



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**MARYLANE DA SILVA VIANA**

**Avaliação de alterações na sinalização estrogênica e inflamatória em placentas de gestantes infectadas com o vírus SARS-CoV-2 no último trimestre de gestação: Em busca de marcadores preditivos de transtornos do neurodesenvolvimento.**

**FORTALEZA**

**2022**

MARYLANE DA SILVA VIANA

Avaliação de alterações na sinalização estrogênica e inflamatória em placentas de gestantes infectadas com o vírus SARS-CoV-2 no último trimestre de gestação: Em busca de marcadores preditivos de transtornos do neurodesenvolvimento.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Ciências Biológicas II.

Orientador: Profa. Dr<sup>a</sup>. Danielle Macêdo Gaspar

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- V668a Viana, Marylane da Silva.  
Avaliação de alterações na sinalização estrogênica e inflamatória em placentas de gestantes infectadas com o vírus SARS-CoV-2 no último trimestre de gestação : Em busca de marcadores preditivos de transtornos do neurodesenvolvimento. / Marylane da Silva Viana. – 2022.  
43 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

1. Inflamação. 2. Placenta. 3. Transtorno do Neurodesenvolvimento . 4. SARS-CoV-2. 5. Covid19. I. Título.

CDD 615.1

---

MARYLANE DA SILVA VIANA

Avaliação de alterações na sinalização estrogênica e inflamatória em placentas de gestantes infectadas com o vírus SARS-CoV-2 no último trimestre de gestação: Em busca de marcadores preditivos de transtornos do neurodesenvolvimento.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Ciências Biológicas II.

Aprovada em: .

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Danielle Macêdo Gaspar (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Francisco Herlanio Costa Carvalho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Rafaela Carneiro Cordeiro  
UTHEALTH HOUSTON

A Deus.

Aos meus Pais e sobrinho (filho de coração),  
Ângela, Gilberto e Ruan.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A Prof. Dr<sup>a</sup>. Danielle Macêdo Gaspar, pela excelente orientação, oportunidade e por sempre prontificar-se a dar uma solução para cada problema encontrado.

Aos professores participantes da banca de qualificação pelo direcionamento e ensinamentos.

Aos professores participantes da banca examinadora, Doutor Francisco Herlânio Costa Carvalho e Doutora Rafaela Carneiro Cordeiro e os suplentes, pelo tempo e pelas valiosas colaborações e sugestões.

As companheiras de jornada do Projeto SARS-CoV-2 que se tornaram minha família, Letícia Regia Almeida, Hoanna Castro e Renata Khedi.

A Pós-Doutora do laboratório de Neuropsicofarmacologia, Deniele Bezerra Lós, que incansavelmente me amparou e me ensinou o que esteve ao seu alcance.

Aos meus Pais por sempre acreditarem que a educação seria a melhor herança que poderiam me deixar e ao meu Sobrinho e filho de coração, Ruan, por sempre ser a minha inspiração e me dar força em cada passo dessa caminhada.

Ao meu companheiro João Vitor Andrade Gurgel que acreditou em mim, muitas vezes mais que eu mesma.

Aos amigos que não me deixaram viver apenas para pesquisa Barbára Saraiva e Rhuan Simplício.

Aos meus amigos do CPMGEF, Flávia de Azevedo Farzat, Adria Rodrigues, Vitor Rios e Landerson Uchôa que sempre enxergaram algo em mim.

Ao meu Grande Amigo Ernesto de Sousa Barroso e sua família, por sempre ter me acolhido como parte dela.

Aos Iniciantes científicos e colegas de laboratório que ajudaram na pesquisa direta e indiretamente.

A todos aqueles que contribuíram com a minha jornada.

“É necessário sempre acreditar que um sonho é possível, que o céu é o limite e você truta, é imbatível.” (RACIONAIS MC’S, 2002).

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Evidências acumuladas têm mostrado uma importante relação entre infecções virais na gravidez, especialmente pelo vírus influenza, e o risco aumentado para esquizofrenia. Não somente a presença do vírus, mas o processo inflamatório associado a este mostra-se um importante fator de risco para o surgimento de transtornos do neurodesenvolvimento. A barreira hemato-placentária é uma barreira mais permeável, em comparação à barreira hematoencefálica, permitindo a passagem para o feto de agentes infecciosos e substâncias químicas, como citocinas inflamatórias. Neste contexto, pesquisas apontam para a placenta como uma janela para o cérebro, podendo fornecer marcadores a serem utilizados na predição de transtornos neurodesenvolvimentais. **OBJETIVO:** Avaliar possíveis alterações em alvos relacionados à sinalização estrogênica e inflamatória em placentas de gestantes infectadas com o vírus SARS-CoV-2 no último trimestre de gestação. **METODOLOGIA:** Foram recrutadas gestantes no último trimestre de gestação, entre a 37ª e 40ª semanas de gestação, atendidas na emergência da Maternidade Escola Assis Chateaubriand da Universidade Federal do Ceará. As gestantes com e sem suspeita de COVID-19 foram submetidas à testagem e separadas em três grupos: controle, síndrome gripal (SG – com RT-PCR negativo para COVID-19) e COVID. Após o parto foram coletadas as placentas, dissecadas e armazenadas no laboratório. Após dissecação a placenta foi dividida em face materna (FM) e fetal (FF). Até o presente momento analisamos expressão de genes de interesse em placentas de 5 gestantes por grupo através da técnica de RT-PCR para determinação de proteínas inflamatórias e relacionadas à via de sinalização do estrógeno. **RESULTADOS:** Todos os nascimentos foram a termo, maioria por parto cesáreo, nenhuma criança teve baixo peso ao nascer, maioria do sexo feminino e nenhuma teve score de apgar abaixo de 8. Os resultados da expressão gênica dos RNAm dos marcadores selecionados mostram que na FM do grupo COVID houve aumento significativo na expressão do proto-oncogene tirosina-proteína quinase (SRC), uma proteína intracelular ativada por receptores de estrógeno tendo importante papel no desenvolvimento embrionário e crescimento celular, e na FF do fator nuclear kappa B (NF-kB), um fator de transcrição para inflamação e estresse oxidativo, em relação ao controle. A interleucina (IL)-6 teve uma tendência de aumento em torno de 4 vezes em relação ao controle tanto no grupo SG como COVID. **CONCLUSÃO:** Os resultados obtidos apontam para a presença de alterações inflamatórias na placenta de gestações com exposição ao vírus SARS-CoV-2, bem como no caso da IL-6 também relacionado a outros vírus respiratórios, o que aponta para uma possível exposição do feto a um ambiente pró-inflamatório sendo um fator de risco para o desenvolvimento de transtornos do neurodesenvolvimento.

**PALAVRAS-CHAVE:** Inflamação; Placenta; Transtornos do Neurodesenvolvimento; SARS-CoV-2.

## ABSTRACT

### **Assessment of changes in estrogen and inflammatory signaling in placentas of pregnant women infected with the SARS-CoV-2 virus in the last trimester of pregnancy: In search of predictive markers of neurodevelopmental disorders.**

**INTRODUCTION:** Accumulating evidence has shown a significant relationship between viral infections in pregnancy, especially the influenza virus, and increased risk for schizophrenia. Not only the presence of the virus, but the inflammatory process associated with it, is a significant risk factor for the emergence of neurodevelopmental disorders. The blood-placental barrier is more permeable than the blood-brain barrier, allowing the fetus to pass infectious agents and chemicals, such as inflammatory cytokines. In this context, research points to the placenta as a window to the brain, which may provide markers to predict neurodevelopmental disorders. **OBJECTIVE:** To evaluate possible changes in targets related to estrogen and inflammatory signaling in the placentas of pregnant women infected with the SARS-CoV-2 virus in the last trimester of pregnancy. **METHODOLOGY:** Pregnant women were recruited in the last trimester of pregnancy, between the 37th and 40th weeks of pregnancy, at the emergency room of the Federal Maternity School Assis Chateaubriand of the Federal University of Ceará. Pregnant women with and without suspected COVID-19 were tested and separated into three groups: control, flu syndrome (GS - with negative RT-PCR for COVID-19), and COVID. After delivery, placentas were collected, dissected, and stored in the laboratory. After dissection, the placenta was divided into maternal (FM) and fetal (FF) sides. So far, we have analyzed the expression of genes of interest in the placentas of 5 pregnant women per group using the RT-PCR technique to determine inflammatory proteins and proteins related to the estrogen signaling pathway. **RESULTS:** All births were at term, most by cesarean section, no child had low birth weight, most were female, and none had an Apgar score below 8. The results of the mRNA gene expression of the selected markers show that in FM in the COVID group, there was a significant increase in the expression of the proto-oncogene tyrosine-protein kinase (SRC), an intracellular protein activated by estrogen receptors having an important role in embryonic development and cell growth, and in the FF of the nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), a transcription factor for inflammation and oxidative stress, relative to control. Interleukin (IL)-6 tended to increase around 4-fold compared to control in both the SG and COVID groups. **CONCLUSION:** The results obtained point to the presence of inflammatory changes in the placenta of pregnancies with exposure to the SARS-CoV-2 virus, as well as in the case of IL-6 also related to other respiratory viruses, which points to possible exposure of the fetus to a pro-inflammatory environment being a risk factor for the development of neurodevelopmental disorders.

**Keywords:** Inflammation; Placenta; Neurodevelopment; SARS-CoV-2.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Fotografia de placenta humana.....	20
Figura 2	– Taxonomia dos membros da família Coronaviridae.....	23
Figura 3	– Vias de sinalização do estrogênio.....	26
Figura 4	– Vias canônica e não canônica de sinalização do estrogênio.....	27
Figura 5	– Envolvimento molecular do receptor tipo 1 da angiotensina na inflamação.....	28
Figura 6	– Ações do NFKB na placenta saudável e pré-eclâmptica.....	29
Figura 7	– Fluxograma de organização dos grupos da pesquisa.....	33
Figura 8	– Expressão gênica relativa de Src na placenta.....	39
Figura 9	– Expressão gênica relativa de RELA na placenta.....	40
Figura 10	– Expressão gênica relativa de GPER na placenta.....	40
Figura 11	– Expressão gênica relativa de AGTR1 na placenta.....	41
Figura 12	– Expressão gênica relativa de IL-6 na placenta.....	42
Figura 13	– Análise relativa de proteína na face fetal e na face materna das proteínas: GPER, AKT total, ERK total e NF-KBp65.....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequencia de nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados para expressão gênica por reação em cadeia de polimerase (PCR).....	36
Tabela 2 – Características sociodemográficas das participantes.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang II	Angiotensina II
BSA	Albumina de soro bovino
CA <sup>2+</sup>	Cálcio
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclica
cDNA	DNA complementar
E1	Estrona
E2	Estradiol
E3	Estriol
ECA2	Enzima conversora de angiotensina II
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ER	Receptor de estrógeno
ERK1/2	Quinase 1/2 regulada por sinal extracelular
ER $\alpha$	Receptor de estrógeno alfa
ER $\beta$	Receptor de estrógeno beta
GPER	Receptor de estrógeno ligado a proteína G
IL-6	Interleucina 6
IP3	Inositol trifosfato
MAPK	Proteína-quinase ativada por mitógenos
MIA	Ativação Imune Materna
NF-KB	Fator Nuclear kappa B
°C	Graus Celsius
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PE	Pré-eclampsia
RNA	Ácido ribonucleico
Src	Proto-Oncogene, Não Receptor Tirosina Quinase
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TMPRSS2	Protease serina transmembrana 2

## LISTA DE SÍMBOLOS

\$	Dólar
%	Porcentagem
£	Libra
¥	Iene
€	Euro
§	Seção
©	Copyright
®	Marca Registrada

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	
1.1 Eixo placenta-cérebro fetal e sua relevância para a identificação, prevenção e tratamento de doenças cerebrais do feto	19
1.2 Placenta	19
1.3 SARS-CoV-2	21
1.4 Estrogênio e seus receptores na regulação da função placentária	25
1.5 Receptores placentários e seus papéis no desenvolvimento placentário	25
1.5.1 <i>GPER, o receptor de estrógeno acoplado à proteína G</i>	25
1.5.2 <i>Receptor tipo I da angiotensina (AGTIR) e seu papel no desenvolvimento placentário</i>	27
1.6 Citocinas Inflamatórias na gravidez e risco para doenças do neurodesenvolvimento	29
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivo específico	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Tipo de pesquisa	33
4.2 Local, população e amostra	33
4.3 Critérios de inclusão e exclusão	34
4.4 Coleta de dados	34
4.5 Análise das amostras	34
4.5.1 Dissecção da placenta	35
4.5.2 Extração e quantificação de proteína total das amostras	35
4.5.3 Western Blot	36
4.5.4 <i>Reação em Cadeia de Polimerase</i>	36
4.6. Aspectos éticos e legais da pesquisa	37
4.7 Análise estatística	37
5. RESULTADOS	38
5.1 Análise da Expressão Gênica	38
5.2 Análise da expressão proteica	42
6. DISCUSSÃO	44
REFERÊNCIAS	
APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO	
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO	

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Eixo placenta-cérebro fetal e sua relevância para a identificação, prevenção e tratamento de doenças cerebrais do feto**

A placenta é um órgão temporário e complexo com função crítica na reprodução dos mamíferos. Durante a gestação ela age como o pulmão, fígado, intestino e rins do feto. Também modula a fisiologia e o metabolismo maternos devido a importantes ações endócrinas, sendo capaz de secretar mais de 100 hormônios peptídicos e esteróides que proporcionam um ambiente único para o desenvolvimento do feto (BEHURA et al, 2019).

