausência de necrose
	1	Presença de focos de necrose em 3% ou mais dos vilos
Hemossiderina	0	Ausência de depósitos de hemossiderina
	1	Presença de macrófagos (no mínimo uma célula) com depósitos de hemossiderina
Congestão	0	Ausência de congestão
	1	Presença de múltiplos focos de congestão em múltiplas áreas
Vilo avascular	0	Ausência de vilos avasculares
	1	Presença de vilos avasculares
Cariorrexe	0	Ausência de cariorrexe
	1	Presença de > 3 focos de 2 a 4 vilos terminais com extravasamento de eritrócitos nucleados
<i>Bebbing</i>	0	Ausência de vacuolização intracitoplasmática
	1	Vacuolização intracitoplasmática em múltiplos focos do âmnio
Fusão celular	0	Ausência de pseudo-estratificação colunar das células do âmnio
	1	Pseudo-estratificação colunar das células do âmnio em múltiplos focos
Perda das junções celulares	0	Ausência de alterações colunares nas células do âmnio
	1	Presença de alterações colunares em 30% ou mais das células do âmnio
Aterose	0	Ausência de macrófagos espumosos, ricos em lipídios, nos vasos decíduais
	1	Presença de macrófagos espumosos, ricos em lipídios, nos vasos decíduais






Necrose fibrinóide	0	Ausência de necrose fibrinóide nos vasos decíduais
	1	Presença de necrose fibrinóide nos vasos decíduais
Hipertrofia mural	0	Ausência de hipertrofia muscular nos vasos decíduais
	1	Presença de hipertrofia muscular nos vasos decíduais
Perivasculite	0	Ausência de perivasculite
	1	Presença de perivasculite
Infarto viloso	0	Ausência de infarto viloso
	1	Presença de infarto viloso
Trombo interviloso	0	Ausência de trombo viloso
	1	Presença de trombo viloso
Hemorragia intraparenquimatosa	0	Ausência de hemorragia intraparenquimatosa
	1	Presença de hemorragia intraparenquimatosa
Hemorragia subcoriônica	0	Ausência de hemorragia subcoriônica
	1	Presença de hemorragia subcoriônica
Aglutinação vilosa	0	Ausência de aglutinação vilosa
	1	Presença de aglutinação vilosa
Trombose vascular fetal	0	Ausência de trombose vascular fetal
	1	Presença de trombose vascular fetal
Corangioma	0	Ausência de corangioma
	1	Presença de corangioma
Corangiomatose	0	Ausência de corangiomatose
	1	Presença de corangiomatose
Hipoplasia placentária	0	Ausência de hipoplasia placentária
	1	Presença de hipoplasia placentária

## ANEXO 2 – PROTOCOLO DO ESTUDO REBRACO

Open access

Protocol

# BMJ Open Brazilian network of COVID-19 during pregnancy (REBRACO: a multicentre study protocol)

Maria Laura Costa <sup>1</sup>, Renato T Souza,<sup>2</sup> Rodolfo C Pacagnella,<sup>2</sup> Silvana F Bento,<sup>3</sup> Carolina C Ribeiro-do-Valle,<sup>3</sup> Adriana G Luz,<sup>4</sup> Giuliane J Lajos,<sup>4</sup> Silvia B Mazon,<sup>3</sup> Luis Bahamondes,<sup>3</sup> Fernanda G Surita <sup>5</sup>, Guilherme M Nobrega <sup>3</sup>, Thayna B Griggio,<sup>3</sup> Charles M'poca Charles <sup>2</sup>, Maria J Miele,<sup>3</sup> Ricardo P Tedesco,<sup>6</sup> Karayna G Fernandes,<sup>3,6</sup> Sergio Martins-Costa,<sup>7</sup> Frederico JA Peret,<sup>8</sup> Francisco E Feitosa,<sup>9</sup> Rosiane Mattar,<sup>10</sup> Evelyn Traina,<sup>10</sup> Edson V Cunha Filho,<sup>11</sup> Janete Vettorazzi,<sup>11</sup> Samira M Haddad,<sup>3</sup> Carla B Andreucci,<sup>12</sup> José Paulo Guida,<sup>13</sup> Mario D Correa Junior,<sup>14</sup> Marcos Augusto Bastos Dias,<sup>15</sup> Leandro G Oliveira,<sup>16</sup> Elias F Melo Junior,<sup>17</sup> Carlos AS Menezes,<sup>18</sup> Marília GQ Luz,<sup>19</sup> Jose Guilherme Cecatti <sup>3</sup>, REBRACO Study Group

