

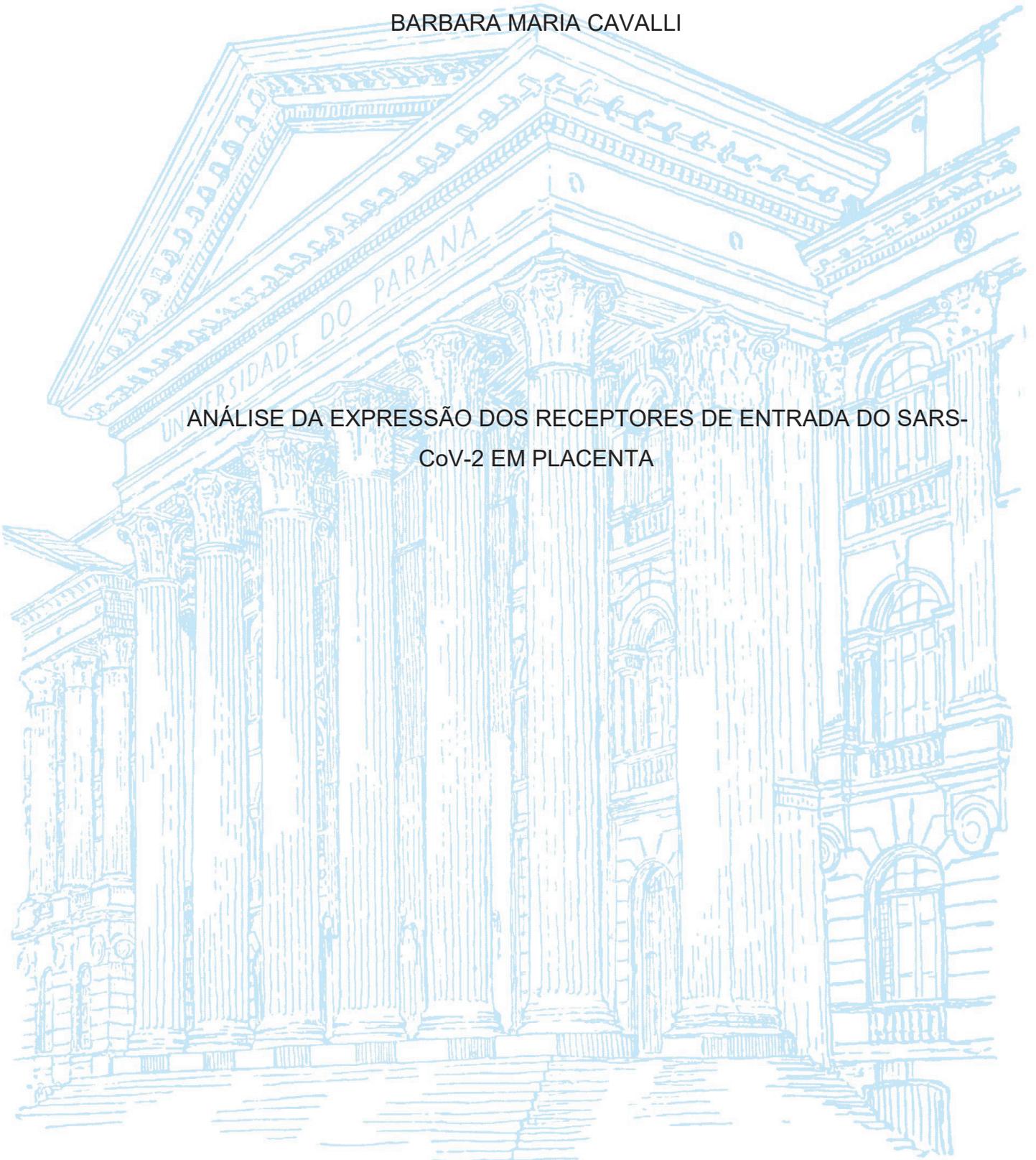
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BARBARA MARIA CAVALLI

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE ENTRADA DO SARS-CoV-2 EM PLACENTA

CURITIBA

2024



BARBARA MARIA CAVALLI

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE ENTRADA DO SARS-  
CoV-2 EM PLACENTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia e Saúde da Mulher, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Tocoginecologia e Saúde da Mulher.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Meri Bordignon Nogueira

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Lúcia de Noronha

CURITIBA

2024

C377 Cavalli, Barbara Maria  
Análise da expressão dos receptores de entrada do  
Sars-Cov-2 em placenta. [recurso eletrônico] / Barbara Maria  
Cavalli. – Curitiba, 2024.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em  
Tocoginecologia e Saúde da Mulher. Setor de Ciências da  
Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Meri Bordignon Nogueira  
Coorientadora: Prof. Dr. Lúcia de Noronha

1. SARS-CoV-2. 2. Placenta. 3. Neuropilina-1. 4. Furina.  
5. Imuno-Histoquímica. I. Nogueira, Meri Bordignon.  
II. Noronha, Lúcia de. III. Programa de Pós-Graduação em  
Tocoginecologia e Saúde da Mulher. Setor de Ciências da  
Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLM: QW 168.5.C8



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO TOCOGINECOLOGIA E  
SAÚDE DA MULHER - 40001018084P2

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação TOCOGINECOLOGIA E SAÚDE DA MULHER da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de BARBARA MARIA CAVALLI intitulada: **ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE ENTRADA DO SARS-CoV-2 EM PLACENTA**, sob orientação da Profa. Dra. MERI BORDIGNON NOGUEIRA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 24 de Outubro de 2024.

Assinatura Eletrônica  
25/10/2024 16:59:56.0  
MERI BORDIGNON NOGUEIRA  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica  
28/10/2024 12:52:54.0  
CAROLINE BUSATTA VAZ DE PAULA  
Avaliador Externo (PONTIFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO  
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
30/10/2024 09:14:50.0  
NEWTON SERGIO DE CARVALHO  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
25/10/2024 16:34:32.0  
LUINE ROSELE RENAUD MDAL  
Avaliador Externo (LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DA UFPR)

---

RUA GENERAL CARNEIRO, 181 - CURITIBA - Paraná - Brasil  
CEP 80060-900 - Tel: (41) 3525-8855 - E-mail: [pgtoco@ufpr.br](mailto:pgtoco@ufpr.br)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 407662

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>  
e insira o código 407662

Dedico este trabalho ao meu Pai Celestial e ao que foi meu pai neste mundo físico.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço às minhas admiráveis orientadoras, Dra. Meri Bordignon Nogueira e Dra. Lúcia de Noronha, sem as quais este trabalho jamais seria possível.

Aos meus queridos colegas da equipe de Virologia do Hospital de Clínicas da UFPR que tanto me incentivaram e me ofereceram suporte emocional nas horas mais difíceis.

Ao meu marido Walter Ortiz que me compreendeu e incentivou.

À minha colega de trabalho e de pesquisa Carolina Tanaka Dino que dividiu comigo o trabalho laboratorial, o seu conhecimento e sua motivação.

À toda equipe do Laboratório de Patologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, onde grande parte deste trabalho foi realizado, especialmente ao Dr. Seigo Nagashima, Dra. Caroline Busatta Vaz de Paula e Dra. Patrícia Rebutini.

Às instituições que colaboraram para este projeto: Universidade Federal do Paraná, Complexo do Hospital de Clínicas da UFPR, EBSEH, Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia e Saúde da Mulher, Pró Reitoria de Planejamento Orçamento e Finanças (PROPLAN), CNPQ e a Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

E a todos os que de alguma forma se envolveram com este trabalho ou me incentivaram a continuar e cujos nomes não caberiam em tão pouco espaço.

Minha infinita gratidão!

Qualquer pessoa de sucesso sabe que é uma peça importante, mas também sabe que não conseguirá nada sozinho.

Bernardino

## RESUMO

No final de 2019 um surto de pneumonia viral de origem desconhecida emergiu em Wuhan, China e rapidamente se espalhou pelo mundo tornando-se uma pandemia. A doença, que recebeu o nome de doença do coronavírus 2019 (COVID-19) é causada por um coronavírus denominado SARS-CoV-2 (coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave) e causou preocupação em relação aos efeitos que poderia ter na gestação. Devido à escassez de informações ainda não é possível compreender completamente os mecanismos de infecção intrauterina do SARS-CoV-2. Este estudo foi proposto com o objetivo de avaliar a expressão tecidual de receptores e cofatores envolvidos na via de entrada do SARS-CoV-2 (ECA-2, TMPRSS-2, furina, neuropilina-1 (NRP-1) e ADAM-17) em tecidos placentários de gestantes com SARS-CoV-2. Entre os anos de 2020 e 2021, foram selecionadas 75 placentas de gestantes com exames de RT-qPCR positivos para SARS-CoV-2 para compor o grupo COVID-19. Para o grupo comparativo (NÃO COVID) foram selecionadas 11 placentas de gestantes que deram à luz em anos anteriores a pandemia, portanto conhecidamente SARS-CoV-2 negativas. A técnica de imunohistoquímica foi utilizada com a finalidade de identificar a expressão tecidual dos receptores ECA-2, NRP-1 e cofatores furina, TMPRSS-2 e ADAM-17 nas placentas, tanto na decídua como nas vilosidades placentárias. Os tecidos placentários também foram avaliados quanto à presença de RNA do SARS-CoV-2 através de testes de RT-qPCR em material parafinado. Verificou-se menor expressão do receptor NRP-1 em amostras de decídua placentária do grupo com COVID-19 em relação ao grupo NÃO COVID-19. Esta menor expressão de NRP-1 foi confirmada quando somente as 11 amostras placentárias com resultados positivos para RNA do SARS-CoV-2 em tecido parafinado foi comparada com as amostras do grupo NÃO COVID-19. Não houve diferença na expressão tecidual de NRP-1 nas amostras de vilosidades e também na expressão tecidual de ECA-2, TMPRSS2, furina e ADAM-17 nas amostras tanto de decídua quanto de vilosidades. Os resultados oferecem respaldo para orientar novos estudos acerca do papel que a neuropilina-1 desempenha tanto na entrada viral como na patogênese da infecção na placenta.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; placenta; neuropilina-1; ECA-2; TMPRSS-2; furina; ADAM-17; imunohistoquímica; RT-qPCR

## ABSTRACT

In late 2019, an outbreak of viral pneumonia of unknown origin emerged in Wuhan, China, and quickly spread worldwide, becoming a pandemic. The disease, which has been named coronavirus disease 2019 (COVID-19), is caused by a coronavirus called SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) and has raised concerns about the effects it could have on pregnancy. Due to the lack of information, it is not yet possible to fully understand the mechanisms of intrauterine infection by SARS-CoV-2. This study was proposed with the aim of evaluating the tissue expression of receptors and cofactors involved in the entry pathway of SARS-CoV-2 (ACE-2, TMPRSS-2, furin, neuropilin-1 (NRP-1), and ADAM-17) in placental tissues of pregnant women with SARS-CoV-2. Between 2020 and 2021, 75 placentas from pregnant women with positive RT-qPCR tests for SARS-CoV-2 were selected to compose the COVID-19 group. For the comparative group (NO COVID), 11 placentas from pregnant women who gave birth in years prior to the pandemic and were therefore known to be SARS-CoV-2 negative were selected. The immunohistochemistry technique was used to identify the tissue expression of ACE-2, NRP-1 receptors and cofactors furin, TMPRSS-2 and ADAM-17 in the placentas, both in the decidua and in the placental villi. Placental tissues were also evaluated for the presence of SARS-CoV-2 RNA through RT-qPCR tests on paraffin-embedded material. Lower expression of the NRP-1 receptor was found in placental decidua samples from the COVID-19 group compared to the NON-COVID-19 group. This lower expression of NRP-1 was confirmed when only the 11 placental samples with positive results for SARS-CoV-2 RNA in paraffin-embedded tissue were compared with samples from the NON-COVID-19 group. There was no difference in tissue expression of NRP-1 in villi samples. There was no difference in tissue expression of ACE-2, TMPRSS2, furin and ADAM-17 in both decidua and villi samples. The results provide support to guide further studies on the role that neuropilin-1 plays in both viral entry and pathogenesis of infection in the placenta.