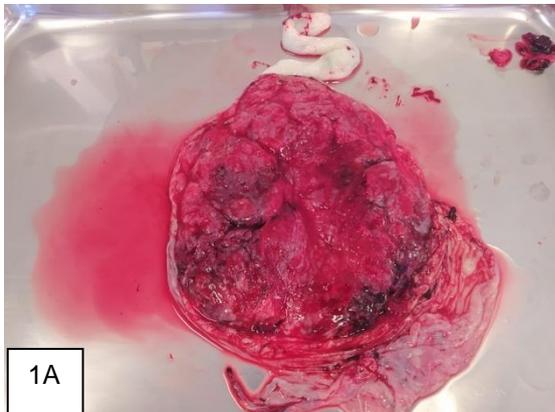
Na gravidez, a placenta é vulnerável a várias condições intrínsecas e extrínsecas que podem resultar em aumento do risco de transtornos do neurodesenvolvimento fetal, bem como morte fetal. A placenta controla a secreção neuroendócrina no cérebro fetal como forma de protegê-lo de exposições a um microambiente adverso que pode causar uma reprogramação fetal. Neste contexto, a placenta otimiza o desenvolvimento fetal e outras alterações fisiológicas necessárias para o sucesso reprodutivo (BEHURA et al, 2019).

Há uma grande lacuna no conhecimento sobre a interação funcional em nível de sistemas entre o cérebro fetal e a placenta. Apesar disso, presume-se a possibilidade de modular receptores ou vias de sinalização placentária, com o intuito de prevenir ou tratar alterações no cérebro fetal. Antes disso, é necessário que sejam estabelecidas correlações entre alterações placentárias e déficits no desenvolvimento cerebral do feto/criança com o intuito de possibilitar o desenvolvimento destas estratégias de prevenção/tratamento. Estas estratégias trarão grande avanço na medicina de precisão voltada para a saúde do feto/criança (BEHURA et al, 2019).

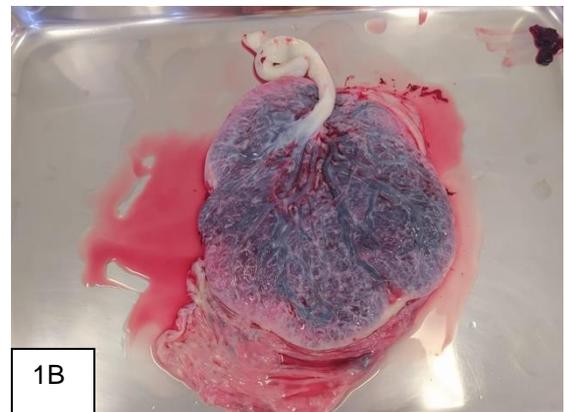
### **1.2 Placenta**

Foram necessárias mudanças na morfologia e fisiologia do sistema reprodutor para o surgimento da classe dos mamíferos. Nos ovíparos o ovo fertilizado deve sobreviver com suas reservas energéticas, para isso tem-se a gema. Na viviparidade, um órgão temporário é desenvolvido, para dar suporte contínuo ao desenvolvimento do feto, fornecendo água, gases, nutrientes, mediação hormonal e defesa imunológica que são funções que apenas a placenta pode cumprir (ROBERTS; GREEN; SCHULZ, 2016).

**FIGURA 1 - FOTOGRAFIA DE PLACENTA HUMANA**



FONTE: ARQUIVO DO AUTOR



FONTE: ARQUIVO DO AUTOR

1A) Face materna da placenta. 2A) Face fetal da placenta com cordão umbilical

No humano, durante a segunda semana de gestação, o trofoblasto divide-se em duas camadas: o citotrofoblasto, um trofoblasto celular; e o sinciotrofoblasto, uma camada sincicial periférica expansiva. Estes, associados ao mesoderma extraembrionário e ao útero iniciam a formação da placenta (SCHOENWOLF et al, 2016).

A placenta além de suprir as necessidades para o desenvolvimento do feto também deve evitar que agentes potencialmente perigosos que circulam no sangue materno entrem em contato com o ser em formação, atividades distintas que a placenta é capaz de realizar graças a sua arquitetura e organização dos sinciotrofoblastos. A placenta madura compreende uma massa de vilosidades fetais que se projetam para um espaço interviloso revestido por sinciotrofoblastos que garantem sua característica de invasão ao tecido materno sem a sua eventual rejeição. A placenta divide-se então em uma face fetal e uma face materna, apresentadas na Figura 1 (STAUD; KARAHODA, 2018).

Cerca de 100 artérias espiraladas realizam a entrada de sangue materno nos espaços intervilosos, permitindo a entrada de cerca de 150 mL de sangue materno, que é substituído de 3 a 4 vezes por minuto, deixando os espaços intervilosos pelas veias endometriais (SCHOENWOLF et al, 2016).

Não é correta a ideia de que a placenta confere ao feto uma barreira. A placenta é uma barreira bem mais permeável quando comparada à barreira hematoencefálica. Assim, algumas doenças que normalmente seriam facilmente debeladas pelo sistema imune, podem

ser um grande problema para o feto, gerando infecções e colocando a gestação em risco (HEEREMA-MCKENNEY, 2018).

A transmissão materno-fetal de patógenos pode ocorrer por quatro vias diferentes: através do endotélio vascular materno para os trofoblastos extravilosos endoplacentários, através de macrófagos maternos infectados que também infectam os trofoblastos placentários, por infecção ascendente do trato urogenital, e por fim por rotas paracelulares do sangue materno para capilares fetais (LÉON-JUÁREZ et al, 2017).

Quando a transmissão materno-fetal de patógenos é bem-sucedida o feto está sujeito a infecções. As infecções da gravidez são objeto de estudos há décadas. Em 1971, o imunologista Andres Nahmias usou pela primeira vez o acrônimo TORCH para se referir a um grupo de infecções fetais; são elas: toxoplasmose (To), rubéola (R), citomegalovírus (C) e a herpes simplex (H), Posteriormente em 1975, Harold Fuerst propôs adicionar a sífilis na lista de doenças deste acrônimo e revisar a sigla para STORCH. Atualmente a letra O, em maiúsculo, desvinculou-se de toxoplasmose e representa “Outras infecções”, a Zika é um exemplo destas (LEUNG et al, 2020).

No Brasil, as infecções congênitas são alvo de interesse da Saúde Pública, visto seu potencial de impacto na morbimortalidade de recém-nascidos e os custos que o mesmo produz. Tais infecções podem causar efeitos teratogênicos, que levam a aborto, malformações, restrições de crescimento intrauterino, entre outros (LIMA, 2018).

Além da transferência do próprio patógeno, a placenta permite a transferência bidirecional de citocinas inflamatórias como a interleucina (IL)-6, que pode conferir, dependendo das suas concentrações, risco adicional ao feto (ZARETSKY, 2004).

Outras situações também conferem risco à gravidez e ao feto, como, a diabetes, síndromes hemorrágicas, doenças autoimunes e síndromes hipertensivas, como a pré-eclâmpsia que está associada a substancial morbimortalidade materna e fetal e caracteriza-se por placentação defeituosa, isquemia na placenta, estresse oxidativo na interface materno-fetal e desequilíbrio angiogênico que gera dano endotelial (PHIPPS et al, 2019).

### **1.3 SARS-CoV-2**

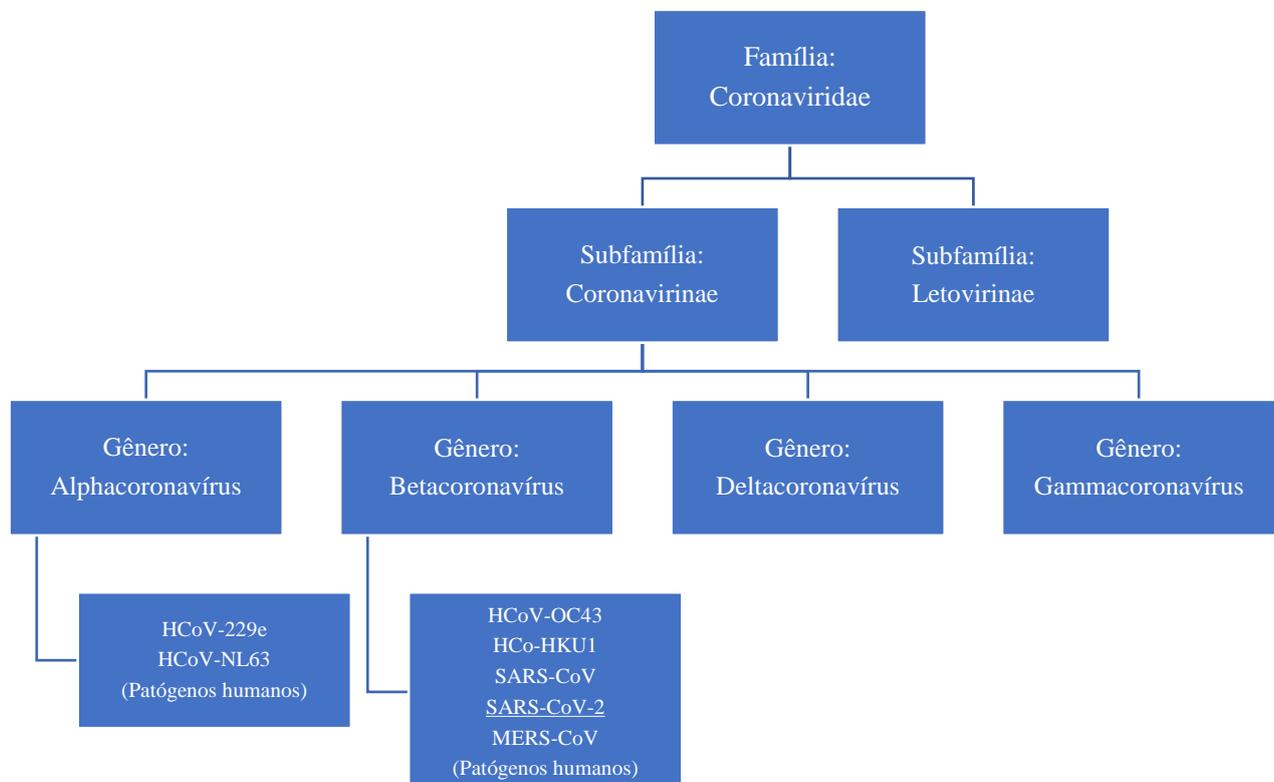
Em Dezembro de 2019, no dia 31, a Organização Mundial da Saúde foi alertada acerca de diversas notificações de pneumonias na região de Wuhan. Um novo tipo de Coronavírus havia surgido (BRASIL, 2022).

Os membros da Família Coronaviridae são vírus de RNA de fita simples positiva

envelopados. Todos os coronavírus compartilham semelhanças em sua estrutura, são elas: uma grande glicoproteína de membrana homotrimérica chamada Proteína Spike S, uma Glicoproteína de Membrana M, a proteína do Envelope E e a proteína N do nucleocapsídeo, uma fosfoproteína de ligação ao RNA (ICTV, 2021).

A primeira cepa de Coronavírus humano (HCoV) foi isolada em 1965, da secreção nasal de um paciente até então com um resfriado comum. Desde então mais de 30 cepas do Coronavírus humano foram identificadas. Entre 2002 e 2003 houve a descoberta de um Coronavírus (SARS-CoV) altamente patogênico, capaz de causar um quadro de síndrome respiratória aguda grave. Após a descoberta do SARS-CoV, como ficou conhecido, mais duas cepas de Coronavírus zoonóticos capazes de infectar humanos de forma grave foram descobertos. As cepas dão origem às doenças conhecidas como: síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) descoberto em 2012, e o novo coronavírus de 2019 (SARS-CoV-2) em Wuhan (LIU; LIANG; FUNG, 2021). Sua taxonomia, assim como alguns exemplos de Coronavírus humano pode ser visualizada na Figura 2.

**FIGURA 2 – TAXONOMIA DOS MEMBROS DA FAMÍLIA CORONAVIRIDAE**



FONTE: ICTV, 2021.

Segundo o Painel da Organização Mundial da Saúde, até 13 de Junho de 2022, o SARS-CoV-2 causou 611.421.786 casos confirmados, com 6.512.438 óbitos em todo o mundo. Sendo a Europa o continente mais afetado, e o Brasil teve 34.607.947 casos confirmados e 685.604 óbitos (OMS, 2022).

A transmissão do vírus após análise de evidências científicas foi definida por três modos: contato, gotículas e aerossóis. Na transmissão por contato, a infecção é transmitida por contato direto com pessoas ou objetos e superfícies contaminadas, e seguido de toque em regiões revestida por mucosa como nariz e boca. Para a transmissão por gotículas é necessária a exposição a material respiratório expelido contendo vírus, situação comum em processo de tosse ou espirro, com uma maior probabilidade de contaminação, quando a mesma está a menos de um metro de distância. Na transmissão por aerossóis, o material respiratório expelido contendo o vírus é menor e pode passar horas suspenso no ar e são carregadas por mais de um metro de distância (BRASIL, 2021).

A infecção pelo SARS-CoV-2 pode variar de quadros assintomáticos a quadros graves que evoluem para óbito. Os sintomas mais comuns incluem febre, tosse seca, dispneia, fadiga, alterações do paladar e perda de olfato, contudo outros sintomas também foram atribuídos a esse quadro infeccioso, são eles: dor de cabeça, dor de garganta, rinorreia e distúrbios gastrointestinais semelhantes a um quadro de infecção gastrointestinal. Sintomas graves também foram identificados, entre eles, hipoxemia, síndrome do desconforto respiratório agudo, complicações tromboembólicas e síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (AGUIAR et al, 2021).

Após a entrada no corpo humano, o SARS-CoV-2, adere às células do epitélio respiratório superior, graças ao reconhecimento e ligação da proteína viral e superfície, denominado Proteína S, ao receptor no tecido (BRITO et al, 2020). A enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2), é uma metaloprotease que exerce função catalítica essencial no sistema renina-angiotensina sendo um receptor essencial na fusão celular nas infecções por coronavírus in vivo. A ECA2 foi identificada em 2000 e está localizada no cromossomo X, mais precisamente na localização cromossômica Xp22 (IMAI; KUBA; PENNINGER, 2007).