**To cite:** Costa ML, Souza RT, Pacagnella RC, et al. Brazilian network of COVID-19 during pregnancy (REBRACO: a multicentre study protocol). *BMJ Open* 2021;11:e051284. doi:10.1136/bmjopen-2021-051284

► Prepublication history and additional supplemental material for this paper are available online. To view these files, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2021-051284>).

Received 15 March 2021  
Accepted 24 November 2021



© Author(s) (or their employer(s)) 2021. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to  
Dr Maria Laura Costa;  
[milaura@unicamp.br](mailto:milaura@unicamp.br)

## ABSTRACT

**Introduction** The aim of this study was to evaluate the clinical, epidemiological and laboratory aspects of SARS-CoV-2 infection during pregnancy and postpartum in 16 maternity hospitals.

**Methods and analysis** A prospective multicentre study, with five axes. First, the prevalence of SARS-CoV-2 infection among women admitted for childbirth will be described in a cross-sectional study. Second, maternal and perinatal outcomes will be assessed in a prospective cohort study including pregnant or postpartum women with suspected COVID-19. Third, a cohort of positive COVID-19 cases with sampling of a variety of biological material. Histopathological and viral analysis of biological maternal and neonatal samples will be performed, and the assessment of nutritional variables to evaluate the association between vitamin D and severity of infection. Fourth, a monitoring and evaluation committee to collect relevant healthcare information and plan actions in centres facing the pandemic. Furthermore, qualitative studies will be performed to study pregnant women, their families and health professionals. Fifth, an ecological study will monitor the number of live births, stillbirths and other outcomes to explore any trend among the periods before, during and after the pandemic. Data will systematically be collected in an electronic platform following standardised operational procedures. For quantitative study components, an appropriate statistical approach will be used for each analysis. For qualitative data, in-depth interviews recorded in audio will be transcribed, checking the text obtained with the recording. Subsequently, thematic analysis with the aid of the NVivo programme will be performed.

**Ethics and dissemination** Ethical approval was obtained (letters of approval numbers 4.047.168, 4.179.679 and 4.083.988). All women will be fully informed to sign the consent form before enrolment in the study. Findings will be disseminated through peer-reviewed journals and scientific conferences.

## Strengths and limitations of this study

- Consequences of the SARS-CoV-2 infection during pregnancy and postpartum are still not fully understood, especially in low-income and middle-income settings.
- Brazil's data on COVID-19 presented an extremely high number of maternal deaths, especially postpartum, with reported delayed healthcare.
- Early in the pandemic, the Brazilian Network for Studies in Reproductive and Perinatal Health, a team put together over 10 years ago, with experience in multicentre studies in maternal morbidity and preterm birth, established a collaborative multicentre approach in Brazil, Latin America, collaborating with WHO to understand impacts of the COVID-19 in pregnancy.
- The Rede Brasileira em Estudos do COVID-19 em Obstetricia study will perform extensive biological sample collection of COVID-19-positive cases, in order to add to current gaps in knowledge considering maternal-fetal transmission and postpartum risks of infection.
- A study protocol proposed during a pandemic of a new infection with uncertain consequences must consider that other relevant interventions might be implemented and available, such as vaccination. The coordinating team will be aware and prompt to consider amendments to the initial protocol and new sets of variables, if necessary.
- The REde BRASileira em estudos do COVID-19 em Obstetricia (REBRACO) study will perform extensive biological sample collection of COVID-19-positive cases, in order to add to current gaps in knowledge considering maternal-fetal transmission and postpartum risks of infection.