Keywords: SARS-CoV-2; placenta; neuropilin-1; ACE-2; TMPRSS-2; furin; ADAM-17; immunohistochemistry; RT-qPCR

## RESUMO POPULAR

No final de 2019 um surto de uma pneumonia de causa desconhecida começou em uma cidade da China, chamada Wuhan, e se espalhou pelo mundo todo causando muitas mortes. Essa doença recebeu o nome de doença do coronavírus 2019, também conhecida como COVID-19, porque o vírus causador foi chamado de: coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2). A COVID-19 também levou a muitas preocupações pelos males que poderia causar em mulheres grávidas e seus bebês. Isso porque ainda existem poucas informações e pesquisas sobre este assunto e não há como saber ao certo como esse vírus passa do sangue da mãe para o bebê dentro do útero. Por este motivo, essa pesquisa foi feita para estudar alguns mecanismos (conhecidos como receptores) que o vírus poderia usar para passar das células do útero da mãe para o sangue do bebê usando estruturas microscópicas presentes na placenta. O nome dos receptores pesquisados são: ECA-2, serina protease transmembrana 2, furina, neuropilina-1 e ADAM-17. Entre os anos de 2020 e 2021 foram coletadas 75 amostras de placenta de mulheres grávidas positivas para COVID-19 e também 11 amostras de mulheres grávidas que eram negativas para COVID-19. Essas amostras foram coradas com corantes especiais para identificar os receptores e determinar a quantidade deles em cada amostra, comparando as amostras de placentas de mulheres grávidas com COVID-19 e sem COVID-19. Depois de fazer a coloração as amostras foram analisadas em um computador para determinar as quantidades dos receptores. A análise mostrou que as grávidas com COVID-19 tinham menos do receptor chamado neuropilina-1 do que as sem COVID-19. Isso indica que o vírus causador da COVID-19 pode ter usado e gastado este receptor para infectar a placenta. Os outros receptores pesquisados não tiveram diferença entre as grávidas com COVID-19 e sem COVID-19. Os resultados dessa pesquisa são importantes para que os cientistas façam outros estudos para confirmar se o vírus causador da COVID-19 usa mesmo o receptor neuropilina-1 para infectar a placenta e também desenvolver tratamentos para impedir a infecção.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; placenta; neuropilina-1; ECA-2; TMPRSS-2; furina; ADAM-17; imuno-histoquímica; RT-qPCR

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - TAXONOMIA DA ORDEM NIDOVIRALES .....	19
FIGURA 2 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA <i>SPIKE</i> .....	22
FIGURA 3 - BIOSÍNTESE E REPLICAÇÃO DO SARS-COV-2 .....	23
FIGURA 4 - RECEPTORES E COFADORES DE ENTRADA DO SARS-COV-2 NA CÉLULA ALVO .....	25
FIGURA 5 – ESTRUTURA, RECEPTORES E LIGANTES DAS NEUROPILINAS. ..	29
FIGURA 6 - ESTRUTURA DA INTERFACE MATERNO - FETAL .....	35
FIGURA 7 – SELEÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE PLACENTA.	39
FIGURA 8 - CONFECÇÃO DO TMA E COLORAÇÃO DA LÂMINA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA COM ANÁLISE DAS IMAGENS .....	43
FIGURA 9 - IMAGENS CORADAS COM HEMATOXILINA-EOSINA EM TECIDO DE PLACENTA .....	44
FIGURA 10 - MENSURAÇÃO DAS ÁREAS DE IMUNOEXPRESSION PELO SOFTWARE IMAGE PRO-PLUS® .....	45
FIGURA 11 - PROCESSAMENTO E EXTRAÇÃO DO TECIDO PARAFINADO COM POSTERIOR RT-QPCR .....	46
FIGURA 12 - COLORAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA OS RECEPTORES NA DECÍDUA E VILOSIDADES .....	54

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DA NRP-1 ENTRE GRUPO COVID-19 E GRUPO NÃO COVID-19 .....	53
--	----

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - DESCRIÇÃO DOS ANTICORPOS PRIMÁRIOS UTILIZADOS NA IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS RECEPTORES DE SARS-COV-2 .....	44
---	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- INFORMAÇÕES CLÍNICAS DAS GESTANTES COM COVID-19.....	48
TABELA 2 - INFORMAÇÕES CLÍNICAS DAS GESTANTES DO GRUPO NÃO COVID-19.....	50
TABELA 3 - INFORMAÇÕES CLÍNICAS DOS RECÉM-NASCIDOS (RN) DO GRUPO COVID-19.....	51
TABELA 4 - INFORMAÇÕES CLÍNICAS DOS RECÉM-NASCIDOS (RN) DO GRUPO NÃO COVID-19.....	51
TABELA 5 - INFORMAÇÕES DAS ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS DAS PLACENTAS DO GRUPO COVID-19.....	52
TABELA 6 - INFORMAÇÕES DAS ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS DAS PLACENTAS DO GRUPO NÃO COVID-19.....	52
TABELA 7 – IMUNO-HISTOQUÍMICA DO GRUPO COVID-19 X GRUPO NÃO COVID-19.....	53
TABELA 8 - COMPARAÇÃO ENTRE A PORCENTAGEM DE NRP-1 ENTRE GRUPO COVID-19 E NÃO COVID-19 NAS PACIENTES SEM COMORBIDADES NA DECÍDUA.....	55
TABELA 9 - COMPARAÇÃO ENTRE A PORCENTAGEM DE NRP-1 ENTRE GRUPO COVID-19 E NÃO COVID-19 NAS PACIENTES SEM AS DOENÇAS DE BASE NA DECÍDUA.....	55
TABELA 10 - COMPARAÇÃO DAS 11 AMOSTRAS DE DECÍDUAS POSITIVAS NA RT-QPCR COM O GRUPO NÃO COVID-19.....	56

## LISTA DE SIGLAS

ADAM-17	Do inglês: <i>A disintegrin and metalloproteinase 17</i>
ANG	Angiotensina
APGAR	Do inglês <i>Appearance, Pulse, Grimace, Activity, Respiration</i>
CGA	Do inglês: <i>Color Graphics Adapter</i>
CHC-UFPR	Complexo Hospital de Clínicas – Universidade Federal do Paraná
CMV	Citomegalovirus
COVID-19	Do inglês: <i>Coronavirus disease 2019</i>
CTD	Do inglês: <i>Citoplasmatic domain</i>
DHEG	Doença hipertensiva específica da gravidez
DMVs	Vesículas de membrana dupla
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBV	Epstein-Barr Virus
ECA-2	Enzima conversora de angiotensina 2
ERGIC	Do inglês: <i>Endoplasmic-reticulum–Golgi intermediate compartment</i>
FFPE	Do inglês: <i>Formalin-fixed paraffin-embedded</i>
FP	Peptídeo de fusão
gRNA	RNA genômico
H&E	Hematoxilina/Eosina
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCoV229E	Human coronavirus 229E
HCoVHKU	Human coronavirus HKU
HCoVNL63	Human coronavirus NL63
HCoVOC43	Human coronavirus OC43
HGF	Do inglês: <i>Hepatocyte growth factor</i>
HNSG	Hospital Nossa Senhora das Graças
HSV	Herpes simplex vírus
HTLV-1	Human T Lymphotropic Virus
kDa	Kilodalton
MERS-CoV	<i>Middle East respiratory syndrome–related coronavirus</i>
NAAT	Do inglês: <i>Nucleic acid amplification test</i>
NRP-1	Neuropilina 1

NTD	Domínio N-terminal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGF	Do inglês: <i>Platelet-derived growth factor</i>
PE	Pré-eclâmpsia
RBD	Do inglês: <i>Receptor-binding domain</i>
RBM	Do inglês: <i>Receptor-binding motif</i>
RdRP	Do inglês: <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RTC	Complexo replicase transcriptase
RT-PCR	Do inglês: <i>Reverse transcriptase - polymerase chain reaction</i>
S	Proteína <i>Spike</i>
S1	Subunidade S1
S2	Subunidade S2
sACE-2	ACE-2 solúvel
SARS-CoV-2	Do inglês: <i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
ssRNA	Do inglês: <i>Single strand RNA</i>
TC	Tomografia computadorizada
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- $\beta$	Do inglês: <i>Transforming growth factor beta</i>
TMA	Do inglês: <i>Tissue Microarray</i>
TMD	Do inglês: <i>Transmembrane domain</i>
TMPRSS-2	Do inglês: <i>Transmembrane serine protease 2</i>
TNF- $\alpha$	Do inglês: <i>Tumor Necrosis Factor - Alpha</i>
UTI	Unidade de terapia intensiva
VEGF	Do inglês: <i>Vascular endothelial growth factor</i>
ZIKV	Vírus Zika

## LISTA DE SÍMBOLOS

© copyright

@ arroba

® marca registrada

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 OBJETIVOS .....	17
1.1.1 Objetivo geral .....	17
1.1.2 Objetivos específicos.....	17
1.2 JUSTIFICATIVA .....	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
2.1 SARS-COV-2: HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO.....	19
2.2 ESTRUTURA VIRAL E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA.....	20
2.3 BIOSÍNTESE VIRAL .....	23
2.3.1 Entrada e replicação viral .....	23
2.4 RECEPTORES E COFADORES .....	24
2.4.1 ECA-2.....	25
2.4.2 Furina e TMPRSS2 .....	26
2.4.3 Neuropilina – 1 .....	27
2.4.4 ADAM-17.....	29
2.5 SINTOMAS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	30
2.6 EPIDEMIOLOGIA.....	31
2.7 DIAGNÓSTICO .....	32
2.8 SARS-COV-2 E GESTAÇÃO .....	33
2.9 COMPONENTES DA INTERFACE-MATERNAL FETAL.....	34
2.10 TRANSMISSÃO VERTICAL.....	35
2.10.1 Classificação da transmissão vertical.....	36
2.10.1.1 Transmissão intrauterina .....	36
2.10.1.2 Transmissão intraparto .....	36
2.10.1.3 Transmissão pós-natal .....	36
2.10.2 Evidências .....	36
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
3.1 APROVAÇÕES ÉTICAS .....	38
3.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	38
3.3 COLETA DA AMOSTRA .....	39
3.4 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA.....	40

3.5	INFORMAÇÃO CLÍNICA.....	40
3.6	TESTE PARA SARS-COV-2 (RT-QPCR E SOROLOGIA).....	41
3.7	ANÁLISE MORFOLÓGICA .....	41
3.8	CONFECÇÃO DOS BLOCOS <i>TISSUE MICROARRAY</i> (TMAS) .....	42
3.9	TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	43
3.10	ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	45
3.11	EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL E RT-QPCR DAS AMOSTRAS DE PLACENTA PARAFINADA .....	46
3.11.1	Extração do RNA viral .....	46
3.11.2	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), em etapa única ( <i>OneStep</i> ).....	47
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
4.1	INFORMAÇÕES CLÍNICAS .....	48
4.2	IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	52
4.3	RT-QPCR PARA SARS-COV-2 EM AMOSTRAS PLACENTÁRIAS PARAFINADAS .....	56
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>LIMITAÇÕES .....</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>
	<b>ANEXO I .....</b>	<b>72</b>
	<b>ANEXO II.....</b>	<b>73</b>
	<b>ANEXO III.....</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No final de 2019 um surto de pneumonia viral de origem desconhecida emergiu em Wuhan, China e rapidamente se espalhou pelo mundo tornando-se uma pandemia. A doença, que recebeu o nome de doença do coronavírus 2019 (COVID-19) é causada por um coronavírus denominado SARS-CoV-2 (coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave) (LU *et al.*, 2020).