O SARS-CoV-2 infecta principalmente células que expressam o receptor da enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2) e a enzima proteolítica Serina Protease Transmembrana 2 (TMPRSS2), tais como, pneumócitos (SANTOS; TAVARES; MENGEL, 2020). Células da mucosa oral também são acometidas, visto sua maior expressão de ECA2,

e representam um alto potencial de disseminação do vírus, tal fato pode representar um fator para as alterações gustativas presentes no curso da doença (PORTO et al, 2021).

Após o reconhecimento do receptor, o envelope viral funde-se à membrana citoplasmática, segue para o citoplasma e libera ácido ribonucléico (RNA) viral de fita simples esta ação inicia o processo de replicação viral. O material viral une-se ao retículo endoplasmático e posteriormente é encaminhado ao complexo de Golgi. Ao fim, há liberação por brotamento. A replicação acontece de forma mais ativa nas células epiteliais respiratórias do tipo 1 e 2. Esse novo material viral pode invadir a corrente sanguínea, causando disseminação por via hematogênica, proporcionando o pico de viremia (BRITO et al, 2020).

Shook (2021) e grupo, em análise de 68 placentas (38 positivas para infecção por SARS-CoV-2 e 30 negativas) verificaram a expressão de ECA2 e TMPRSS2 no tecido placentário. Houve uma expressão não sobreposta de ECA2 e TMPRSS2 dentro da placenta e uma expressão mais fraca de TMPRSS2 em comparação com ECA2. Entretanto, um achado interessante foi a expressão mais elevada de TMPRSS2 em placentas masculinas em comparação placentas femininas, sugerindo uma maior expressão de TMPRSS2 basal em homens.

#### **1.4 Estrogênio e seus receptores na regulação da função placentária**

Os estrogênios são os principais hormônios sexuais femininos. Exercem efeitos em diversos sistemas fisiológicos além do reprodutivo, dentre eles, tegumentar, cardiovascular, nervoso central, imunológico, metabólico, esquelético e excretor. Em humanos, três formas de estrogênios são sintetizadas, Estrona (E1), Estradiol (E2) e Estriol (E3), que são sintetizados no retículo endoplasmático liso a partir do Colesterol (C-27) (ROUHIMOGHADAM et al, 2020).

Os receptores de estrogênio (ER) são membros da superfamília de receptores nucleares e possuem dois subtipos. O receptor de estrogênio do tipo Alfa (ER $\alpha$ ), que é expresso majoritariamente no útero, ovário, testículo, fígado, coração e rim, está relacionado à promoção da progressão do ciclo celular e proliferação celular. E o receptor de estrogênio do tipo Beta (ER $\beta$ ), que é expresso no ovário, útero, testículos, próstata, pulmão, trato gastrointestinal, bexiga, sistemas hematopoiético e nervoso central e está relacionado a efeitos antagônicos ao ER $\alpha$ , sendo considerado assim antiproliferativo e pró-apoptótico (SAMPAIO, 2020).

Ambas as isoformas também podem ser expressas em tecidos como glândulas

mamárias, osso e regiões do cérebro. Os receptores que são constituídos por proteínas do tipo transmembrana recebem esse sinal na superfície da célula-alvo (SAMPAIO, 2020). Na década de 1950, Elwood V. Jensen, considerado o Pai dos receptores nucleares, descobriu o receptor de estrogênio e posteriormente seu receptor nuclear (O'MALLEY; KHAN, 2013). Cerca de 40 anos depois, pesquisadores encontram um receptor órfão que após extensas pesquisas identificam este como sendo o receptor acoplado à Proteína G de estrogênio (GPER).

## 1.5 Receptores placentários e seus papéis no desenvolvimento placentário

### 1.5.1 GPER, o receptor de estrógeno acoplado à proteína G

Um grupo de pesquisadores norte-americanos apresentaram resultados de experimentos com uma linhagem de células de câncer de mama, conhecidas como SKBR3, que até a época, não possuíam receptores de estrógeno conhecidos. Um receptor até então órfão tornou-se um candidato, visto sua capacidade de ser expresso e intermediar a sinalização na ativação, dependente de estrogênio, da adenilato ciclase e do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (THOMAS et al, 2005).

O GPER é um receptor de membrana com sete domínios transmembrana acoplados à proteína G e conta com um complexo heteromérico com 3 subunidades,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Quando há ligação do hormônio, acontece uma modificação conformacional que resulta no desacoplamento da subunidade  $G\alpha$  do Complexo  $G\beta\gamma$  (SILVA, 2014).

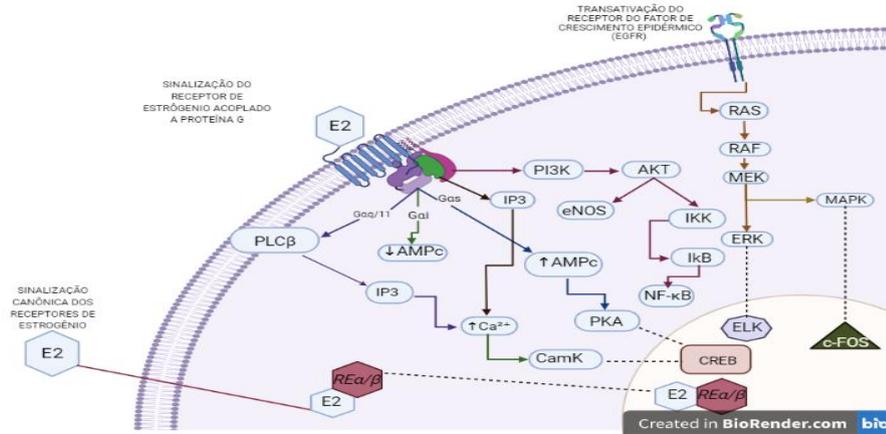
Apesar de ser um receptor de membrana e por assim, presumir que este se apresenta na membrana plasmática, fortes evidências mostram que ele está localizado em compartimentos intracelulares, como o retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e inclusive na membrana nuclear de células cancerígenas que expressam GPER (LUO; LIU, 2020).

A ligação do GPER ao estrógeno ativa a proteína-quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2), essas proteínas participam de diversos processos como: adesão celular, progressão do ciclo celular, migração celular, sobrevivência celular, diferenciação, metabolismo, proliferação e transcrição (ROSKOSKI, 2012).

Essa ativação do GPER ao estrógeno induz o aumento da fosforilação dos canais Cav 1.3 levando ao aumento de cálcio intracelular ( $Ca^{2+}$ ) o que pode explicar as características pró-sobrevivência do estradiol (MACÊDO, 2020). Sua via de sinalização canônica e não canônica pode ser vista na Figura 3 para uma melhor compreensão.

**FIGURA 3 VIAS CANÔNICA E NÃO CANÔNICA DE SINALIZAÇÃO DO ESTROGÊNIO**

Adaptado de:

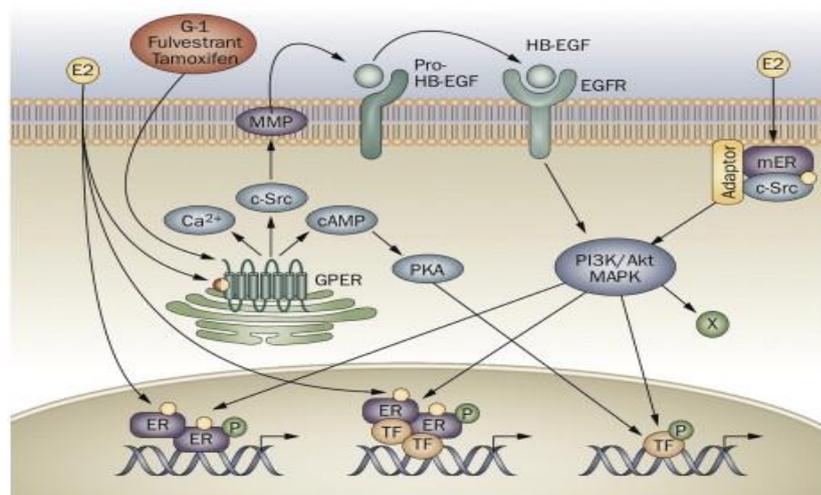


DeLEON;WANG; ARNATT, 2020

Outros eventos são desencadeados após ligação do estrogênio ao GPER por sinalização de segundos mensageiros, incluindo, produção de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), geração de inositol trifosfato (IP3), ativação das quinases de proteína ativada por mitógeno (MAPK) (FILARDO et al, 2000).

A função do GPER também está relacionada a outras proteína-quinases não receptoras como a c-Src, que é um membro representativo de uma família que inclui nove genes de tirosina quinases não receptoras, e tem um papel fundamental na modulação de várias vias de sinalização, cuja ativação está relacionada aos efeitos na modulação direta e indireta da sinalização mitogênica, organização do citoesqueleto, angiogênese, motilidade, progressão do ciclo celular, sobrevivência e proliferação (BELLI et al, 2020). A participação da Src na sinalização estrogênica pode ser vista na Figura 4.

**FIGURA 4. VIAS DE SINALIZAÇÃO DO ESTROGÊNIO**



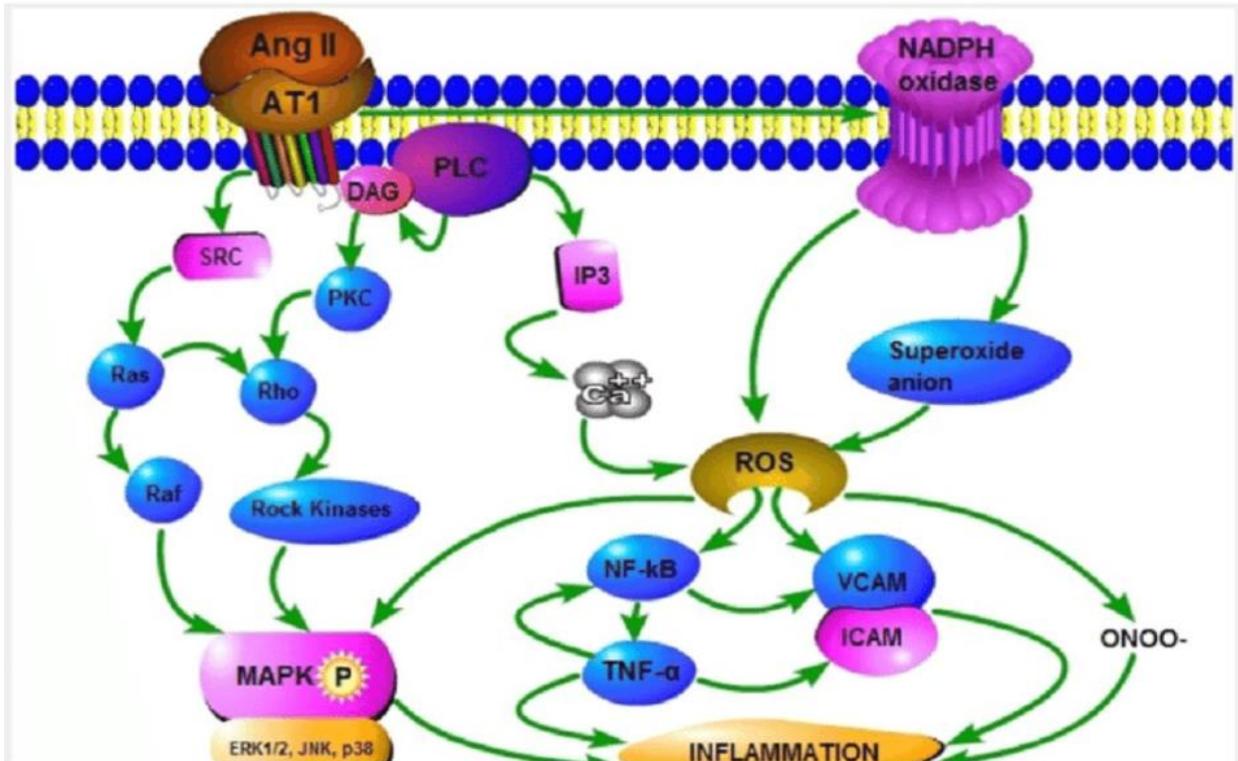
FONTE: PROSSNITZ AND BARTON, 2014

### ***1.5.2 Receptor tipo I da angiotensina (AGT1R) e seu papel no desenvolvimento placentário***

A angiotensina II (Ang II) é um hormônio vasopressor potente e um importante regulador da secreção de aldosterona. Pode ser gerado localmente na placenta e regula o transporte sincicial, a contratilidade vascular e a invasão trofoblástica. A AngII atua através de dois subtipos de receptores, AGT1R e AGT2R, que normalmente mediam ações antagonistas. Ambos os receptores são encontrados na placenta em populações trofoblásticas distintas (BALI; SINGH; JAGGI, 2014).

A ativação dos AGT1Rs está relacionada a resposta inflamatória. Nesse contexto, evidências apontam para alterações inflamatórias maternas como um mecanismo ativador de AT1R que estariam associados à pré-eclampsia. A relação entre a ativação desse receptor e a inflamação está representada na figura 5.

**FIGURA 5 ENVOLVIMENTO MOLECULAR DO RECEPTOR TIPO 1 DA ANGIOTENSINA NA INFLAMAÇÃO**

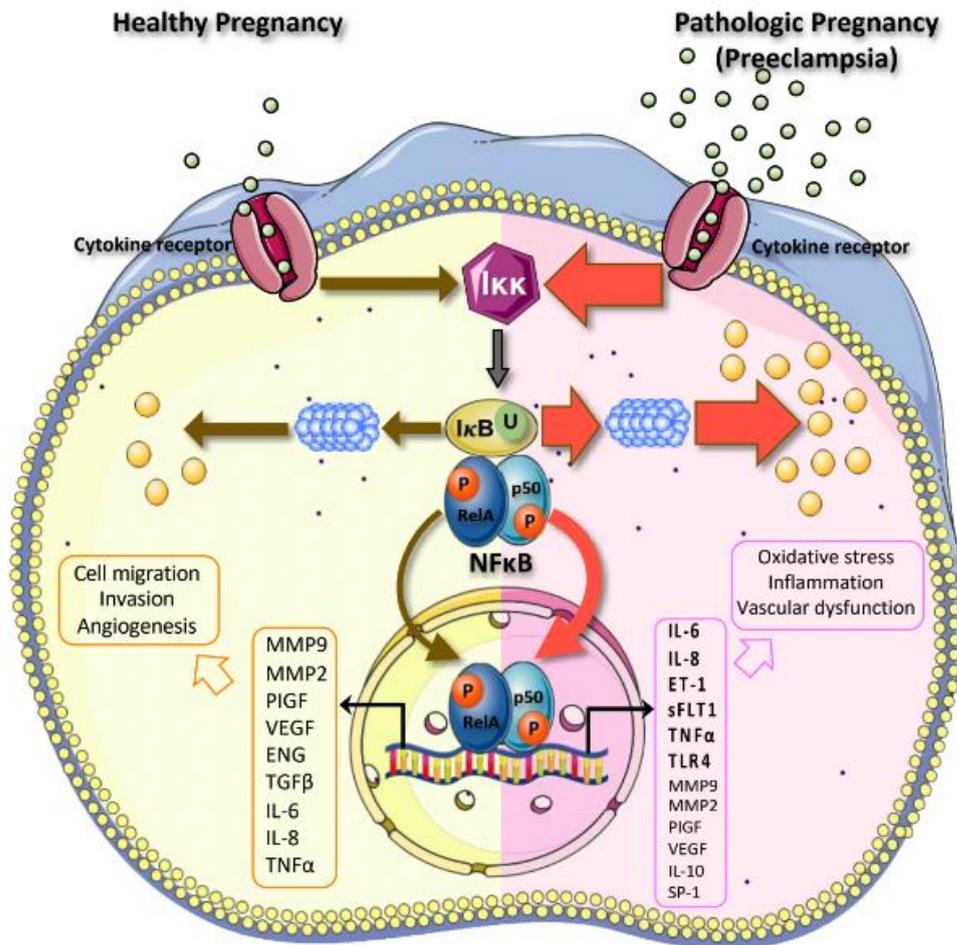


Na figura 5 o Receptor AGT1R é representado pela sigla AT1.

FONTE: (BALI; SINGH; JAGGI, 2014)

Um dos fatores de transcrição relacionado à ativação do AGT1R é o NF-κB. Durante a gravidez normal, NF-κB funciona para apoiar a migração celular, invasão e produção de proteínas angiogênicas da placenta, através da ativação de vários genes-alvo. Durante gestações patológicas como pré-eclâmpsia (PE), NF-κB é altamente expresso conforme descrito pelas setas vermelhas da Figura 6. NFκB pode induzir expressão de proteínas pró-inflamatórias e antiangiogênicas, promovendo ainda mais o estresse oxidativo, inflamação e disfunção vascular que ocorre na PE. Vale destacar que ambos GPER e AT1R a quinase intracelular Src, que está envolvida no mecanismo de dano em diversas doenças inflamatórias, sendo essencial para o recrutamento e ativação de monócitos, macrófagos, neutrófilos e outras células imunes (ARMISTEAD et al., 2020).

FIGURA 6 AÇÕES DO NFκB NA PLACENTA SAUDÁVEL E PRÉ-ECLÂMPTICA.



Fonte: ARMISTEAD et al., 2020.

### 1.6 Citocinas Inflamatórias na gravidez e risco para doenças do neurodesenvolvimento

Os mediadores inflamatórios afetam o cérebro durante o desenvolvimento. Transtornos do neurodesenvolvimento, como transtorno do espectro do autismo, comprometimento cognitivo, paralisia cerebral, epilepsia e esquizofrenia, têm sido associados à inflamação no início da vida. Avanços recentes mostraram os efeitos da inflamação sistêmica no neurodesenvolvimento infantil (JIANG et al, 2018).

A ativação imune materna (MIA) é a ativação do sistema imunológico inato e adaptativo devido a infecção, estresse, autoimunidade, asma, alergias ou inflamação. A maioria dos desencadeantes de MIA em mulheres grávidas, no entanto, não leva a neuropatologias na prole, portanto, acredita-se que a MIA atue como um primer de doença ou primeiro “hit”, predispondo indivíduos suscetíveis a novas exposições ou “hits” mais tarde na

vida. Entende-se então que MIA pode influenciar o desenvolvimento do SNC fetal através do aumento da produção de citocinas inflamatórias (JIANG et al, 2018).

Pesquisas futuras devem se concentrar na identificação de indivíduos em risco e intervenções eficazes precoces para prevenir deficiências de desenvolvimento neurológico a longo prazo.

## 2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A relação entre infecções virais e o desenvolvimento de psicoses e esquizofrenia é o objeto de pesquisas recorrente nos últimos 20 anos (FINEBERG; ELLMAN, 2013). Nesse contexto, a relação entre infecções virais na gestação e sua capacidade de trazer dano ao desenvolvimento fetal, elevar a morbimortalidade materna e perinatal e correlacionar-se com o desenvolvimento de desordens afetivas e psiquiátricas na vida adulta aponta a relevância do assunto (OLIVEIRA; HONÓRIO JÚNIOR; ARAGÃO, 2021).

Apesar das evidências apontando para alterações placentárias como marcadores de predição para o risco de transtornos do neurodesenvolvimento, esta área de estudo em humanos ainda está bem incipiente, sendo as principais evidências no momento atual provenientes de modelos animais.

A COVID-19 em casos graves é capaz de produzir reações imunológicas excessivas que caracterizam um quadro de hiperinflamação sistêmica, também chamado de tempestade de citocinas (KIM et al, 2021).

As citocinas estão relacionadas a liberação do hormônio cortisol. Durante a gestação níveis elevados de cortisol estão associados a uma variabilidade de anormalidades cerebrais e dopaminérgicas (GLOVER; CONNOR; O'DONNELL, 2010; KAPOOR; PETROPOULOS; MATTHEWS, 2008; SANDMAN et al., 2018). Evidências sugerem que bebês do sexo masculino apresentam um risco aumentado para esses atrasos no desenvolvimento, um dos mecanismos subjacentes a esta vulnerabilidade é uma menor expressão de enzima metabolizadora de cortisol  $11\beta$ -HSD2 nas placentas de fetos do sexo masculino. Mais recentemente a expressão aumentada do receptor de estrógeno GPER foi associada a redução do risco de transtornos do neurodesenvolvimento em crianças expostas a infecções virais na gravidez (CHAN; NUGENT; BALE, 2018; ELLMAN et al, 2019; FINEBERG et al., 2013),

Nesse contexto, procuramos através da presente pesquisa, buscar alterações na placenta de mulheres expostas ao vírus SARS-CoV2 na gestação que possam estar correlacionadas com alterações do neurodesenvolvimento em crianças, visto que estudos publicados previamente mostram que alterações inflamatórias e em vias intracelulares estão associadas a este risco (AGUIAR et al, 2010; ERMAKOV et al, 2021; MÜLLER, 2018).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar alterações na sinalização estrogênica e inflamatória em tecidos placentários de mulheres que foram infectadas no terceiro trimestre de gestação por SARS-CoV-2.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Analisar a expressão gênica e proteica dos receptores GPER e AT1 da angiotensina em tecido placentário fresco;
- Analisar a expressão gênica e proteica da Src, um tirosina-quinase não-receptora, da proteína RELA, uma subunidade do fator de transcrição NF-KB e da citocina IL-6 em tecido placentário fresco;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Tipo de *pesquisa*

Foi realizado um estudo transversal, observacional e descritivo.

### 4.2 Local, população e amostra

A pesquisa foi realizada na maternidade de um complexo hospitalar universitário, referência para gestações de risco e emergências.

A princípio, a ideia era recrutar pacientes gestantes que viessem realizar serviços ambulatoriais ou em trabalho de parto. Entretanto, a população da amostra homogeneizou-se de forma que boa parte da população do estudo foi de mulheres atendidas no serviço de emergência e encaminhadas para centro cirúrgico ou centro de parto humanizado da unidade.

As participantes do estudo realizaram teste de antígeno para Sars-Cov-2 por meio de amostras de swab de conteúdo nasofaríngeo e assim foram divididas em grupos de pacientes positivas ou não para o novo Coronavírus. A unidade decidiu, por meio de protocolo interno, que pacientes positivadas deveriam ser submetidas a parto cirúrgico e isolamento no puerpério.

Assim, os grupos foram separados de acordo com a sintomatologia apresentada e o resultado do exame de PCR nasofaríngeo, e são apresentados na Figura 7. O N amostral foi de então, 5 mulheres em cada grupo.

**FIGURA 7. FLUXOGRAMA DE ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DA PESQUISA**



Fonte: Autor da Obra

### 4.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídas mulheres que:

- Tivessem cima de 37 semanas de gestação,
- Residissem em Fortaleza e Região Metropolitana,
- Assinassem o TCLE,
- Respondessem o questionário da pesquisa,
- Que aceitassem realizar coleta de sangue materno e fetal, coleta de líquido amniótico, swab naofaríngeo para exame de PCR e coleta da placenta e cordão umbilical.

Os critérios de exclusão foram mulheres:

- Cujos recém-nascidos viessem a óbito
- Que não tivessem interesse em manter contato com os pesquisadores
- Menores de idade e legalmente incapazes
- Mulheres diagnosticadas com pré-eclâmpsia, diabetes melitus e retenção de crescimento intra-uterino.

### 4.4 Coleta de dados

Durante o primeiro semestre de 2021 uma equipe foi treinada para recolher os materiais biológicos das pacientes que apresentassem sintomas de síndrome gripal, principalmente os casos suspeitos de Sars-Cov-2 que aceitassem participar da pesquisa.

Quando da realização do parto, a equipe da pesquisa era acionada a fim de recolher material biológico, ficha de recrutamento e termo de consentimento livre e esclarecido. A equipe teve treinamento acerca do uso de equipamentos de proteção individual e rotina de isolamento hospitalar.

A visita á paciente consistia em esclarecimento acerca do que se tratava a pesquisa, a importância da mesma e a coleta de seu consentimento para que na sequencia, fossem realizados os questionários e testes com as amostras biológicas. O questionário baseia-se em coleta de informações acerca do perfil socioeconômico, evolução da doença, possíveis comorbidades associadas à gravidez atual e/ou anterior, histórico familiar de doenças e agravos, histórico de saúde da paciente, medicações utilizadas, uso de vitaminas, álcool ou drogas.

## **4.5 Análise das amostras**

Cada gestante gerou um número considerável de amostras, visto que diversos tecidos foram recolhidos, entre eles: placenta, cordão umbilical, líquido amniótico, sangue materno e swab nasofaríngeo quando necessário, vários setores foram envolvidos o que necessitou de uma organização logística aplicada para todas as amostras serem analisadas sem perdas.

### ***4.5.1 Dissecação da placenta***

A placenta foi colocada sobre uma bandeja de aço inoxidável previamente limpa e autoclavada, para que pudesse ser dissecada. Essa dissecação era iniciada pela face fetal, onde eram divididas em quatro quadrantes, as regiões seccionadas tinham uma distância média de quatro cm da inserção do cordão umbilical e necessariamente precisariam estar localizadas acima de um cotilédone, regiões muito vascularizadas eram evitadas, visto que a placenta era fresca e o sangue impedia uma visualização precisa. Cada quadrante dissecado foi dividido em três amostras, o âmnio da região seccionada também foi coletado.

A face materna foi dissecada seguindo a mesma lógica da face fetal, e necessariamente foi retirada do mesmo cotilédone, nesta face não há presença de âmnio.

As amostras da face fetal e face materna foram acondicionados em microtubos graduados de 2 ml, onde em um microtubo havia 500µl de uma solução tampão fosfato-salino esterilizado, outro microtubo havia 300 µl de uma solução inibidora de RNase(SIGMA-ALDRICH®) , e por fim um microtubo sem nenhuma solução ou aditivo químico.

O material que serviria aos propósitos da pesquisa ao fim do processo foi armazenado em freezer a uma temperatura média de -80 °C e o restante foi devidamente descartado visto suas características potencialmente infectocontagiosas

### ***4.5.2 Extração e quantificação de proteína total das amostras***

As amostras foram descongeladas e homogeneizadas manualmente com Tampão de lise RIPA 1X, centrifugadas e realizada quantificação de proteínas totais por Método de Bradford.

O ensaio de Bradford foi realizado em uma placa de ELISA de 96 poços com um volume final de 200uL em duplicata. A curva padrão foi realizada com BSA e as amostras passaram por leitura de absorbância no comprimento de onda de 595 nm no espectrofotômetro.

Após termos a quantificação de proteína total realizamos uma média de quanto seria necessário de cada quadrante para gerar um pool de proteínas na concentração de 30ug para a técnica de Western Blot.

#### **4.5.3 Western Blot**

Para a corrida, utilizamos géis de poliacrilamida. Em primeiro momento a voltagem foi de 80V para que todas as proteínas corressem pelo gel de *stacking* e ficassem de forma mais uniforme possível. Após esse período a voltagem era aumentada para 120V e cessava-se a corrida quando a banda de interesse ficasse em evidência. A etapa de transferência para membranas de nitrocelulose (SIGMA-ALDRICH®) acontecia após hidratação da mesma na ordem: Metanol, H<sub>2</sub>O Destilada e Tampão Towbin por sistema *semi-dry*(THERMO FISHER SCIENTIFIC®).

Após essa etapa, inicia-se o bloqueio e posteriormente a incubação do anticorpo primário durante toda a noite. Pela manhã, as amostras eram lavadas por 3 vezes, 5 minutos cada, com tampão TBS-T gelado. O anticorpo secundário era incubado por duas horas e novamente lavado por 3 vezes de 5 minutos e revelado em fotodocumentador.

#### **4.5.4 Reação em Cadeia de Polimerase**

Para esta etapa as amostras que foram acondicionadas em solução inibidora de RNASE(SIGMA-ALDRICH®) comercial e passaram por uma extração com TRIZOL®.O protocolo envolvia lavagens com clorofórmio, isopropanol e centrifugações onde ao fim conseguimos um pellet que era o nosso objetivo, o RNA total. Após essa fase, seguimos para a síntese de cDNA com Kit de transcrição reversa(SIGMA-ALDRICH®).