O SARS-CoV-2 causa infecção assintomática ou com sintomas leves na maioria dos casos. Entretanto, algumas pessoas portadoras de fatores de risco como idade avançada, doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade apresentam maiores taxas de complicações e tem maiores riscos de desenvolver doença grave (NOBREGA *et al.*, 2021).

Conforme a pandemia se espalhava pelo mundo, também foi aumentando a preocupação em relação aos efeitos que este vírus poderia promover na gestação, pois é conhecido que alguns vírus, como o herpes simplex (HSV), citomegalovírus (CMV) e o vírus da rubéola, podem causar infecções congênitas e prejudicar o estado de saúde do feto (KOMINE-AIZAWA; TAKADA; HAYAKAWA, 2020).

As adaptações fisiológicas do organismo materno à gravidez podem levar ao risco aumentado de sintomas graves em resposta à infecções respiratórias virais (FENIZIA *et al.*, 2020). Em alguns vírus do mesmo gênero, tal como SARS-CoV e o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), há um risco aumentado de morbidade e mortalidade em gestantes (NOBREGA *et al.*, 2021).

Alguns estudos têm demonstrado que gestantes infectadas por SARS-CoV-2 têm maiores taxas de parto prematuro, morte neonatal, admissão em UTI, necessidade de ventilação mecânica, oxigenação extracorpórea e morte do que pacientes não gestantes (KO *et al.*, 2021; SIMBAR; NAZARPOUR; SHEIDAEI, 2023; ZAMBRANO *et al.*, 2020). Além disso, foram publicados estudos demonstrando que embora a taxa de transmissão vertical seja baixa, ela é possível (STONOGA *et al.*, 2021; VIVANTI *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2023).

A via canônica para a entrada do SARS-CoV-2 nas células inclui o receptor enzima conversora de angiotensina 2 (ECA – 2) e a serina protease transmembrana 2 (TMPRSS – 2) como cofator. Embora a expressão tecidual da ECA-2 e TMPRSS-2 nos tecidos da placenta seja baixa existem receptores e cofatores alternativos já descritos para este vírus e que poderiam estar implicados na infecção das células da

placenta com posterior transmissão intrauterina (CONSTANTINO *et al.*, 2021; PIQUE-REGI *et al.*, 2020).

Tendo em vista que os mecanismos para transmissão vertical do SARS-CoV-2 ainda não estão bem elucidados, o presente trabalho se propõe a avaliar a expressão tecidual dos receptores e cofatores ECA-2, TMPRSS-2, furina, neuropilina-1 e ADAM-17 em tecidos de placentas de gestantes infectadas pelo vírus e comparar a um grupo comprovadamente negativo.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão tecidual de marcadores associados a entrada do SARS-CoV-2 em tecidos placentários de gestantes com COVID-19 em relação a um grupo NÃO COVID-19.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- avaliar a expressão tecidual dos receptores e cofatores (enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2), serina protease transmembrana 2 (TMPRSS-2), furina, neuropilina-1 (NRP-1) e Desintegrina Metaloproteinase 17 (ADAM-17)) em amostras de placentas de gestantes com COVID-19 em relação a um grupo NÃO COVID-19;
- avaliar se existe alguma comorbidade ou característica materna, fetal ou placentária, que altera a expressão tecidual dos receptores e cofatores analisados neste estudo.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Alguns vírus, como o da rubéola, citomegalovírus (CMV), o vírus herpes simples (HSV) e o vírus ZIKA (ZIKV) podem causar infecção congênita com danos à saúde do recém-nascido. Há vários mecanismos potenciais que podem estar envolvidos na transmissão vertical, além da via de transmissão de um vírus para o

feto depender de propriedades tanto do vírus em questão quanto do hospedeiro (KOMINE-AIZAWA; TAKADA; HAYAKAWA, 2020; WASTNEDGE et al., 2021).

As recomendações da OMS sobre as evidências de transmissão vertical são bastante amplas e envolvem diferentes vias. O SARS-CoV-2 foi detectado em diferentes amostras como placenta, sangue de cordão umbilical e líquido amniótico, evidenciando possível transmissão vertical. Sendo esse um vírus recente, que apresenta um mecanismo de transmissão da mãe para o feto ainda não completamente compreendido e com escassez de informações a esse respeito, o presente estudo busca ampliar a investigação da expressão tecidual dos seguintes receptores e cofatores da via de entrada do SARS-CoV-2: ECA-2, TMPRSS-2, furina, neuropilina-1 (NRP-1) e ADAM-17 em tecidos placentários de gestantes com COVID-19, visando contribuir com o entendimento desse processo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

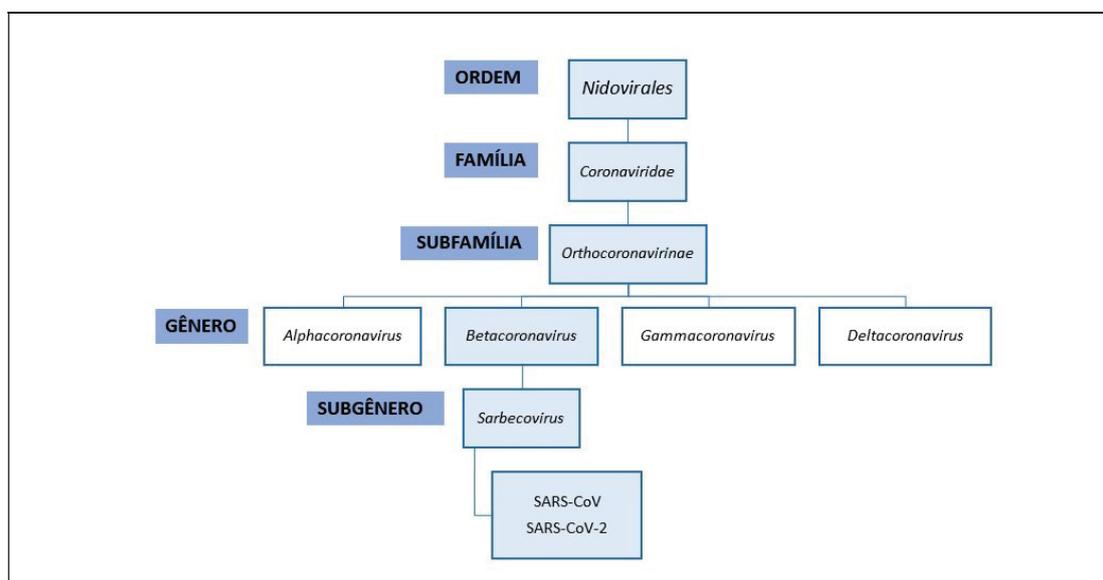
### 2.1 SARS-CoV-2: HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO

O SARS-CoV-2 pertence à família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae*, gênero *Betacoronavirus* e subgênero *Sarbecovirus* conforme Figura 1 (ICTV, 2024).

Os membros da subfamília *Orthocoronavirinae* são vírus nos quais a superfície é constituída de proteínas *spike* (S), o que lhes confere uma morfologia que se assemelha a uma coroa. Foram isolados pela primeira vez como agentes causadores de bronquite em pássaros em 1937 (MINGALEEVA *et al.*, 2022; PENG *et al.*, 2021; RAVI; SAXENA; PANDA, 2022).

Nessa subfamília, os membros dos gêneros *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus*, infectam mamíferos, especialmente morcegos, e os membros dos gêneros *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* infectam principalmente aves, mas podem infectar também mamíferos (WOO *et al.*, 2023).

FIGURA 1 - TAXONOMIA DA ORDEM NIDOVIRALES



FONTE: ICTV (2024)

Entre os coronavírus que infectam humanos encontram-se os HCoVs (coronavírus humanos) HCoV229E, HCoVOC43, HCoVNL63, HCoVHKU1, os quais estão associados a resfriados sazonais sem sintomas graves. Os outros três vírus,

SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2, são classificados como altamente patogênicos e tem causado epidemias e pandemias. Os primeiros coronavírus humanos a serem identificados foram o HCoV-229E e HCoV-OC43 em 1966 e 1967 respectivamente (PENG et al., 2021).

No final de 2002 um novo coronavírus denominado SARS-CoV (um acrônimo em inglês para coronavírus da síndrome respiratória aguda grave) foi identificado em Guangdong, China (ZHONG; ZHENG, 2003). Este vírus causou uma epidemia que se espalhou por mais de 30 países e terminou em 2003 com cerca de 8.000 casos relatados e uma taxa de mortalidade de 10%. Isso levou a um crescente interesse pelos coronavírus que resultou na identificação de mais dois vírus: HCoV-NL63 em 2004 na Holanda e HCoV-HKU1 em 2004 em Hong Kong (MINGALEEVA et al., 2022).

Em 2012, na Arábia Saudita, o segundo coronavírus altamente patogênico foi identificado ocasionando uma epidemia com mais de 2.500 casos relatados e uma taxa de mortalidade de cerca de 35% (ZAKI et al., 2012). As infecções ficaram restritas a países do Oriente Médio e alguns países asiáticos e o novo vírus recebeu a denominação MERS-CoV, um acrônimo para coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MINGALEEVA et al., 2022; RAVI; SAXENA; PANDA, 2022).

Em dezembro de 2019 o sétimo coronavírus humano foi identificado em Wuhan, China. Este vírus, denominado SARS-CoV-2, levou a uma pandemia global sem precedentes (ZHU et al., 2020). Em março de 2020 a Europa tornou-se o epicentro da pandemia do novo coronavírus, o qual tem uma vantagem sobre o SARS-CoV: uma mutação na proteína S tornou possível ao vírus ser mais transmissível, o que levou o SARS-CoV-2 a se espalhar por quase todos os países mundo (GÓMEZ; PERDIGUERO; ESTEBAN, 2021; MINGALEEVA et al., 2022)..