Um pool com as amostras como foi feito para o Método de Western Blot também foi realizado para essa etapa. Ao fim foi realizado o protocolo de Reação em Cadeia de Polimerase para analisar a expressão do gene-alvo nas amostras.

A sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados nessa metodologia pode ser vista no Quadro 1.

## **4.6 Aspectos éticos e legais da pesquisa**

Seguindo a Resolução 466/12 a pesquisa comprometeu-se em respeitar a vida na ótica do indivíduo, das coletividades, da bioética, assegurando a autonomia, não maleficência, beneficência, justiça e equidade, e visando assegurar os direitos e deveres que dizem respeito

aos participantes da pesquisa, à comunidade científica e ao Estado.

Aos participantes foi dado o poder de desistir a qualquer momento e escolher se seus dados seriam utilizados ou não nos resultados da pesquisa. A pesquisa passou pela apreciação na Plataforma Brasil e tem o número de parecer: 4.492.367.

Após o consentimento da paciente o material biológico era levado para o laboratório de pesquisa, onde uma bancada foi isolada para restringir ao máximo a contaminação daqueles que se utilizavam do ambiente.

#### 4.7 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do Software GraphPad Prism para Windows versão 9. Foram realizados os testes de Normalidade Shapiro-Wilk. Os testes de comparações múltiplas de Dunn's e Tukey's foram escolhidos segundo o tipo de distribuição de amostra. Valores significativos para as análises foram considerados  $P < 0,05$ .

**Quadro 1:** Sequencia de nucleotídeos dos *primers* utilizados para expressão gênica por reação em cadeia de polimerase (PCR).

Gene ( <i>Homo sapiens</i> )	Primer Forward	Primer Reverse
<b>AGTR1</b>	AGATTGCTTCAGCCAGCGTC	GAAGGCGGGACTTCATTGGG
<b>GPER1</b>	GTGAACATCAGCTTCCGCGA	GGTGAGGAAGAAGACGCTGC
<b>IL-6</b>	CAGGAGCCCAGCTATGAACT	GAGGTGCCCATGCTACATT
<b>RELA</b>	GAAGGAACGCTGTCAGAGGC	CGGATGCCAGGTCTGTGAAC
<b>SRC</b>	TCCATCCAGGCTGAGGAGTG	TGGAGTAGTAGGCCACCAGC

*AGTR1: Receptor de Angiotensina II Tipo 1; GPER1: Receptor 1 de Estrogênio Acoplado à Proteína G; IL-6: Interleucina 6; RELA: Proto-Oncogene, Subunidade NF-KB; SRC: Proto-Oncogene, Não Receptor Tirosina Quinase.*

FONTE: Autor da Obra

## RESULTADOS

A média da idade materna das mulheres que compõem os grupos da pesquisa é em torno de 23,81 anos, a média da idade gestacional é de 39,77 semanas, a do peso dos recém-nascidos é de 3618,2 gramas e a estatura é de 49,4 centímetros. O sexo dos bebês foi predominantemente feminino (60%), assim como o parto cesáreo foi o que mais prevaleceu e nenhuma das crianças nasceu com o escore de Apgar menor que 8.

As amostras foram divididas em três grupos cujas características sócio-demográficas podem ser vistas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características sociodemográficas das participantes

		Grupos			<i>p</i> valor
		Controle	Exposto	Covid-19	
<b>Idade Materna (anos)</b>		25,20 ± 5,630	23,80 ± 6,648	27,20 ± 7,563	0,7259
<b>Idade Gestacional (semanas)</b>		39,77 ± 0,5013	39,60 ± 0,8857	38,08 ± 0,5483*#	0,0031
<b>Tipo de parto</b>	vaginal	4 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0,011
	cesáreo	1 (20%)	5 (100%)	5 (100%)	
<b>APGAR 1'</b>	8	3 (60%)	2 (40%)	2 (40%)	1,000
	9	2 (40%)	3 (60%)	3 (60%)	
<b>APGAR 5'</b>	8	1 (20%)	0 (0%)	1 (20%)	0,725
	9	3 (60%)	5 (100%)	4 (80%)	
	10	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Sexo do RN</b>	Masculino	2 (40%)	2 (40%)	2 (40%)	1,000
	Feminino	3 (60%)	3 (60%)	3 (60%)	
<b>Peso do RN</b>		3586 ± 337,1	3639 ± 665,0	3630 ± 721,4	0,9889
<b>Estatura do RN</b>		49,20 ± 1,924	50,20 ± 2,168	48,80 ± 2,168	0,5143

\*Controle vs Covid-19,  $p < 0,01$ ; # Síndrome gripal vs Covid-19,  $p < 0,01$ .

### 5.1 Análise da Expressão Gênica

Os níveis relativos de expressão gênica dos marcadores escolhidos foram mensurados por meio da técnica de cadeia de polimerase e calculados de acordo com o método de Livak e Schmittgen (2001).

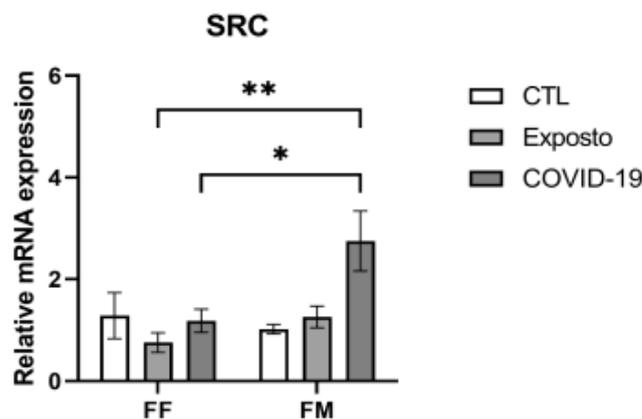
A figura 8 mostra a expressão gênica relativa de Src na placenta. Foi observado que na face fetal, o grupo COVID-19 não apresentou diferença em relação ao grupo Controle. O grupo Exposto não apresentou diferença estatística, mas houve uma diminuição

da média em relação ao grupo controle.

Já na face materna podemos observar que o grupo COVID-19 apresentou diferença estatística ( $p=0,0158$ ) quando comparado ao grupo Controle e quando comparado ao grupo Exposto ( $p=0,0490$ ). Não houve diferença entre o grupo Exposto e Controle.

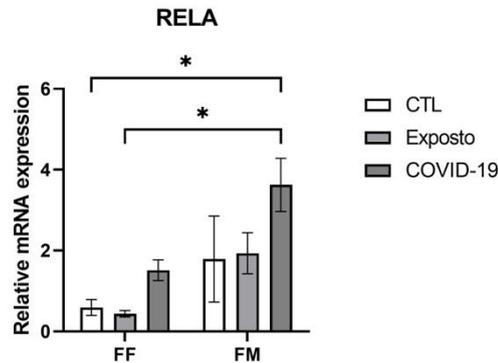
Também foram comparadas as diferenças entre as faces das placentas e entre os grupos. Houve diferença estatística entre os grupos COVID-19 da face materna vs o grupo COVID-19 da face fetal ( $p=0,0347^*$ ). Também surgiu diferenças entre os grupos COVID-19 face materna vs o grupo Exposto da face fetal ( $p=0,0043^{**}$ )

**FIGURA 8 - EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DE Src NA PLACENTA**



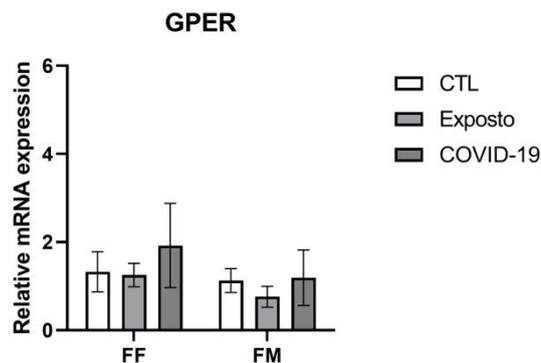
Níveis de expressão gênica relativa de SRC (Proto-Oncogene, Não Receptor Tirosina Quinase) na placenta em sua face fetal, apresentando diferença estatística de ( $p=0,0490$ ) entre os grupos COVID-19 e exposto na face materna, ( $p=0,0158$ ) entre os grupos COVID-19 e controle também na face materna. Entre as faces foi possível observar a diferença estatística de ( $p=0,0347^*$ ) entre o Grupo COVID-19 da Face materna e o Grupo COVID-19 da face fetal. E diferença estatística ( $p=0,0043^{**}$ ) entre os Grupos COVID-19 da Face materna e o grupo Exposto da Face Fetal. Cada coluna representa a média ( $n=5$ ). Testes realizados: ANOVA two-way. Pós-teste de Tukey.

A figura 9 mostra a análise da expressão gênica da proteína RELA (p65NF-KB), o grupo COVID-19 apresentou diferença estatística ( $p=0,0118$ ) na Face materna, quando comparado ao grupo Controle e quando comparado ao grupo Exposto ( $p=0,0269$ ). Não há diferença estatística entres os grupos Exposto e Controle na face fetal. Já na face materna, o grupo COVID-19 não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo Controle e Exposto. Não houve diferença estatística entre os grupos Exposto e Controle.

**FIGURA 9 - EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DE RELA NA PLACENTA**

Níveis de expressão gênica relativa de RELA (Proto-Oncogene, Subunidade NF-KB) na placenta em sua face materna, apresentando diferença estatística de ( $p= 0,0118$ ) quando comparado o grupo COVID-19 com o grupo Controle e diferença estatística de ( $p=0,0269$ ) quando comparado os grupos COVID-19 e Exposto. Níveis de expressão gênica relativa de RELA (Proto-Oncogene, Subunidade NF-KB) na placenta em sua face fetal não foram encontrados. Cada coluna representa a média ( $n=5$ ).

Em relação a expressão gênica do receptor de estrogênio (GPER) a figura 10 mostra que na face materna, não houve diferença estatística entre os grupos COVID-19 e Controle, mas houve um aumento da média. Não houve aumento de expressão entre os grupos Exposto e Controle. Na face fetal, não houve diferença estatística entre os grupos COVID-19 e Controle e os grupos COVID-19 e Exposto, entretanto, houve uma diminuição da média entre os grupos Exposto e Controle.

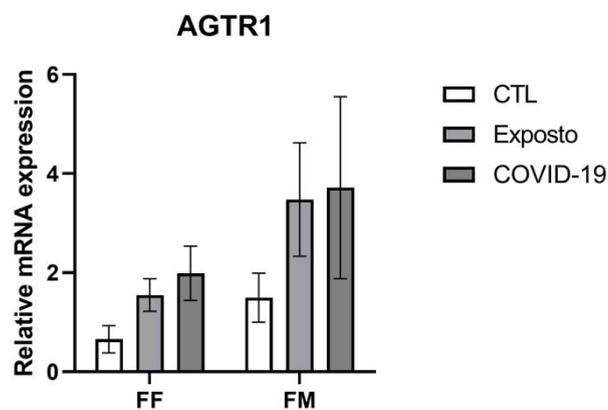
**FIGURA 10 - EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DE GPER NA PLACENTA**

Níveis de expressão gênica relativa de GPER (Receptor de estrogênio acoplado à proteína G) na placenta em sua face fetal e materna. Cada coluna representa a média ( $n=5$ ).

Em relação a expressão gênica do receptor AGTR1, podemos observar na figura 11, que na face fetal, o grupo COVID-19 não apresentou diferença estatística em relação ao grupo Controle, mas houve um aumento da média. O grupo COVID-19 não apresentou diferença estatística em relação ao grupo Exposto. O grupo Exposto não apresentou diferença estatística em relação ao grupo Controle, mas houve um aumento da média.

Na face materna, o grupo COVID-19 não apresentou diferença estatística em relação ao grupo Controle e ao Grupo Exposto.

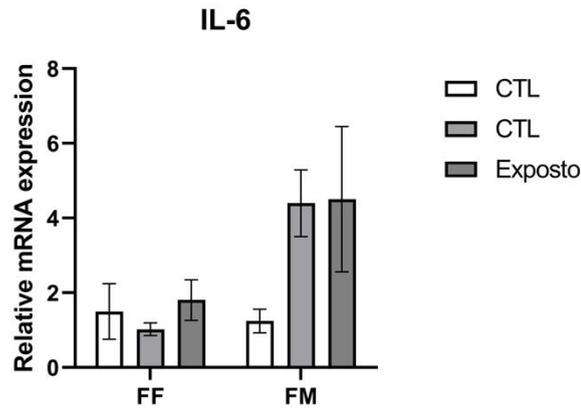
**FIGURA 11 - EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DE AGTR1 NA PLACENTA**



Níveis de expressão gênica relativa de AGTR1 (Receptor de Angiotensina II Tipo 1) na placenta em sua face fetal e face materna. Cada coluna representa a média (n=5).

A figura 12 mostra a análise da expressão gênica da Interleucina-6. Não houve diferença estatística entre os grupos COVID-19, Exposto e Controle na face fetal. O grupo COVID-19 não apresentou diferença significativa em relação ao grupo Controle na face materna, mas houve um aumento de 4 vezes tanto no grupo Exposto como no grupo COVID-19.

**FIGURA 12- EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DE IL-6 NA PLACENTA**



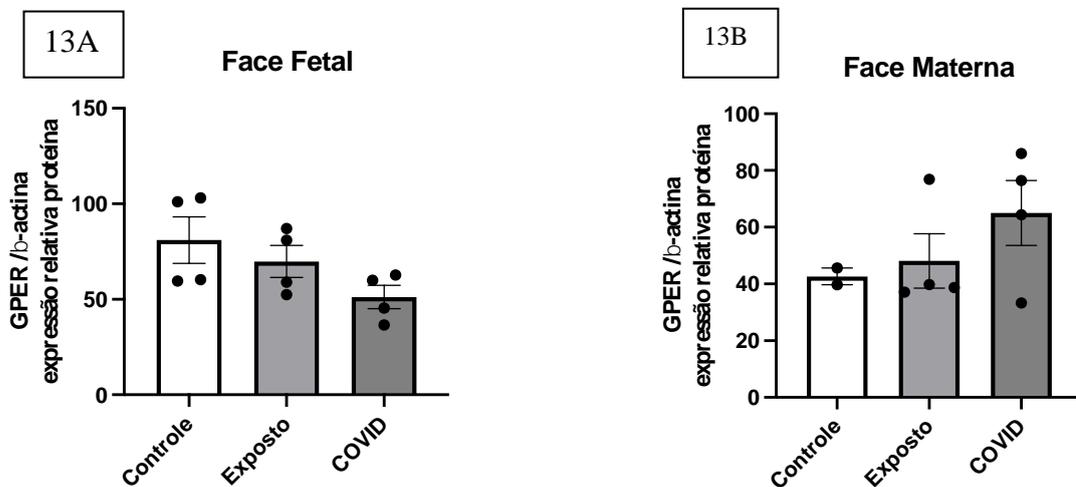
Níveis de expressão gênica relativa de IL-6 (Interleucina 6) na placenta em sua face fetal. Níveis de expressão gênica relativa de IL-6 (Interleucina 6) na placenta em sua face materna. Cada coluna representa a média (n=5).

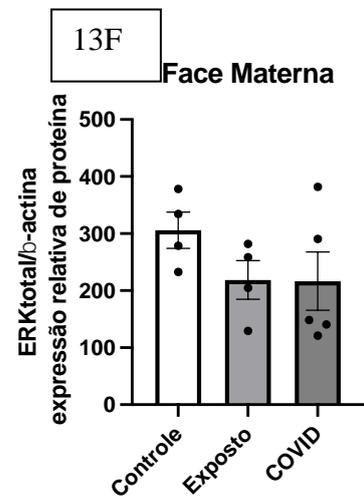
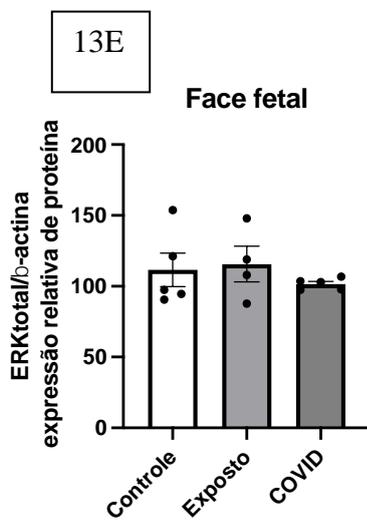
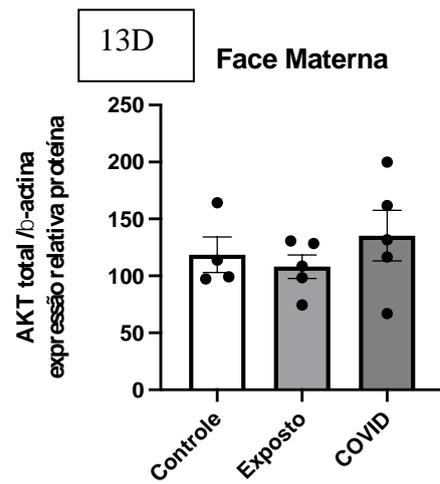
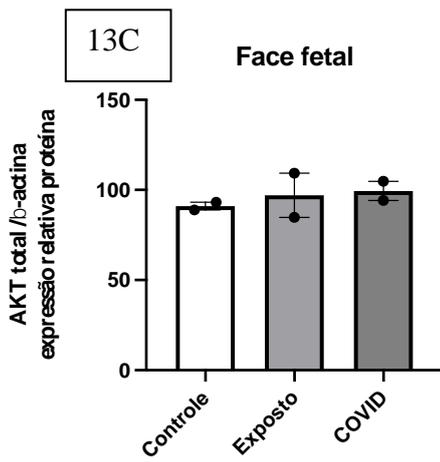
## 5.2 Análise da expressão proteica

A expressão de proteínas pode ser definida de forma geral como, a identificação de proteínas em um determinado momento, em um conjunto de especificidades de condições e em um determinado tecido. Em geral, é comparada a expressão em amostras de referência. A utilização do perfil de expressão de proteínas se dá pelo fato de que proteínas contêm informações, e esses dados específicos, se alteram em situações de estresse interno ou externo ao organismo (BRADLEY; KALAMPANAYIL; O'NEILL, 2009).

As análises proteicas não mostraram diferenças entre os grupos analisados. Na Figura 13 é mostrada a expressão relativa de proteína na Face fetal e na Face materna, normalizado pela proteína  $\beta$ -Actina entre os grupos Controle, Exposto e Covid.

**FIGURA 13 – Análise relativa de proteína na Face fetal e na Face materna das Proteínas: GPER, AKT total, ERK total e NF-KBp65**





(A) Expressão relativa de proteína na Face fetal de GPER. (B) Expressão relativa de proteína na Face materna de GPER. (C) Expressão relativa de proteína na Face fetal de AKT total. (D) Expressão relativa de proteína na Face materna de AKT total. (E) Expressão relativa de proteína na Face fetal de ERK total. (F) Expressão relativa de proteína na Face materna de ERK total.

## DISCUSSÃO

Os resultados do estudo demonstraram, até o presente momento, que houve alterações em marcadores inflamatórios e da via de sinalização estrogênica nas placentas expostas a COVID.

O cérebro humano é particularmente sensível ao estresse oxidativo, visto seu elevado consumo de oxigênio, a fim de manter suas funções fisiológicas estáveis. Para além da placentação anormal, que em muitos casos está ligado a quadros de pré-eclâmpsia e resulta em quadros inflamatórios, as infecções durante a gestação também são responsáveis por elevar esses quadros.

Ainda no início da Pandemia por SARS-CoV-2, pacientes não grávidas apresentaram quadros clínicos com proteinúria, hipertensão e trombocitopenia, tais achados caracterizam um possível quadro de pré-eclâmpsia, doença hipertensiva da gravidez que em casos graves é associado a desfechos obstétricos fatais para mãe e bebê. O mecanismo pelo qual é possível relacionar a pré-eclâmpsia ao COVID-19 é a disfunção endotelial (JUNG et al, 2022).

A função de Src é bem estabelecida em tecido uterino e glândulas mamárias, suas funções incluem a regulação da proliferação celular, angiogênese e a atividade invasiva de outras células (JEONG et al, 2020).

Na via estrogênica um dos mecanismos de sinalização, é a ativação de Src que leva a uma cascata de eventos com atividades biológicas. No presente estudo, a expressão relativa de Src aumentou significativamente na face materna no grupo COVID-19.

O grupo de Jeong em 2020 avaliou a expressão de Src em 20 placentas de mulheres com pré-eclâmpsia e os níveis de expressão relativa de Src estavam diminuídos em placentas pré-eclâmpicas quando comparadas as placentas controle.

O que nos leva a crer que mesmo com o mecanismo de disfunção endotelial presente nas duas situações patológicas alguns biomarcadores se comportam de forma distinta e que a via estrogênica foi mais fortemente ativada em placentas expostas ao vírus do COVID-19 (JEONG et al, 2020). Em linha com nosso achado, evidências mostram aumento da Src na doença trofoblástica gestacional

Alterações no momento da placentação forçam as células a sobreviverem em um ambiente hipóxico, levando a um aumento de formas reativas de oxigênio. Esse estresse oxidativo, ampara o desenvolvimento de um quadro de inflamação sistêmica e local, regulada por fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF-κB) (SAKOWICZ et al, 2021).

A placenta sintetiza uma variedade de citocinas o que levanta a possibilidade de que exista uma produção desses fatores que gera uma inflamação de grau baixo na gestação em seu terceiro trimestre. Nesse contexto, o NF-kB apresenta função fisiológica na placenta e quando aumentado está relacionado a processos patológicos (DESOYE; MOUZON, 2007).

Como o diabetes mellitus gestacional, que já é associada a desordens metabólicas, renais e oftálmicas levando, por exemplo, ao crescimento fetal excessivo. Entretanto, novos riscos estão sendo associados a essa patologia, como riscos cardiovasculares e também neuropsiquiátricos, como o transtorno do espectro do autismo (TEA), transtorno e déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e atraso cognitivo (SHEINER, 2020).

As anormalidades causadas pelo diabetes gestacional podem impactar diretamente no metabolismo fetal alterando os níveis de nutrientes, como a glicose que é crítica para o desenvolvimento levando a atrasos. O metabolismo materno alterado possivelmente estimula tanto as células adiposas, quanto as placentárias (KUNDU; MAURER; STEVENS, 2021). O tecido adiposo e a placenta têm um rol de citocinas e genes relacionados à inflamação comum (DESOYE; MOUZON, 2007).

O ambiente inflamatório é adverso e há possibilidade de rotura prematura de membranas levando a prematuridade e possível óbito da prole. A longo prazo para os sobreviventes é possível um desdobramento que leva a complicações como a paralisia infantil, transtorno do espectro autista e esquizofrenia (CHUDNOVETS et al, 2020).

Bangma et al (2021), em uma pesquisa envolvendo 14 hospitais de cinco estados nos Estados Unidos da América, durante 4 anos, observaram que recém nascidos humanos que passassem por episódios prolongados e intermitentes de inflamação apresentavam risco aumentado de lesão cerebral perinatal, se comparados a recém nascidos que enfrentaram apenas uma episódio inflamatório. Nesse estudo, bebês que com inflamação placentária associada a inflamação neonatal sistêmica eram mais propensos a apresentar dano a substância branca cerebral, visto seus indicadores no ultrassom cerebral, e também a deficiências do desenvolvimento aos 24 meses de idade, quando comparados a bebês que sofreram apenas com um das injúrias inflamatórias (inflamação placentária ou inflamação neonatal sistêmica)

O NF-kB que está envolvido nesses processos inflamatórios, é codificado pelo gene RELA, que na face fetal das placentas analisadas pela pesquisa, apresentou uma maior expressão relativa no grupo Covid quando comparado aos grupos Exposto e Controle. O que

confirma a hipótese de que o ambiente fetal é afetado pelos fatores inflamatórios durante as infecções na gestação. O aumento da média é outro ponto que chama atenção e indaga a reflexão acerca do futuro dos bebês da Pandemia e sua saúde neuropsiquiátrica.

Conforme Macedo et al (2020), GPER1 apresenta potencial terapêutico no tratamento da esquizofrenia em virtude dos processos biológicos associados a ele como, modulação da apoptose, resposta inflamatória, imunidade inata e neurogênese. Trabalho recente usando modelo animal mostrou que as placentas que expressam mais GPER protegem os fetos de alterações causadas por vírus que podem levar a doenças do neurodesenvolvimento. Nas placentas analisadas, entretanto, não houve uma diferença na expressão relativa de GPER1 em nenhuma das faces apesar do aumento de expressão de Src em face materna.

O receptor de angiotensina 2 é codificado pelo gene AGTR1, este foi analisado nas placentas estudadas e apesar do aumento da média em ambas as faces das placentas do grupo COVID-19, um aumento significativo da expressão relativa não foi encontrado. O AT1R também sinaliza para a Src.

Apesar da ECA2 ser reconhecidamente um fator chave na entrada do vírus na célula, Piqué-Regi (2020) em análise transcriptômica de célula única concluiu que ECA2 e TMPRSS2 são minimamente expressos em placentas humanas. Corroborando Lü, que em análise comparativa de uma única célula da expressão de ECA2 e TMPRSS2 em tecidos adultos e fetais, concluiu que algumas células trofoblásticas expressavam ECA2 na placenta, entretanto, a proporção dessas células foi muito baixa em comparação com outros tecidos, sugerindo que a possibilidade de transmissão vertical também pode ser muito baixa.

Todavia, Gengler et al (2021), em suas análises *in situ* por imunohistoquímica específica e detecção de SARS-CoV-2 por PCR indicam que as células trofoblásticas, que estão em contato direto com o sangue materno no espaço intervilo, detêm uma forte expressão de ECA2 durante a gravidez.

Em relação às análises realizadas para verificar a expressão relativa da Interleucina-6 (IL-6), não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos. Entretanto, houve um aumento de 4 vezes do Exposto e COVID-19 em relação ao controle na face materna. Aggarwal et al (2018) verificaram por resultados de PCR o aumento da intensidade da banda de IL-6 em casos de pré-eclâmpsia em comparação com o controle.

O papel da IL-6 na capacidade de indução de sintomas pré-eclâmpáticos em ratas e babuínas já foi evidenciado, o que nos leva a crer que mais análises dessa citocina devam

ser realizadas. Além disso, nos modelos de MIA a IL-6 é uma das citocinas mais relacionadas com alterações neurodesenvolvimentais na criança. Nesse contexto, o uso de anticorpos anti-IL-6 na gravidez, em modelos animais, se mostrou protetor contra o desenvolvimento de déficits neurodesenvolvimentais. Vale destacar que a citocina IL-6 produzida tem livre passagem pela placenta (WU, 2017).

Em uma análise de 222 filhos de mães positivas para COVID-19, Edlow (2020) e seu grupo perceberam que o diagnóstico de transtornos do neurodesenvolvimento de crianças até um ano de idade foi mais comum entre os filhos expostos, principalmente aqueles expostos a infecção materna no terceiro trimestre de gestação. A maioria dos diagnósticos envolveu: distúrbios motor e da fala ou linguagem.

O presente estudo teve algumas limitações. Dentre estas podemos citar o pequeno número amostral, visto que cada placenta gerava muitas amostras para serem dissecadas, armazenadas, extraídas e quantificadas para que no fim pudesse realizar a produção do pool com a maior salvaguarda de concentração e pela novidade que este tecido era a rotina do laboratório, sendo necessárias modificações em protocolos assim como suas otimizações.