## 2.2 ESTRUTURA VIRAL E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

As partículas virais do SARS-CoV-2 apresentam formato esférico com RNA de fita simples com polaridade positiva a qual pode servir diretamente como um RNA mensageiro (RNAm) para a tradução de proteínas virais (RANDO et al., 2021; ZHENG et al., 2023). O RNA viral é circundado pela proteína do nucleocapsídeo (N) e pelo envelope, uma bicamada lipídica na qual a proteína de espícula, no inglês

*spike* (S), proteína de membrana (M) e a proteína do envelope (E) estão ancoradas (V'KOVSKI et al., 2021).

O genoma, que possui tamanho de 26-32 kbp, codifica três classes de proteínas: duas grandes poliproteínas, pp1a e pp1ab, que são clivadas em 16 proteínas não estruturais (NSPs) as quais são necessárias para a síntese de RNA viral, montagem do complexo de transcrição e a correção de nucleotídeos mal colocados; quatro proteínas estruturais, as proteínas de espícula ou *spike* (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N) que são essenciais para a entrada e montagem viral; e 11 proteínas acessórias que modulam e neutralizam a imunidade do hospedeiro durante a infecção (MALONE et al., 2022; V'KOVSKI et al., 2021).

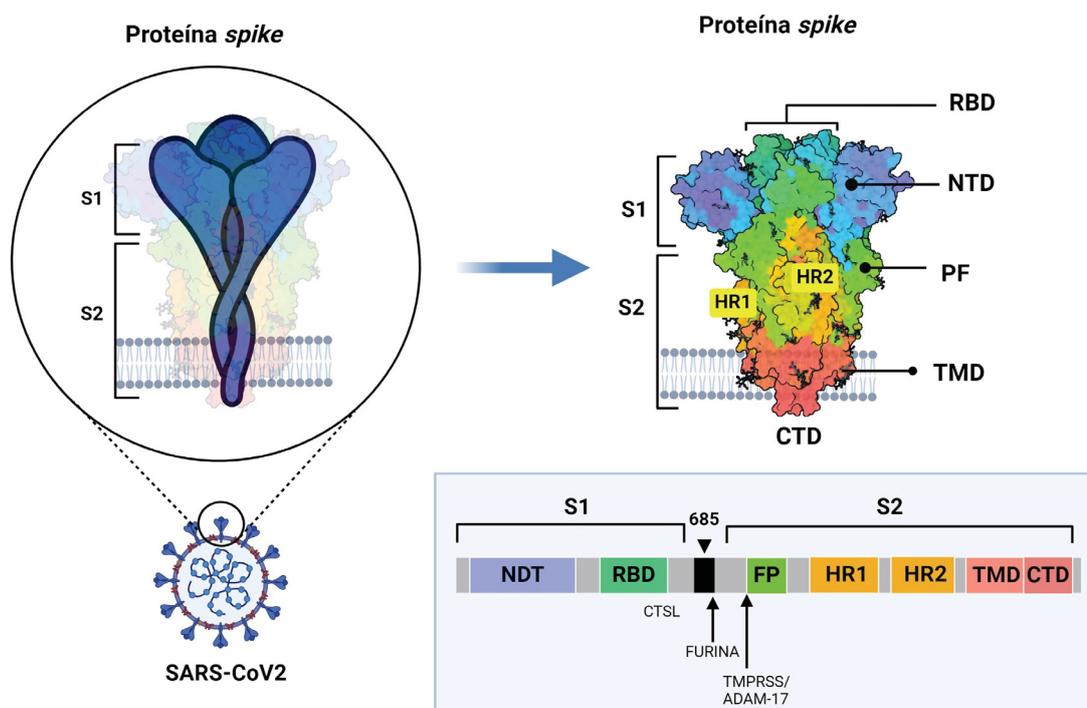
A entrada viral é a primeira etapa da infecção, a qual é executada pela proteína *spike* (S), a qual reconhece o receptor da célula hospedeira e medeia a fusão da membrana para permitir que o RNA viral seja liberado no citoplasma (PENG et al., 2021).

A proteína S, que possui 180-200 kDa e 1.273, aminoácidos está localizada na superfície do vírus na forma de um trímero, formando uma “cabeça” e uma “haste”. Cada partícula trimérica é revestida com 66 glicanos que dificultam o reconhecimento do vírus pelo sistema imunológico do hospedeiro e auxiliam a fixação do vírus. A proteína S é formada por 2 subunidades: S1 é responsável pela ligação ao receptor e S2 pela fusão do vírus com a membrana da célula hospedeira. Os principais domínios da subunidade S1 são o domínio N-terminal (NTD) e o domínio de ligação ao receptor, do inglês *receptor-binding domain* (RBD). Dentro do domínio RBD, é reconhecido o *receptor-binding motif* (RBM), que se liga diretamente ao receptor (JACKSON et al., 2022; LAN et al., 2020).

O peptídeo de fusão (FP), dois domínios *heptad repeat* (HR1 e HR2), domínios transmembrana (TMD) e citoplasmático (CTD) fazem parte da subunidade S2. Na conformação nativa, a subunidade S1 “envolve” a subunidade S2, que forma o centro da proteína. Após a clivagem da subunidade S1 pelas proteases endógenas, ocorrem rearranjos dentro da subunidade S2, incluindo redobrimento do domínio HR1, devido ao qual o peptídeo de fusão PF é liberado e integrado na membrana da célula hospedeira (HOFFMANN et al., 2020; PENG et al., 2021; WALLS et al., 2017).

Esta modificação da proteína S é possibilitada através de duas etapas de clivagem proteolítica. O primeiro deles está localizado no limite S1-S2, e o segundo está localizado no sítio S2' na subunidade S2. No caso do SARS-CoV-2, a fronteira S1-S2 é clivada pela furina durante a biossíntese viral, enquanto a clivagem do local S2' requer proteases da célula-alvo. TMPRSS2 e catepsina L (CTSL) são as principais proteases envolvidas na ativação da proteína S (Figura 2). Pelo fato de a TMPRSS2 estar presente na superfície celular, a ativação da proteína S mediada por TMPRSS2 ocorre na membrana celular, enquanto a ativação mediada pela catepsina ocorre no endossomo (JACKSON *et al.*, 2022).

FIGURA 2 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA SPIKE



FONTE: Adaptado de BIORENDER, 2020

LEGENDA: S1 – subunidade 1; S2 – subunidade 2; RBD – domínio de ligação ao receptor; NTD - domínio N-terminal; PF – peptídeo de fusão; TMD - domínio transmembrana; CTD – domínio citoplasmático; HR1 - heptad repeat domain 1; HR2 - heptad repeat domain 2

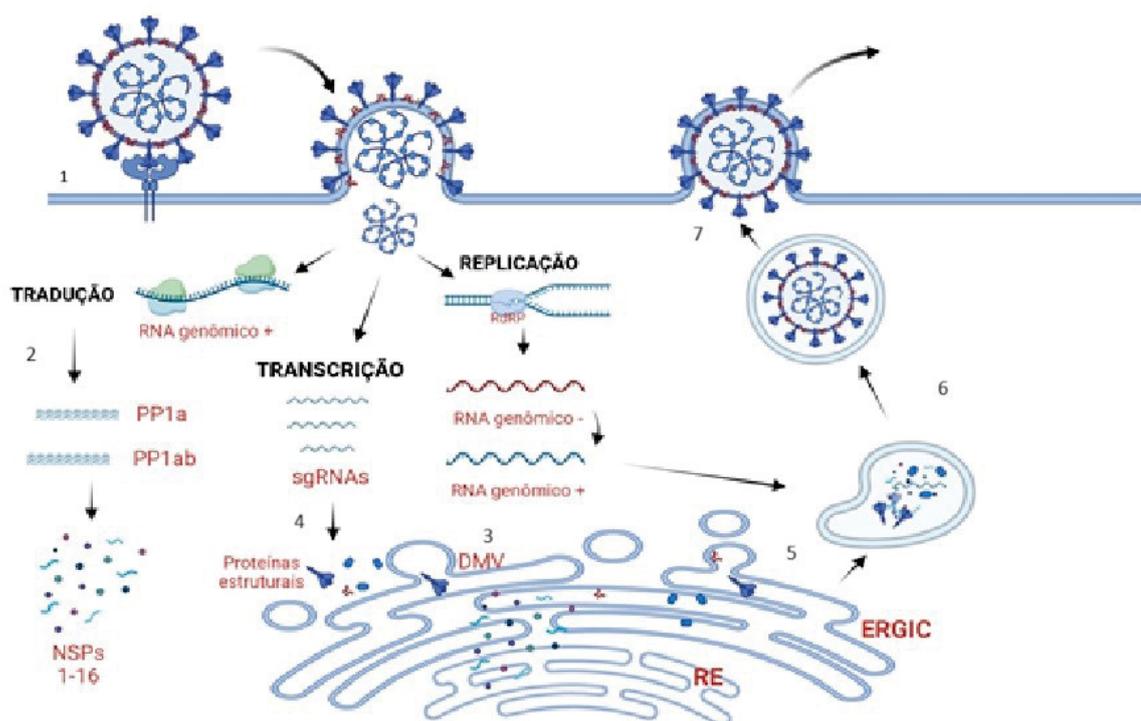
## 2.3 BIOSÍNTESE VIRAL

### 2.3.1 Entrada e replicação viral

Os coronavírus entram na célula da seguinte maneira: primeiro a proteína S viral interage com seu receptor na superfície celular e em seguida é clivada por proteases celulares e transformada em sua forma ativa capaz de realizar a fusão das membranas virais e celulares (MINGALEEVA et al., 2022). O receptor canônico para o SARS-CoV-2 é a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2), a qual é também utilizada pelo SARS-CoV (HOFFMANN et al., 2020).

O ciclo de replicação viral obedece aos passos mostrados na Figura 3.

FIGURA 3 - BIOSÍNTESE E REPLICAÇÃO DO SARS-COV-2



FONTE: O autor (2024).

Criado com BioRender.com

- No desenho esquemático são mostrados os passos da biossíntese do SARS-CoV-2:
1. A proteína de espícula (*spike*) do SARS-CoV-2 interage com a ECA-2 (ou receptores alternativos) enquanto é clivada por proteases celulares, como a serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2), para ativar sua capacidade de fusão de membrana;
  2. Depois que o genoma viral ssRNA (+) é liberado no citoplasma do hospedeiro, ele é traduzido e produz duas grandes poliproteínas pp1a e pp1ab, que são clivadas proteoliticamente nas proteínas não estruturais NSPs 1 a 16;
  3. As NSPs montam o complexo replicase-transcriptase do coronavírus (RTC) e remodelam as membranas para formar organelas para a síntese de RNA viral. A replicação e transcrição

- viral ocorrem em vesículas de membrana dupla (DMVs) derivadas do retículo endoplasmático (RE);
4. Os RNAs subgenômicos transcritos (sgRNAs) são traduzidos nas proteínas estruturais espícula (S), envelope (E), membrana (M), nucleocapsídeo (N) e proteínas acessórias;
  5. As proteínas S, E e M que estão ancoradas à membrana do RE migram para o local de montagem do vírion conhecido como retículo endoplasmático-compartimento intermediário de Golgi (ERGIC);
  6. A montagem do SARS-CoV-2 começa com o revestimento do RNA genômico (gRNA) com proteínas do nucleocapsídeo (N) gerando estruturas que brotam do ERGIC, adquirindo assim uma bicamada lipídica contendo as proteínas espícula viral (S), da membrana (M) e do envelope (E);
  7. O virion envelopado é então libertado das células através dos lisossomas (KUNG *et al.*, 2022; MALONE *et al.*, 2022 com modificações).

## 2.4 RECEPTORES E COFADORES

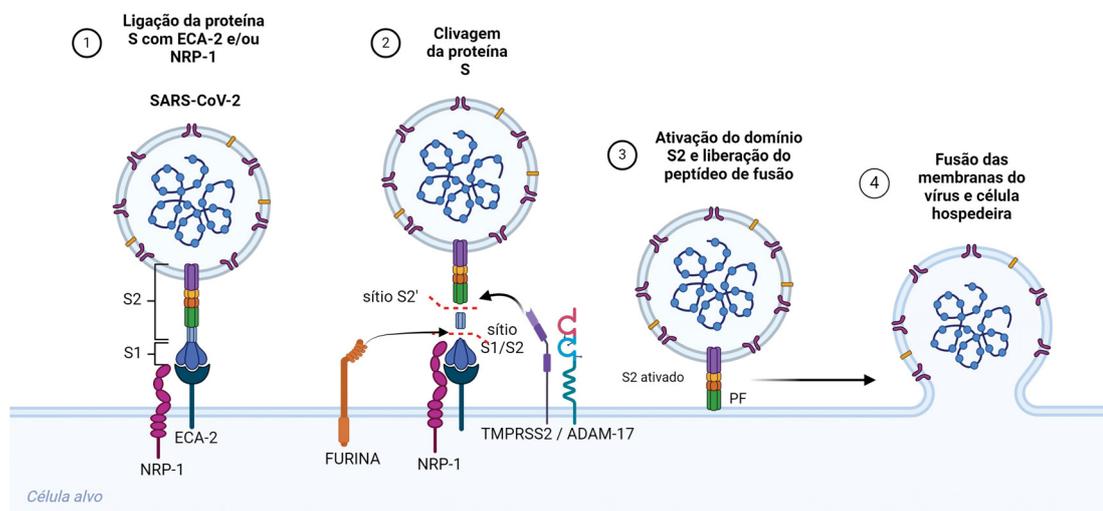
Apesar de a ECA-2 ser o receptor canônico para o SARS-CoV-2, foi descrito que este vírus também pode infectar células independentemente da ligação a esta enzima, implicando na existência de receptores e/ou cofatores alternativos (ARGUETA *et al.*, 2022b; CONSTANTINO *et al.*, 2021; KONG *et al.*, 2022; NAIDU *et al.*, 2024).

Jocher e colaboradores (2022) demonstraram que ADAM17 e ADAM10 também clivam a proteína *spike* e facilitam a infecção por SARS-CoV-2 (JOCHER *et al.*, 2022).

Foi descrito também que a NRP-1 se liga à proteína S1 clivada pela furina facilitando a entrada viral e potencializando, assim, a infectividade do SARS-CoV-2 conforme Figura 4 (CANTUTI-CASTELVETRI *et al.*, 2020; DALY *et al.*, 2020; KONG *et al.*, 2022).

Além dos citados, estudos identificaram receptores adicionais que representam alternativas a ECA-2 para entrada do SARS-CoV-2 nas células. Estes podem desempenhar um papel significativo, particularmente em células ou órgãos onde a ECA-2 não é expressa (BARTHE *et al.*, 2023).

FIGURA 4 - RECEPTORES E COFATORES DE ENTRADA DO SARS-COV-2 NA CÉLULA ALVO



FONTE: Adaptado de (TEAM, 2020)

LEGENDA: NRP-1 – neuropilina 1; ECA-2- enzima conversora de angiotensina 2; TMPRSS2- serina protease transmembrana 2; ADAM-17- Desintegrina Metaloproteinase 17; PF- peptídeo de fusão

#### 2.4.1 ECA-2

A função da ECA-2 como receptor da proteína S foi originalmente demonstrado para o SARS-CoV e depois também para SARS-CoV-2 (HOFFMANN et al., 2020).

A ECA-2 é um componente do sistema renina-angiotensina (SRA). É uma enzima que cliva a angiotensina II (ANG II) em ANG (1–7). Está principalmente ligada às membranas celulares e seu domínio extracelular faz a ligação com a proteína *spike* (S) dos coronavírus 1 e 2 (ALIPOOR; MIRSAEIDI, 2022).

De acordo com os dados da literatura, os níveis de ECA-2 são mais elevados no intestino delgado, testículos, rins, coração, tireóide e tecido adiposo; está presente moderadamente nos pulmões, cólon, fígado, bexiga e glândulas suprarrenais e é mais baixa no sangue, baço, medula óssea, cérebro, vasos sanguíneos e músculos (HIKMET et al., 2020).

Existe também na forma solúvel livre (sACE2) ou na forma ligada nas membranas celulares (mACE2) dos epitélios intestinais, renais, testiculares, da vesícula biliar, pulmonares e cardiovasculares (HIKMET et al., 2020). Tanto as

proteínas ECA-2 solúveis quanto as ligadas à membrana são críticas para a regulação da pressão arterial. (NAIDU *et al.*, 2024).

Segundo Avdonin e colaboradores (2023), embora a infecção por SARS-CoV-2 se manifeste principalmente como lesões do sistema respiratório, o sequenciamento de RNAm de células individuais mostrou baixa expressão de ECA-2 nos tecidos pulmonares e brônquicos, porém, altos níveis de expressão nas células dos rins e do sistema digestivo. Isto é um indicativo de que, além da ECA-2, existem outros receptores para o SARS-CoV-2 através dos quais ocorre a infecção. Esta hipótese também é apoiada por dados sobre a presença de anticorpos neutralizantes que se ligam ao SARS-CoV-2 em locais diferentes do domínio RBD em sobreviventes de COVID-19.

Dados indicam que a coexpressão de ECA-2 e TMPRSS2 na placenta existe, porém diminui durante o andamento da gestação, sugerindo que é improvável que o SARS-CoV-2 infecte a placenta através dos mediadores canônicos de entrada celular (CONSTANTINO *et al.*, 2021; GOSTOMCZYK *et al.*, 2024; PIQUE-REGI *et al.*, 2020).

#### 2.4.2 Furina e TMPRSS2

De acordo com Walls *et al.*, (2020), para que o RNA do SARS-CoV-2 possa entrar no citoplasma da célula é necessário um processo de ativação da proteína S chamado “*priming*”, o qual ocorre por clivagem proteolítica que resulta na separação das subunidades S1 e S2 da proteína S. A subunidade S1 possui a função de ligação à ECA-2 enquanto a subunidade S2 é responsável pela fusão com a membrana celular da célula que será infectada. Os dados disponíveis sugerem que o processo de “*priming*” aconteça num primeiro passo com a pré-proteína convertase furina clivando a proteína S no sítio S1/S2 durante a biossíntese viral.

A furina é expressa de forma universal nas células do organismo humano e a presença de um sítio para clivagem proteolítica pela furina é considerada um importante fator de virulência de cepas de vírus altamente patogênicos, como HIV, vírus sincicial respiratório e vírus do sarampo. O SARS-CoV-2 possui este sítio, o qual está ausente no SARS-CoV. Num segundo passo, a proteína S é clivada pela protease TMPRSS2 no sítio S2' localizado no terminal N da subunidade S2. Como resultado desta clivagem, o peptídeo de fusão (PF) da subunidade S2 é desnudado.

O PF se liga à membrana da célula infectada, a subunidade S2 se contrai puxando a partícula viral para a superfície da célula e a membrana plasmática da célula se funde com a membrana do vírus (COUTARD *et al.*, 2020).

A furina é uma endoprotease transmembrana que cliva uma variedade de pró-proteínas antes da secreção (THOMAS, 2002). Ela é encontrada na rede trans-Golgi e também circula entre a superfície celular e os endossomos (SHAPIRO *et al.*, 1997).

A serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2) é caracterizada como sendo regulada por andrógenos na próstata (CHEN *et al.*, 2010) Ela também tem sido associada a vários processos como: digestão, remodelação de tecidos, coagulação sanguínea, fertilidade, inflamação, invasão de células tumorais, apoptose e dor (BARTHE *et al.*, 2023; RANGU *et al.*, 2022).

#### 2.4.3 Neuropilina – 1

A NRP-1 é um receptor alternativo que facilita a entrada do SARS-CoV-2 no SNC através das células do epitélio olfativo na cavidade nasal (CANTUTI-CASTELVETRI *et al.*, 2020; DALY *et al.*, 2020).

Também foi demonstrado por Kong e colaboradores (2022) que a NRP-1 serve como o principal receptor para mediar a infecção por SARS-CoV-2 em astrócitos no tecido cerebral, já que estas células não expressam ECA-2 (KONG *et al.*, 2022).

As neuropilinas foram inicialmente descobertas no tecido nervoso, atuando na orientação neuronal, e sua função crucial na formação dos sistemas nervoso e vascular foi confirmada (HE; TESSIER-LAVIGNE, 1997; KOLODKIN *et al.*, 1997). Existem dois homólogos identificados, NRP-1 e NRP-2, os quais são proteínas transmembrana com peso de 130 kDa (CHEN *et al.*, 1997).

A NRP-1 é uma proteína altamente conservada em espécies de vertebrados (SALEKI; ALIJANIZADEH; AZADMEHR, 2023). Está envolvida na migração e invasão celular, angiogênese, tumorigênese, orientação axonal, regulação da resposta imune e entrada de vários vírus como SARS-CoV-2, vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) e vírus Epstein-Barr (EBV) na célula hospedeira (NAIDOO *et al.*, 2022). Serve também como correceptor para ligantes angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e para outros como o fator

de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento hepático (HGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (ELPEK, 2015).

A NRP-1 é uma proteína transmembrana, consistindo de um grande domínio extracelular, um domínio transmembrana muito curto e uma curta cauda intracelular citoplasmática conforme Figura 5. (PELLET-MANY *et al.*, 2008)

O domínio extracelular é ainda dividido em três subdomínios:

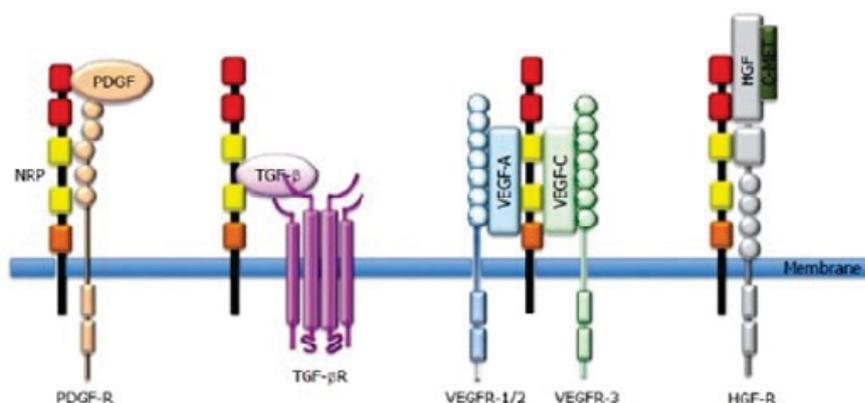
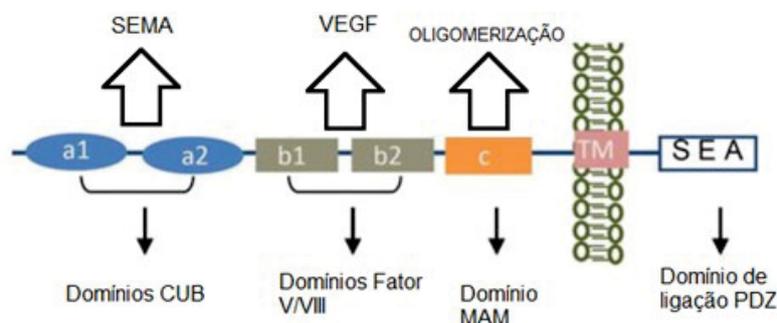
- a. os subdomínios a1-a2, que são homólogos aos componentes do complemento C1r e C1s (CUBs);
- b. o subdomínio B, possuindo duas repetições de domínio b (b1 e b2) que são homólogas aos fatores de coagulação V e VIII;
- c. o subdomínio C, que contém um domínio MAM (meprina, A5/NRP, proteína tirosina fosfatase  $\mu$ ) que provavelmente está envolvido na oligomerização de NRP junto com o domínio transmembrana.