## 7 CONCLUSÃO

A idade gestacional das mulheres infectadas pelo vírus SARS-CoV-2 foi menor em comparação ao grupo exposto e controle, bem como neste grupo o parto predominante foi o cesáreo. As análises moleculares das placentas mostraram aumento significativo da proteína NF-kB em mulheres infectadas com COVID-19. O receptor AT1 e a citocina IL-6 apresentaram-se aumentados nas placentas expostas e com COVID-19 ativa, porém este aumento não foi significativo. Em conjunto os dados obtidos mostram um aumento de mecanismos inflamatórios nas placentas de pacientes expostas à COVID-19. Estes achados podem apontar para um maior risco para o desenvolvimento de doenças do neurodesenvolvimento nas crianças expostas ao vírus da COVID-19 na gravidez.

## REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, R. et al Association of pro- and anti-inflammatory cytokines in preeclampsia. **Journal Of Clinical Laboratory Analysis**, [ S.L.], v. 33, n. 4, p. 22834-22854, 21 jan. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.22834>.
- AGONDI, R. C.; AUN, M. V.; GIAVINA-BIANCHI, P. COVID-19, enzima conversora da angiotensina 2 e hidroxicloroquina. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 4, n. 1, p. 138–140, 2020.
- AGUIAR, C. C. T. et al. Esquizofrenia: uma doença inflamatória? **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 59, n. 1, p. 52–57, 2010.
- AGUIAR, V. R. C. et al. An immunogenetic view of COVID-19. **Genetics and molecular biology**, v. 44, n. 1 Suppl 1, 2021.
- ARMISTEAD, B. et al. The Role of NFκB in Healthy and Preeclamptic Placenta: Trophoblasts in the Spotlight. **International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 1775**, v. 21, n. 5, p. 1775, 5 mar. 2020.
- BALI, A.; SINGH, N.; JAGGI, A. S. Renin-angiotensin system in pain: Existing in a double life? **JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 15, n. 4, p. 329–340, 17 dez. 2014.
- BANGMA, J. T. et al. Placental programming, perinatal inflammation, and neurodevelopment impairment among those born extremely preterm. **Pediatric Research 2020 89:2**, v. 89, n. 2, p. 326–335, 12 nov. 2020.
- BEHURA, S. K. et al. The brain-placental axis: Therapeutic and pharmacological relevancy to pregnancy. **Pharmacological Research**, v. 149, p. 104468, 1 nov. 2019.
- BELLI, S. et al. c-Src and EGFR Inhibition in Molecular Cancer Therapy: What Else Can We Improve? **Cancers 2020, Vol. 12, Page 1489**, v. 12, n. 6, p. 1489, 7 jun. 2020.
- BONINI, J. A.; ANDERSON, S. M.; STEINER, D. F. Molecular Cloning and Tissue Expression of a Novel Orphan G Protein-Coupled Receptor from Rat Lung. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 234, n. 1, p. 190–193, 8 maio 1997.
- BRADLEY, B. P.; KALAMPANAYIL, B.; O'NEILL, M. C. Protein expression profiling. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 519, p. 455–468, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Como é transmitido?** 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/como-e-transmitido#:~:text=O%20conhecimento%20sobre%20a%20transmiss%C3%A3o,objetos%20utilizados%20pela%20pessoa%20infectada..> Acesso em: 20 mar. 2022.
- BRASIL. ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE. **Folha informativa sobre COVID-19.** 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19>. Acesso em: 15 mar. 2022.
- BRITO, S. B. P. et al. Immunopathological mechanisms involved in SARS-CoV-2 infection. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 56, p. e3352020, 13 nov. 2020.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. What is the placenta? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 213, n. 4, p. S6.e1-S6.e4, 1 out. 2015.
- CHAN, J. C.; NUGENT, B. M.; BALE, T. L. Parental Advisory: Maternal and Paternal Stress Can Impact Offspring Neurodevelopment. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 10, p. 886–894, 15 maio 2018.
- CHUDNOVETS, A. et al. Role of Inflammation in Virus Pathogenesis during Pregnancy. **Journal of Virology**, v. 95, n. 2, 28 out. 2020.
- DELEON, C.; WANG, D. Q. H.; ARNATT, C. K. G Protein-Coupled Estrogen Receptor, GPER1, Offers a Novel Target for the Treatment of Digestive Diseases. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 843, 12 nov. 2020.

- DESOYE, G.; HAUGUEL-DE MOUZON, S. The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network. **Diabetes care**, v. 30 Suppl 2, n. SUPPL. 2, jul. 2007.
- ELLMAN, L. M. et al. Maternal cortisol during pregnancy and offspring schizophrenia: Influence of fetal sex and timing of exposure. **Schizophrenia Research**, v. 213, p. 15–22, 1 nov. 2019a.
- ERMAKOV, E. A. et al. Oxidative Stress-Related Mechanisms in Schizophrenia Pathogenesis and New Treatment Perspectives. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021a.
- FILARDO, E. J. et al. Estrogen-Induced Activation of Erk-1 and Erk-2 Requires the G Protein-Coupled Receptor Homolog, GPR30, and Occurs via Trans-Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor through Release of HB-EGF. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 10, p. 1649–1660, 1 out. 2000.
- FINEBERG, A. M. et al. Fetal exposure to maternal stress and risk for schizophrenia spectrum disorders among offspring: Differential influences of fetal sex. **Psychiatry Research**, v. 236, p. 91–97, 28 fev. 2016.
- FINEBERG, A. M.; ELLMAN, L. M. Inflammatory Cytokines and Neurological and Neurocognitive Alterations in the Course of Schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 10, p. 951–966, 15 maio 2013.
- FRANZOTTI, E.M. **Identificação de agonistas e antagonistas de receptores nucleares em extratos de plantas medicinais: morus nigra l., plectranthus ornatus codd., ipomoea cairica (l) sweet e pouteria torta (mart.)**. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, p.108 . 2006.
- GENGLER, C. et al. SARS-CoV-2 ACE-receptor detection in the placenta throughout pregnancy. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 3, p. 489–490, 1 mar. 2021.
- GLOVER, V.; O'CONNOR, T. G.; O'DONNELL, K. Prenatal stress and the programming of the HPA axis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 1, p. 17–22, 1 set. 2010.
- HEEREMA-MCKENNEY ROBERT, A. J.; HEEREMA-MCKENNEY, A. Defense and infection of the human placenta. **APMIS**, v. 126, n. 7, p. 570–588, 1 jul. 2018.
- ICTV, Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus. **Coronaviridae**. Disponível em: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna\\_viruses/222/coronaviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae). Acesso em: 15 mar. 2022.
- JEONG, J. S. et al. The Expression and Contribution of SRCs with Preeclampsia Placenta. **Reproductive Sciences**, v. 27, n. 7, p. 1513–1521, 1 jul. 2020.
- JIANG, N. M. et al. The Impact of Systemic Inflammation on Neurodevelopment. **Trends in Molecular Medicine**, v. 24, n. 9, p. 794–804, 1 set. 2018.
- JUNG, E. et al. The etiology of preeclampsia. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 226, n. 2, p. S844–S866, 1 fev. 2022.
- KAPOOR, A.; PETROPOULOS, S.; MATTHEWS, S. G. Fetal programming of hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids. **Brain Research Reviews**, v. 57, n. 2, p. 586–595, 14 mar. 2008.
- KIM, J. S. et al. Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19. **Theranostics**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 316–329, 1 jan 2021.
- KUNDU, S.; MAURER, S. V.; STEVENS, H. E. Future Horizons for Neurodevelopmental Disorders: Placental Mechanisms. **Frontiers in Pediatrics**, v. 9, p. 243, 8 abr. 2021.
- LEÓN-JUÁREZ, M. et al. Cellular and molecular mechanisms of viral infection in the human placenta. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 7, p. 93, 29 set. 2017.
- LEUNG, K. K. Y. et al. Congenital infections in Hong Kong: An overview of TORCH. **Hong Kong Medical Journal**, v. 26, n. 2, p. 127–138, 1 abr. 2020.

LIMA, A.V. **Análise da situação clínica dos nascidos vivos com infecção congênita por storch no distrito federal, brasil – 2005 a 2016**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Universidade de Brasília, Ceilândia, 74p. 2018

LIU, D. X.; LIANG, J. Q.; FUNG, T. S. Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae). **Encyclopedia of Virology: Volume 1-5, Fourth Edition**, v. 1–5, p. 428–440, 1 jan. 2021.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 1 dez. 2001.

LÜ, M. et al. Single-cell expression profiles of *ACE2* and *TMPRSS2* reveals potential vertical transmission and fetus infection of SARS-CoV-2. **Aging**, v. 12, n. 20, p. 19880–19897, 26 out. 2020.

LUO, J.; LIU, D. Does GPER Really Function as a G Protein-Coupled Estrogen Receptor in vivo? **Frontiers in endocrinology**, v. 11, 31 mar. 2020.

MACÊDO, D. et al. G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER) as a Novel Target for Schizophrenia Drug Treatment. **Schizophrenia Bulletin Open**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1, 1 jan. 2020.

MACIEL, E. L. S. DA R. et al. Efeito do estrogênio no risco cardiovascular: uma revisão integrativa. **Revista Eletrônica Acervo Médico**, v. 1, n. 1, p. e8527–e8527, 31 ago. 2021.

MOURA, P. R.; VIDAL, F. A. P. - Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G - Signal transduction: a review about G protein - **Sci. Med**, v. 21, n. 1, p. 31-36. 24 jan. 2011

MÜLLER, N. Inflammation in Schizophrenia: Pathogenetic Aspects and Therapeutic Considerations. **Schizophrenia Bulletin**, v. 44, n. 5, p. 973–982, 20 ago. 2018.

O'MALLEY, B. W.; KHAN, S. Elwood V. Jensen (1920-2012): father of the nuclear receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 10, p. 3707–3708, 5 mar. 2013.

OLIVEIRA, S. D. R. C.; JÚNIOR, J. E. R. H.; ARAGAO, G. Possível risco de desenvolvimento fetal de autismo em gestantes infectadas por SARS-CoV-2. **Revista Neurociências**, v. 29, p. 1–24, 22 mar. 2021.

OMS. **Painel da OMS sobre o coronavírus: covid-19**. COVID-19. 2022. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 23 set. 2022.

PHIPPS, E. A. et al. Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies. **Nature Reviews Nephrology** **2019 15:5**, v. 15, n. 5, p. 275–289, 21 fev. 2019.

PIQUE-REGI, R. et al. Does the human placenta express the canonical cell entry mediators for sars-cov-2? **eLife**, v. 9, p. 1–15, 2020.

PORTO, E. CARVALHO et al. CAVIDADE BUCAL: UMA ROTA DISSEMINADORA EM POTENCIAL PARA O COVID-19? **Diálogos & Ciência**, v. 1, n. 42, p. 37–44, 13 dez. 2021.

Princípios de Farmacologia. **A Base Fisiopatológica da Farmacologia**. GOLAN, David E. e col. Editora Guanabara Koogan, 3ª edição, 2014.

ROBERTS, R. M.; GREEN, J.; SCHULZ, L. C. The evolution of the placenta. **Reproduction**, [S.L.], v. 152, n. 5, p. 179-189, nov. 2016.

ROSKOSKI, R. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. **Pharmacological Research**, v. 66, n. 2, p. 105–143, 1 ago. 2012.

ROUHIMOGHADAM, M. et al. Therapeutic Perspectives on the Modulation of G-Protein Coupled Estrogen Receptor, GPER, Function. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 877, 23 nov. 2020.

SAKOWICZ, A. et al. The Preeclamptic Environment Promotes the Activation of Transcription Factor Kappa B by P53/RSK1 Complex in a HTR8/SVneo Trophoblastic Cell Line. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, 1 out. 2021.

SAMPAIO, M. I. G. Avaliação do efeito antiproliferativo de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. em linhagem de adenocarcinoma de endométrio humano. 7 dez. 2020.

SANDMAN, C. A. et al. Elevated maternal cortisol early in pregnancy predicts third trimester levels of placental corticotropin releasing hormone (CRH): Priming the placental clock. **Peptides**, v. 27, n. 6, p. 1457–1463, 1 jun. 2006.

SANTOS, T. A.; TAVARES, N. M.; MENGEL, J. **Imunopatogênese da COVID-19**. In: BARRAL-NETTO, M.; BARRETO, M. L.; PINTO JUNIOR, E. P.; ARAGÃO, E. (org.). Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais. Salvador: Edufba, 2020. v. 1.

SCHOENWOLF, G. C. et al. **Larsen's human embryology**. 6th Edition. p. 548, 2020.

SHEINER, E. Gestational Diabetes Mellitus: Long-Term Consequences for the Mother and Child Grand Challenge: How to Move on Towards Secondary Prevention? **Frontiers in Clinical Diabetes and Healthcare**, v. 1, p. 1, 4 nov. 2020.

SHOOK, L. L. A et al. Placental Expression of ACE2 and TMPRSS2 in Maternal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection: are placental defenses mediated by fetal sex?. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 224, n. 6, p. 647-659, 22 jul. 2021.

SILVA, M. S. B. **Efeito estrogênico sobre a expressão do receptor de membrana para estradiol GPER 1 em tecidos secretores ou alvos para a ocitocina**. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. P. 73. 2015

SLADEK, C. D.; SONG, Z. Diverse Roles of G-Protein Coupled Receptors in the Regulation of Neurohypophyseal Hormone Secretion. **Journal Of Neuroendocrinology**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 554-565, 26 mar. 2012.

STAUD, F.; KARAHODA, R. Trophoblast: the central unit of fetal growth, protection and programming. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [S.L.], v. 105, p. 35-40, dez. 2018.

THOMAS, P. et al. Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. **Endocrinology**, [S.L.], v. 146, n. 2, p. 624-632, 1 fev. 2005.

VOGEL, C.; CHOTHIA, C. Protein Family Expansions and Biological Complexity. **PLOS Computational Biology**, v. 2, n. 5, p. e48, 2006.

WU, W. L. et al. The placental interleukin-6 signaling controls fetal brain development and behavior. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 62, p. 11–23, 1 maio 2017.