O domínio citoplasmático intracelular interage e se liga a várias proteínas e também proteínas contendo o motivo PDZ como a sinectina (GU *et al.*, 2002).

A NRP-1 não tem atividade catalítica, portanto, para traduzir sinais nas células, ela deve se associar a vários ligantes e correceptores de sinalização conforme Figura 5 (BONDEVA; WOLF, 2015; PELLET-MANY *et al.*, 2008).

Dados relatados na literatura indicam que a NRP-1 é altamente expressa no tecido reprodutivo feminino (ARAD *et al.*, 2017), além de ser de crucial importância para a formação da decídua, a manutenção da tolerância imunológica materna e a angiogênese placentária (NAIDOO *et al.*, 2023).

FIGURA 5 – ESTRUTURA, RECEPTORES E LIGANTES DAS NEUROPILINAS.



FONTE: BONDEVA; WOLF, 2015; ELPEK, 2015 com modificações

LEGENDA: VEGF - fator de crescimento endotelial vascular, TGF- $\beta$  - fator de crescimento transformador beta, HGF - fator de crescimento hepático, PDGF- fator de crescimento derivado de plaquetas : VEGF-R – receptor do fator de crescimento endotelial vascular, TGF- $\beta$ R – receptor do fator de crescimento transformador beta, HGF - R – receptor do fator de crescimento hepático, PDGF – R – receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas

#### 2.4.4 ADAM-17

ADAM-17 é uma metaloprotease responsável pela liberação de domínios extracelulares de proteínas transmembrana gerando proteínas sinalizadoras solúveis que desempenham um papel na sinalização autócrina e parácrina. Os substratos para ADAM-17 incluem: proteínas de adesão, mucinas transmembrana, citocinas ligadas à membrana, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e receptores de citocinas

(receptor de IL-6, receptor de TNF) (ZUNKE; ROSE-JOHN, 2017). Ela também cliva o ectodomínio de ECA-2, tornando-a solúvel (PALAU et al., 2019).

Jocher e colaboradores (2022) identificaram a metaloprotease ADAM-17 como um facilitador da entrada de SARS-CoV-2 nas células e a metaloprotease ADAM-10 como um fator necessário para a formação de sincícios nas células pulmonares, uma marca registrada da patologia da COVID-19. Estes demonstraram que a ADAM-10 e ADAM-17, as quais são amplamente expressas no pulmão humano, clivam a proteína *spike* (S) do SARS-CoV-2 *in vitro*, indicando que ADAM-10 e ADAM-17 contribuem para a ativação (*priming*) da proteína S, uma etapa essencial para a entrada viral e fusão celular. Em seus experimentos, os inibidores direcionados à protease ADAM diminuíram consideravelmente a infecção de células pulmonares pelo SARS-CoV-2 e também reduziram a infecção de células pulmonares humanas de maneira independente da protease TMPRSS2 (JOCHER et al., 2022).

## 2.5 SINTOMAS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas da COVID-19 variam de casos assintomáticos até casos graves e fatais com pneumonia e insuficiência respiratória aguda (HUANG et al., 2020)

Os dados indicam que pacientes infectados com SARS-CoV, MERS-CoV ou SARS-CoV-2 geralmente apresentam sintomas semelhantes aos da gripe, incluindo febre, tosse não produtiva, mialgia e letargia, embora as infecções possam ser assintomáticas (HUANG et al., 2020; WANG et al., 2020). Diarreia, vômito e dor abdominal também foram relatados (BOOTH et al., 2003). Alterações no olfato ou paladar foram relatadas em até 47% das pessoas infectadas com SARS-CoV-2 (BORSETTO et al., 2020). Embora os sintomas dessas três infecções por coronavírus sejam semelhantes, as taxas de letalidade são muito diferentes: cerca de 36% para MERS-CoV, 10% para SARS-CoV e 0,5–4% para SARS-CoV-2 (HOFFMANN et al., 2020; LI et al., 2003; MILLET; JAIMES; WHITTAKER, 2021). Pacientes com COVID-19 podem desenvolver dispneia e taquipneia com agravamento da doença respiratória para pneumonia, a qual pode progredir para síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (WANG et al., 2020).

Foi relatado tropismo viral para múltiplos órgãos, localizando-se principalmente nos pulmões, traquéia, rim, coração ou fígado, predominantemente em células que expressam ECA-2, TMPRSS2 ou ambos (WONG et al., 2021).

A resposta imune à infecção por SARS-CoV-2 provoca uma doença sistêmica com sintomas e gravidade altamente variáveis. Estudos demonstraram que o SARS-CoV-2 pode tanto escapar como modificar a resposta imunitária inata, permitindo inicialmente uma alta replicação viral e, em alguns casos, desencadeando uma síndrome de tempestade de citocinas. Respostas desreguladas de interferon e citocinas e um estado de hipercoagulação podem causar danos teciduais e endoteliais (WILLS; PEREZ; MOORE, 2024).

A lesão vascular é considerada uma base essencial da patogênese da SDRA; trombos de fibrina e plaquetas são frequentemente identificados em pacientes com pneumonia relacionada ao coronavírus. Certas comorbidades como hipertensão, doença cardiovascular, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença renal crônica e diabetes são comumente presentes na doença grave por coronavírus (KIRK; LIANG; LY, 2024).

## 2.6 EPIDEMIOLOGIA

Desde que a pandemia de COVID-19 teve início no final de 2019 e se espalhou pelo mundo, até maio de 2024 cerca de quatro anos e meio depois os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) revelam que no período de 26 de agosto até 22 de setembro de 2024 cerca de 294.800 casos foram relatados em todo o mundo com cerca de 5.157 mortes (WHO, 2024).

Embora a emergência sanitária já tenha terminado, isso não significa que a COVID-19 tenha finalizado como ameaça à saúde global. A partir do verão de 2023, países em todo o mundo registraram uma nova onda de casos da variante Omicron EG.5 e uma nova descendente geneticamente distinta de Omicron, a BA.2.86 foi detectada em vários países. Muito provavelmente surgirão mais variantes e o atendimento aos pacientes com COVID-19 continuará a evoluir junto com o vírus (ŞİMŞEK-YAVUZ, 2023; WILLS; PEREZ; MOORE, 2024).

Este vírus ainda não apresenta características sazonais como o influenza, por exemplo. A COVID-19 ainda não possui uma frequência previsível, ainda é pelo menos duas vezes mais mortal que a gripe e ainda não atingiu o nível endêmico

(CALLAWAY, 2023; XIE; CHOI; AL-ALY, 2023). Embora estejam atualmente disponíveis vacinas aprovadas contra o SARS-CoV-2, as variantes emergentes demonstraram características de escape imunitário que são suficientes para causar preocupação (KUMAR; VERMA; MYSOREKAR, 2023) .

A idade continua sendo o fator de risco mais importante para doença grave. Quando comparado com pacientes com idade entre 18 e 29 anos, o risco de morte por COVID é 25 vezes maior em pacientes com mais de 50 anos e aumenta substancialmente após os 65 anos. As comorbidades médicas de associação mais forte com doença grave são doenças cardiovasculares, doença cerebrovascular e a gravidez, para a qual o risco de doença grave é 3,6 vezes maior do que em não grávidas (WILLS; PEREZ; MOORE, 2024).

## 2.7 DIAGNÓSTICO

A abordagem para o diagnóstico de COVID-19 evoluiu com o tempo e com a disponibilidade dos testes para detecção do SARS-CoV-2. Antes dos testes moleculares, o diagnóstico de COVID-19 era feito com base na clínica. As características clássicas da radiografia de tórax incluem aparência de vidro fosco e pequenas consolidações irregulares. Na tomografia computadorizada (TC) de tórax a COVID-19 produz uma mistura de opacidades em vidro fosco e consolidação, muitas vezes localizadas periféricamente (CAROSELLI et al., 2022).

Os testes de diagnóstico para detecção do SARS-CoV-2 estão agora amplamente disponíveis. Apesar de as variantes do SARS-CoV-2 que circularam no outono de 2023 tenham acumulado várias mutações na proteína S, não presentes na primeira variante, os testes de diagnóstico continuam a ter um bom desempenho (WILLS; PEREZ; MOORE, 2024).

Para os casos de COVID-19 aguda, o teste de SARS-CoV-2 é realizado com uma amostra nasofaríngea, usando um teste de amplificação de ácido nucleico (NAAT) ou um teste de antígeno. Os testes baseados em NAAT são altamente sensíveis e específicos (>95%) no diagnóstico de infecções por SARS-CoV-2. Os mais utilizados são os testes de reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR), os quais são considerados padrão ouro para o diagnóstico de COVID-19. Um resultado positivo do NAAT confirma o diagnóstico e o resultado negativo geralmente o exclui, portanto, repetir o teste NAAT é

recomendado somente após 24-48 horas e apenas em casos de alta suspeita (ŞİMŞEK-YAVUZ, 2023).

Painéis de amplificação de ácidos nucleicos que testam simultaneamente vários vírus respiratórios (mais comumente SARS-CoV-2, influenza A/B e RSV) estão cada vez mais disponíveis e acessíveis e em breve se tornarão o padrão para diagnóstico no pronto-socorro (WILLS; PEREZ; MOORE, 2024).

## 2.8 SARS-CoV-2 E GESTAÇÃO

As adaptações fisiológicas e anatômicas do organismo à gravidez podem levar ao risco aumentado de sintomas graves em resposta à infecções respiratórias (FENIZIA *et al.*, 2020; SIMBAR; NAZARPOUR; SHEIDAEI, 2023).

Além destas alterações, a adaptação imunológica é essencial para garantir a tolerância materna ao feto, o que torna as gestantes um grupo mais vulnerável (SIMBAR; NAZARPOUR; SHEIDAEI, 2023; WASTNEDGE *et al.*, 2021).

Conforme a pandemia de COVID-19 acontecia, iam aumentando também as preocupações em relação a sua transmissão vertical, como observado nos surtos do vírus Zika (ZIKV) alguns anos antes (KUMAR; VERMA; MYSOREKAR, 2023).

Apesar de os estudos sobre os efeitos da COVID-19 na gravidez estarem aumentando, a maioria deles são relatos de casos ou séries de casos com pequenas amostras populacionais, às vezes com resultados contraditórios e a maioria dos estudos de coorte centraram-se na avaliação dos efeitos gerais da COVID-19 nesta população (SIMBAR; NAZARPOUR; SHEIDAEI, 2023).

Uma revisão sistemática com meta-análise de 2023 mostrou que a prevalência combinada de parto prematuro, mortalidade materna, admissão na UTI e morte neonatal no grupo com COVID-19 foi significativamente maior do que naqueles sem infecção ( $p < 0,01$ ). A perda da gravidez e o número de recém-nascidos positivos para SARS-CoV-2 são maiores em pessoas com média e baixa renda do que em pessoas com renda alta, também mostrou que pode ocorrer transmissão vertical da mãe para o feto, mas os seus efeitos imediatos e a longo prazo no recém-nascido não são claros (SIMBAR; NAZARPOUR; SHEIDAEI, 2023).

## 2.9 COMPONENTES DA INTERFACE-MATERNO FETAL

A placenta é um órgão composto por um misto de tecidos maternos e fetais e que se desenvolve somente durante a gravidez (LEE *et al.*, 2020; WONG; TAN; KHONG, 2023).

Suas principais funções são: fornecer nutrientes para o feto, servir como barreira física e imunológica contra patógenos e a proteção do feto contra a rejeição imunológica materna (WONG; TAN; KHONG, 2023).

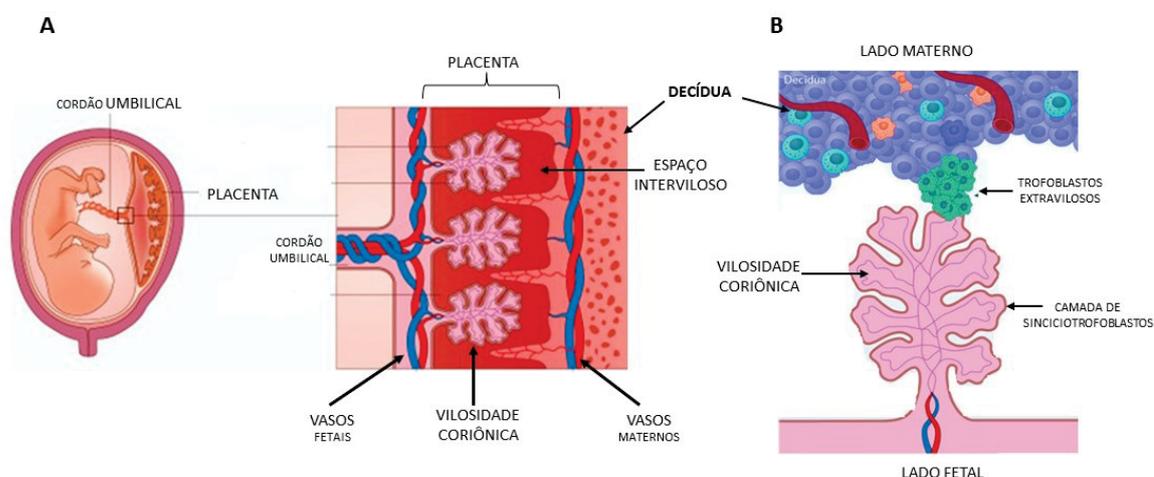
Possui estrutura semelhante a um disco preso à parede uterina (decídua materna) e é conectada ao feto pelo cordão umbilical. É formada por vilosidades coriônicas, as quais são estruturas que fazem o contato entre a estrutura placentária derivada do feto e o sangue materno, estas compreendem as vilosidades flutuantes (banhadas pelo sangue materno) e as vilosidades de ancoragem (que prendem a placenta à decídua) (LEE *et al.*, 2020; MEGLI; COYNE, 2022).

Contém três tipos principais de células: citotrofoblastos, sinciotrofoblastos e trofoblastos extravilosos. Os citotrofoblastos são células mononucleares derivadas das células tronco do trofoblasto que formam a camada mais interna das vilosidades e se diferenciam em sinciotrofoblastos por meio de fusão célula a célula (LEE *et al.*, 2020; MEGLI; COYNE, 2022). Os sinciotrofoblastos formam uma camada de células multinucleadas fundidas entre si, a qual recebe o nome de sincício, e recobrem a superfície externa das vilosidades. Esta camada não possui junções comunicantes intercelulares o que protege o sangue fetal da invasão de microorganismos (WONG; TAN; KHONG, 2023). Os trofoblastos extravilosos possuem as funções de ancorar a placenta à decídua materna e remodelar as artérias espirais maternas para facilitar o suprimento de sangue materno às vilosidades coriônicas ((LEE *et al.*, 2020; MEGLI; COYNE, 2022).

O núcleo das vilosidades contém também outros tipos de células, como: células de Hofbauer (as quais são macrófagos de origem fetal), células endoteliais fetais, fibroblastos e células tronco mesenquimais (WONG; TAN; KHONG, 2023).

Uma visão esquemática da estrutura e composição da interface materno-fetal é mostrada na Figura 6.

FIGURA 6 - ESTRUTURA DA INTERFACE MATERNO - FETAL



FONTE: Adaptado de MEGLI; COYNE, (2022)

Legenda: A – Estrutura da placenta B – Estrutura das vilosidades coriônicas

## 2.10 TRANSMISSÃO VERTICAL

Atualmente as evidências de transmissão intrauterina do SARS-CoV-2 da mãe para o feto ou transmissão intraparto da mãe para o neonato são esparsas e há limitações associadas à sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos utilizados (SHAH *et al.*, 2020).

O diagnóstico de muitas infecções neonatais ou fetais é realizado pela detecção do patógeno em cultura ou por testes de amplificação do ácido nucleico que identificam a presença do DNA ou RNA do patógeno no líquido amniótico coletado antes da ruptura das membranas, em sangue ou fluidos corporais coletados do feto ou neonato e também através da detecção molecular ou demonstração histopatológica do microorganismo em tecidos fetais ou neonatais (SHAH *et al.*, 2020).

A extensão na qual a transmissão vertical do SARS-CoV-2 pode ocorrer e o momento de tal transmissão ainda não estão claros. Embora alguns sistemas para padronizar o diagnóstico dessa condição tenham sido propostos (BLUMBERG *et al.*, 2020; SHAH *et al.*, 2020), somente em 2021 a OMS convocou um grupo de especialistas multidisciplinares para propor um sistema de classificação internacional para o diagnóstico da transmissão vertical do SARS-CoV-2 (WHO, 2021).

## 2.10.1 Classificação da transmissão vertical

### 2.10.1.1 Transmissão intrauterina

Muitos dos patógenos transmitidos *in utero* são aqueles nos quais ocorre infecção sistêmica da gestante permitindo a estes acessar a placenta. Uma vez que estes alcancem a placenta podem atravessar a interface placentária, através da infecção das células placentárias ou ruptura da barreira placentária obtendo assim, acesso aos vasos fetais e causando infecção. Do ponto de vista fisiológico a transmissão intrauterina do SARS-CoV-2 é possível. A viremia para SARS-CoV-2, embora seja pouco frequente, pode ocorrer na doença grave. Além disso, esta infecção está associada com dano vascular, incluindo hipercoagulopatia e causando danos isquêmicos à placenta o que pode levar o vírus a alcançar o feto sem a necessidade de infecção celular da placenta (DE LUCA *et al.*, 2023; WHO, 2021).

### 2.10.1.2 Transmissão intraparto

Ocorre durante o trabalho de parto e requer exposição do neonato ao patógeno em sangue materno, secreção vaginal ou fezes durante o processo do parto (DE LUCA *et al.*, 2023; WHO, 2021).

### 2.10.1.3 Transmissão pós-natal

Pode ocorrer através do aleitamento materno quando o vírus está presente no leite ou através de contato com secreções respiratórias da mãe ou de outros cuidadores (DE LUCA *et al.*, 2023; WHO, 2021).

## 2.10.2 Evidências

Piñana *et al.* (2021) em um relato de caso detectaram o SARS-CoV-2 no citoplasma de células trofoblásticas da placenta e também no líquido amniótico coletado em condições estéreis demonstrando, assim, a replicação viral nas células da placenta e escape da barreira placentária para o líquido amniótico (PIÑANA *et al.*, 2021).

Outros estudos relataram abortos espontâneos e morte neonatal associados com inflamação e infecção da placenta por SARS-CoV-2. Estes estudos sugerem que embora a infecção da placenta não esteja obrigatoriamente relacionada com

transmissão vertical pode causar danos que levam à morbidade perinatal mesmo sem infecção (STONOGA *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2023).

Uma revisão sistemática com meta-análise mostrou que de 1.107 bebês positivos, 32 tiveram transmissão de mãe para filho confirmada sendo 20 intrauterina, 3 intraparto e 9 no período pós-natal (ALLOTEY *et al.*, 2022).

Os dados relatados na literatura parecem demonstrar que, embora com baixa frequência de casos, a transmissão vertical do SARS-CoV-2 é uma realidade. Porém, por se tratar de uma pandemia recente os dados ainda são escassos e são necessários mais estudos para elucidar quais os mecanismos que podem estar envolvidos nesse processo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 APROVAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o número CAAE: 35129820.6.0000.0096 (Anexo I). Foram assinados os formulários do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo II), e seguidas todas as diretrizes, regulamentos e protocolos de ética e segurança dos dados durante a execução deste estudo.

#### 3.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Para compor o grupo COVID-19, foram selecionadas entre junho de 2020 e agosto de 2021 gestantes, maiores de 14 anos, sintomáticas ou assintomáticas, com e sem comorbidades, que apresentaram teste positivo para SARS-CoV-2 no primeiro, segundo ou terceiro trimestre gestacional e que foram internadas no Complexo Hospital de Clínicas – Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) ou no Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG) em Curitiba-Paraná.