ZARETSKY, M. V. et al. Transfer of Inflammatory Cytokines Across the Placenta. **Obstetrics & Gynecology**, [S.L.], v. 103, p. 546-550, mar. 2004.

# APÊNDICE A –QUESTIONÁRIO



MINISTÉRIO DA SAÚDE



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



SARS-CoV: Suscetibilidade a transtornos do neurodesenvolvimento pela exposição à COVID-19 na gravidez.

FICHA DE RECRUTAMENTO	Versão 16/05/21	Página 1/1	Preenchimento: ___/___/___
-----------------------	--------------------	------------	-------------------------------

## IDENTIFICAÇÃO DA PACIENTE

Nome da paciente: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_ anos IG (início dos sintomas): \_\_\_s \_\_\_d

Nº do prontuário: \_\_\_\_\_ CPF: \_\_\_\_\_ Telefone: ( ) \_\_\_\_\_

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Nome de um contato: \_\_\_\_\_ Parentesco: \_\_\_\_\_ Telefone: ( ) \_\_\_\_\_

## CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

A paciente contempla os seguintes critérios?

- ( ) É maior de 18 anos.
- ( ) Idade gestacional acima de 20 semanas.
- ( ) Apresenta síndrome gripal com início nos últimos 14 dias.

## DESCRIÇÃO DA SÍNDROME GRIPAL

Início dos sintomas: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

- ( ) Febre
- ( ) Tosse
- ( ) Calafrios
- ( ) Coriza
- ( ) Dor de garganta
- ( ) Distúrbios olfativos
- ( ) Dor de cabeça
- ( ) Distúrbios gustativos

Apresenta sintomas gastrointestinais? ( ) Não ( ) Sim

Se sim, quais? \_\_\_\_\_

Outros sintomas: \_\_\_\_\_

Apresentou algum sintoma que indicasse agravamento do quadro? ( ) Não ( ) Sim / Quais?

- ( ) Dispneia/desconforto respiratório
- ( ) Saturação de O<sub>2</sub> menor que 95%
- ( ) Pressão persistente no tórax
- ( ) Coloração azulada dos lábios ou rosto
- ( ) Outro: \_\_\_\_\_

Foi vacinada contra Covid-19? ( ) Não ( ) Sim

Se sim, quantas doses recebeu? ( ) 1 dose ( ) 2 doses

DOSE	1ª dose	2ª dose
DATA		
FABRICANTE		



MINISTÉRIO DA SAÚDE



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



SARS-CoV: Suscetibilidade a transtornos do neurodesenvolvimento pela exposição à COVID-19 na gravidez.

FICHA DE DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS	Versão 16/05/21	Página 1/1	Preenchimento: ____/____/____
----------------------------------	--------------------	------------	----------------------------------

Endereço: \_\_\_\_\_

Comp.: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Nacionalidade: \_\_\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_

Etnia/Cor da pele:  Parda  Amarela  
 Branca  Preta  Outro: \_\_\_\_\_

Estado Civil:  Solteira  União Estável  Parceira do mesmo sexo  
 Casada  Separada/Divorciada  Viúva

Nível de escolaridade:  Ensino Fund. completo  Ensino Superior incomp.  
 Analfabeta  Ensino Médio incompleto  Ensino Superior completo  
 Ensino Fund. incompleto  Ensino Médio completo  Pós-Graduação

Situação ocupacional:  Estudante  Afastada por m. médicos  
 Assalariada  Atividades domésticas  Nunca trab. e/ou estudou  
 Autônoma  Desempregada  Outro: \_\_\_\_\_

Situação domiciliar (mora com):  Parceiro  Amigos  Parceiro e familiares  
 Pais  Sozinha  Parceiro e amigos  
 Familiares  Parceiro e pais  Outros: \_\_\_\_\_

Nº de residentes na casa: \_\_\_\_\_ Nº de filhos: \_\_\_\_\_ Nº de cômodos na casa: \_\_\_\_\_

Renda familiar anual:  Até R\$ 6 mil (até R\$ 500/mês)  R\$ 12 mil - R\$ 24 mil (R\$ 1.001 - R\$ 2.000/mês)  
 R\$ 6 mil - R\$ 12 mil (R\$ 501 - R\$ 1.000/mês)  > R\$ 24 mil (> R\$ 2.000/mês)

Tipo de assistência pré-natal:  Público  Particular  Público e Particular  
 Convênio  Público e Convênio  Convênio e Particular  
 Outro: \_\_\_\_\_



MINISTÉRIO DA SAÚDE



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



SARS-CoV: Suscetibilidade a transtornos do neurodesenvolvimento pela exposição à COVID-19 na gravidez.

HISTÓRIA OBSTÉTRICA E DE SAÚDE MATERNA	Versão 16/05/21	Página 1/3	Preenchimento: ___/___/___
--	--------------------	------------	-------------------------------

Número de gestações (incluindo a gravidez atual, ectópica, aborto):

Gestas: \_\_\_ Partos: \_\_\_ Abortos: \_\_\_

Gravidez anterior:

Desfecho da gestação*	IG	Ano

\*Utilizar para preencher o desfecho das gestações anteriores: Parto vaginal; Parto cesáreo; Aborto (com quantas semanas); Perda Fetal; Doença trofoblástica gestacional.

Gravidez atual: ( ) Única ( ) Gemelar ( ) Tripla ou mais ( ) Ectópica ( ) Ignorada

DUM	IG (DUM)	IG (USG)	DPP (DUM)	DPP (USG)
___/___/___	___s ___d	___s ___d	___/___/___	___/___/___

Desfecho gravidez atual:

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Idade gestacional: \_\_\_s \_\_\_d

Hora (aprox.) \_\_\_:\_\_\_

Sexo do RN: ( ) F ( ) M

Tipo de parto: \_\_\_\_\_

Complicações obst.:

História de infertilidade? ( ) Não ( ) Sim

Tratamento de infertilidade para essa gravidez?

( ) Não

( ) Recusou

( ) Sim

( ) Desconhecido

Se sim, qual tipo? \_\_\_\_\_

\*Tratamento hormonal; Inseminação artificial; Fertilização in vitro; Injeção intracitoplasmática de espermatozoides; Gravidez atual por ovo-doação.



MINISTÉRIO DA SAÚDE



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



SARS-CoV: Suscetibilidade a transtornos do neurodesenvolvimento pela exposição à COVID-19 na gravidez.

HISTÓRIA OBSTÉTRICA E DE SAÚDE MATERNA	Versão 16/05/21	Página 2/3	Preenchimento: ____/____/____
--	--------------------	------------	----------------------------------

#### HISTÓRIA FAMILIAR DE COMPLICAÇÕES OBSTÉTRICAS

Algum membro familiar apresentou alguma das seguintes complicações: aborto, hemorragia pós-parto, hipertensão gest., pré-eclâmpsia, eclâmpsia, bebê < 2500g, anomalia congênita, nascimento pré-termo, diabetes mellitus gest., óbito fetal, ou óbito neonatal? ( ) Não ( ) Sim

Se sim, especifique abaixo:

Parentesco: \_\_\_\_\_ Complicação: \_\_\_\_\_

Parentesco: \_\_\_\_\_ Complicação: \_\_\_\_\_

Parentesco: \_\_\_\_\_ Complicação: \_\_\_\_\_

#### HISTÓRIA FAMILIAR DE COMORBIDADES

- |                                    |                                    |
|------------------------------------|------------------------------------|
| ( ) Hipertensão arterial sistêmica | ( ) Artrite reumatoide             |
| ( ) Diabetes Mellitus              | ( ) Asma                           |
| ( ) Dislipidemia                   | ( ) Doença inflamatória intestinal |
| ( ) Cardiopatia                    | ( ) Epilepsia                      |
| ( ) Anemia falciforme              | ( ) História de depressão          |
| ( ) Obesidade                      |                                    |

#### HISTÓRIA DA SAÚDE MATERNA

- |  |  |
|--|--|
| ( ) Hipertensão em uso de contraceptivo oral                                 | ( ) Sífilis                                    |
| ( ) Hipertensão estágio 1 sem tratamento anti-hipertensivo                   | ( ) Infecção sexualmente transmissível         |
| ( ) Diabetes Mellitus  | ( ) Artrite reumatoide                         |
| ( ) Diabetes Mellitus Gestacional  | ( ) Asma                                       |
| ( ) Dislipidemia   | ( ) Doença inflamatória intestinal             |
| ( ) Cardiopatia  | ( ) Epilepsia                                  |
| ( ) Obesidade  | ( ) Tromboembolismo com diagnóstico confirmado |
| ( ) Anemia falciforme  | ( ) História de depressão                      |
| ( ) Infecção do trato urinário durante a gravidez / Em qual trimestre? _____ | ( ) Fator V de Leiden                          |

Síndrome do ovário policístico (SOP)? ( ) Não ( ) Sim

Se sim, foi confirmado por: \_\_\_\_\_



MINISTÉRIO DA SAÚDE



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



SARS-CoV: Suscetibilidade a transtornos do neurodesenvolvimento pela exposição à COVID-19 na gravidez.

HISTÓRIA OBSTÉTRICA E DE SAÚDE MATERNA	Versão 16/05/21	Página 3/3	Preenchimento: ___/___/___
--	--------------------	------------	-------------------------------

#### MEDICAÇÕES EM USO NA GRAVIDEZ

---



---



---

#### SUPLEMENTOS VITAMÍNICOS E MINERAIS

Utilizou alguma suplementação vitamínica e mineral antes de engravidar? ( ) Não ( ) Sim

Se sim, qual? \_\_\_\_\_ Por quantos meses? \_\_\_\_\_

Utiliza/utilizou suplementação vitamínica e mineral durante a gravidez? ( ) Não ( ) Sim

Qual suplementação utilizada? (Se possível identificar a marca)

( ) ácido fólico + sulfato ferroso

( ) sulfato ferroso

( ) ácido fólico

( ) outra: \_\_\_\_\_

Em que período? \_\_\_\_\_ (Indicar data de início e data de término, caso não esteja mais em uso.)

#### TERAPIAS ALTERNATIVAS

Utilizou terapias alternativas durante a gravidez? ( ) Não ( ) Sim

Se sim, especifique quais:

( ) Homeopatia

( ) Massagem

( ) Aromaterapia

( ) Yoga/Meditação

( ) Acupuntura

( ) Outra: \_\_\_\_\_

#### HÁBITO/USO DE DROGAS

Fazia uso de álcool ou drogas antes de engravidar? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, qual(is)? \_\_\_\_\_

Com que frequência? \_\_\_\_\_

Parou de usar quando engravidou? ( ) Sim ( ) Não

Faz uso de álcool ou drogas durante a gestação atual? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, qual(is)? \_\_\_\_\_

Com que frequência? \_\_\_\_\_

## APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título da pesquisa: Complicações neuropsiquiátricas decorrentes da exposição pré-natal ao vírus SARS-Cov2 e a complicações da gravidez: “Atenção ao Binômio mãe-bebê”**

**Pesquisador Responsável:** Francisco Herlânio Costa Carvalho

Você está sendo convidada a participar como voluntário de um estudo. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo. Para que sua participação seja possível, será necessária também a autorização e consentimento de um responsável legal, maior de idade.

**Justificativa e objetivos:** Com o desenvolvimento do presente projeto se pretende obter biomarcadores de predição para complicações maternas e perinatais relacionados à exposição ao SARS-CoV-2 e a complicações da gestação pela análise dos exossomos derivados da placenta obtidos através do plasma de gestantes. Exossomos constituem um tipo de vesícula extracelular que faz a comunicação materno-fetal. O conhecimento destes biomarcadores pode abrir oportunidades para a prevenção de alterações neuropsiquiátricas desencadeadas pela exposição materna a fatores de risco como complicações da gravidez e exposição a vírus como o SARS-CoV-2.

**Procedimentos:** Participando do estudo você está sendo convidada a responder algumas perguntas sobre sua gestação, sua saúde antes de ficar grávida e da saúde da sua família. E serão coletadas amostras de sangue (através de uma punção no braço); urina (através da micção espontânea em um frasco de coleta); placenta (após o parto serão retirado fragmentos da placenta) e líquido amniótico (durante o parto por punção da cavidade amniótica). Essas coletas serão realizadas por profissionais do serviço treinados e já habituados com as técnicas.

Caso você tenha alguma dúvida durante o andamento do estudo, poderá fazer contato conosco pelo telefone (85) 33668565. Também poderá procurar os pesquisadores responsáveis em qualquer dia da semana na MEAC.

**Benefícios:** Futuramente, poderemos utilizar os biomarcadores descobertos na pesquisa para prevenção de complicações na gestação. Entretanto, não são previstos benefícios para essa sua atual gestação.

**Riscos:** O estudo não impõe riscos às participantes, exceto pelo desconforto da punção venosa e pelo incômodo em responder às perguntas e coletar a urina.

**Sigilo e privacidade:** Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

**Ressarcimento:** Você não terá nenhum ressarcimento de despesas para participar deste estudo

**Contato:** Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com a equipe de pesquisadores: Dra Denise Ellen Francelino Cordeiro e Dr Francisco Herlanio Costa. Todos aquelas que participarem do estudo e seus responsáveis legais terão direito às informações médicas, da pesquisa e quanto ao andamento do estudo, assim como ter acesso aos resultados quando eles estiverem disponíveis, sempre que solicitado.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da MEAC: Rua: Cel. Nunes de melo S/N – Rodolfo Teófilo – Fortaleza- Ceará\_ Cep 60430-270 e-mail: [cepmeac@gmail.com](mailto:cepmeac@gmail.com). O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos, visando salvaguardar a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar dos participantes da pesquisa.

**Consentimento livre e esclarecido:** Após ter sido esclarecimento sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, procedimentos, benefícios previstos e potenciais riscos, aceito participar:

Nome do(a) participante: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_.

Nome do Responsável Legal: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do seu responsável LEGAL)

**Responsabilidade do Pesquisador:** Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Assentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma cópia deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

\_\_\_\_\_  
Data: \_\_/\_\_/\_\_.

(Assinatura do pesquisador)