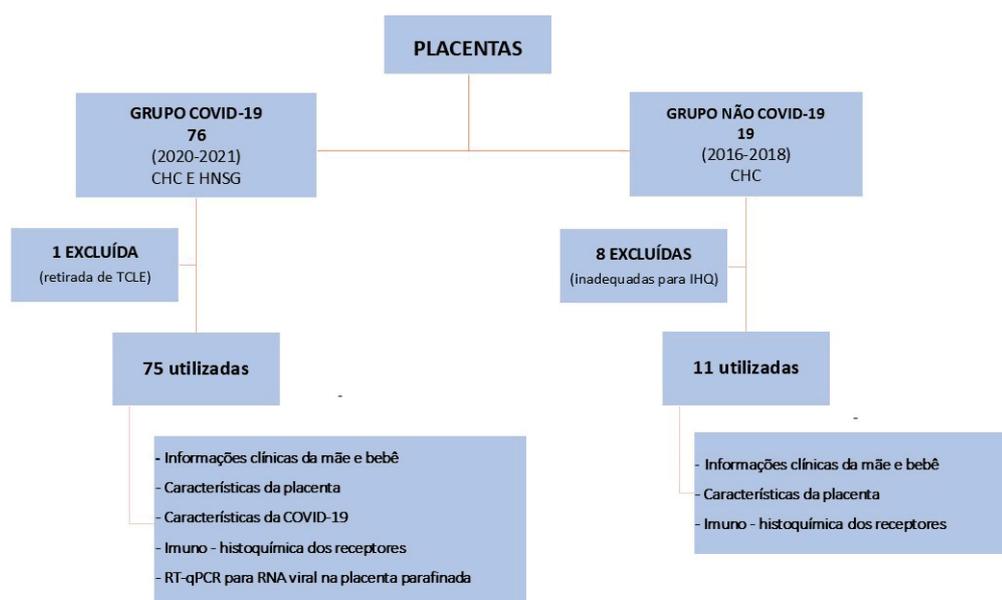
O critério de inclusão envolveu a confirmação do SARS-CoV-2 por RT-qPCR, realizadas com testes moleculares disponíveis no serviço, em amostras respiratórias (swab de nasofaringe), com amostras teciduais adequadas, totalizando 76 gestantes (grupo COVID-19; n = 76). Destas, 1 amostras foi excluída por retirada do TCLE durante o desenvolvimento deste estudo restando, portando, 75 gestantes. Em uma das gestantes, a confirmação foi realizada pela imuno-histoquímica no tecido placentário, além dos sintomas clínicos.

Como caráter de inclusão para o grupo NÃO COVID-19, foram incluídas placentas de gestantes que deram à luz no CHC-UFPR em anos anteriores à pandemia de COVID-19, portanto certamente SARS-CoV-2 negativas. Foram selecionadas 19 placentas, entre os anos de 2016 e 2018 pois somente a partir de 2016 os protocolos para processamento de placentas eram exatamente iguais aos do grupo COVID-19, o que mitigou a ocorrência de viés, e por esta razão o número de amostras ficou reduzido em relação ao grupo COVID-19. Essas 19 amostras foram testadas para as doenças congênitas do grupo TORCHZ (toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, herpes simples tipos 1 e 2 e Zica vírus) por meio da técnica de imuno-histoquímica, sendo todas negativas. Foram também observados o

trimestre gestacional e idade materna. A idade gestacional no parto é uma variável de correspondência universalmente usada, uma vez que há correlação entre o desenvolvimento da placenta e o avanço da gestação. Além disso, a expressão de receptores para SARS-CoV-2 na placenta pode variar ao longo da gestação, o que poderia interferir na análise. A idade materna também foi incorporada como variável correspondente, devido ao seu possível papel como fator de confusão ao analisar anormalidades placentárias.

Das 19 placentas (grupo NÃO COVID-19; n=19), 8 foram excluídas por se mostrarem inadequadas para a técnica de imuno-histoquímica durante o processamento dos exames, restando 11 amostras (Figura 7).

FIGURA 7 – SELEÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE PLACENTA



FONTE: O autor (2024).

### 3.3 COLETA DA AMOSTRA

As placentas foram obtidas após o processo de dequitação natural durante parto. Os critérios de submissão para exame anatomopatológico da placenta incluíram condições maternas ou fetais anteriormente diagnosticadas durante o atendimento pré-natal, anormalidades graves observadas durante o parto, ou com múltiplas gestações conforme implementadas rotineiramente em ambas as instituições. Portanto, o resultado positivo do teste RT-qPCR para SARS-CoV-2 em

*swab* nasofaríngeo foi considerado uma condição materna anormal e critério para avaliação histopatológica da placenta.

### 3.4 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

Todas as placentas, inclusive as do grupo NÃO COVID-19 foram examinadas de acordo com um protocolo padronizado que consistia em fixação, após a coleta no parto, em formalina tamponada a 10% por 72 horas, exame macroscópico com medição de dimensões da placenta e comprimento, avaliação do peso do disco da placenta após o corte das membranas fetais e cordão umbilical, seguido de secções seriadas em intervalos de 1,5 cm e exame da superfície de corte. Alterações macroscópicas foram registradas e amostradas. Após isso foram confeccionados blocos de tecido parafinado que foram armazenados para análises microscópicas e de biologia molecular.

### 3.5 INFORMAÇÃO CLÍNICA

Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos dos prontuários médicos durante o período de internamento. Essas informações compreendiam: idade materna, presença ou não de comorbidades, hábitos de vida, paridade, idade gestacional no momento do parto, tipo de parto, peso do recém-nascido ao nascer e pontuação de APGAR do mesmo, motivo do internamento; intensidade da doença materna; trimestre gestacional da infecção por COVID-19; duração do internamento; intervalo entre internamento e o parto, óbito intrauterino, óbito neonatal, recém-nascido com sintomas/teste positivo para SARS-CoV-2 e presença de alterações anatomopatológicas placentárias.

Foram coletadas também informações sobre a presença ou ausência de sintomas tipicamente atribuídos a COVID-19 (temperatura acima de 38°C, dispneia, tosse, mialgia, náuseas e vômito, diarreia, dor de cabeça, anosmia, disgeusia) sendo usados para medir a gravidade da doença materna como: (a) assintomáticos/sintomas leves; (b) intensidade moderada com necessidade de internação em enfermaria e; (c) intensidade grave com disfunção orgânica crítica e necessidade de internação em UTI).

### 3.6 TESTE PARA SARS-COV-2 (RT-qPCR E SOROLOGIA)

O teste materno para confirmação do diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 foi obtido através da transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), em etapa única (*OneStep*) em amostras de *swab* nasofaríngeo (grupo COVID-19; n = 75); sendo que 74 casos foram positivos e apenas um caso foi confirmado com sorologia IgM/IgG positivas, o qual teve a decídua positiva para SARS-CoV-2 na imuno-histoquímica.

Amostras de tecido parafinado de placentas do grupo COVID-19 (n = 75) foram testadas para verificar a presença de RNA do SARS-CoV-2 (tanto em vilosidades fetais como em decídua materna).

### 3.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Todas as amostras representativas de todas as placentas deste estudo que foram coletadas para avaliação microscópica foram submetidas a processamento de rotina com cortes histológicos do bloco de tecido parafinado de 5 µm e coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E). A análise morfológica qualitativa foi realizada em todas as placentas do grupo COVID-19 e do grupo controle usando a Declaração de Consenso do Amsterdam Placental Workshop Group (protocolo de Amsterdam). Cortes histológicos contendo pelo menos uma amostra do cordão umbilical, rolo de membrana e placa coriônica de cada caso de ambos os grupos foram selecionados aleatoriamente e renomeados por um membro da equipe de pesquisa de forma que os examinadores não soubessem quais eram do grupo COVID-19 ou grupo NÃO COVID-19 (etapa de cegamento). Dois patologistas perinatais avaliaram sistematicamente as lâminas. As alterações foram calculadas simplesmente como "presente" (sim) ou "ausente" (não). A extensão e a intensidade de 185 alterações específicas foram graduadas de acordo com as recomendações do protocolo de Amsterdam. As alterações avaliadas incluíram características de má perfusão vascular materna (infarto viloso, hipoplasia vilosa, maturação vilosa acelerada / aumento dos nós sinciciais, aterose decidual aguda, necrose fibrinoide vascular decidual com ou sem células espumosas, hipertrofia mural vascular decidual, perivasculite crônica decidual, ausência de remodelação da artéria espiral, trombose arterial decidual, persistência de trofoblasto endovascular intramural, características da má perfusão e vascularização fetal (trombose vascular fetal, deposição de fibrina

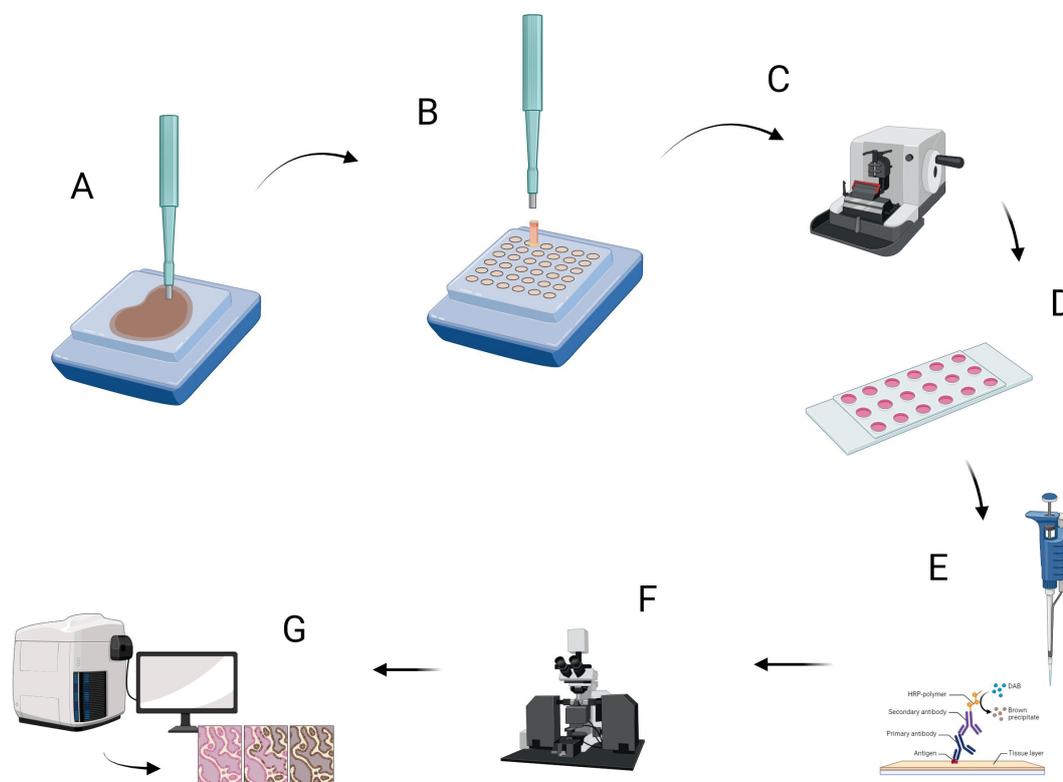
intramural vascular fetal, vilosidades avasculares, obliteração de vasos da haste/ esclerose fibromuscular, cariorrexis vilóide estromal-vascular, ectasia vascular), maturação vilosa retardada, características de resposta inflamatória materna (corionite, corioamnionite), características de resposta inflamatória fetal (vasculite umbilical, funisite), características de inflamação crônica (decídua crônica, vilosite, intervilosite), trombos intervilosos, focos de microcalcificação, corangiome e mecônio de membrana e coloração de hemossiderina.

### 3.8 CONFECÇÃO DOS BLOCOS *TISSUE MICROARRAY* (TMAs)

Para realizar todas as colorações de uma só vez e sob as mesmas condições, foi realizada a construção de blocos teciduais parafinados multiamostrais (TMA, do inglês *Tissue Microarray*) com a retirada de fragmentos cilíndricos medindo 8 mm de diâmetro contendo amostras de placentas provenientes dos blocos originais (blocos-doadores), sendo estas organizadas em novos blocos de parafina multiamostrais (blocos receptores) conforme Figura 8. As áreas amostradas para compor os TMAs foram selecionadas previamente utilizando-se os critérios morfológicos descritos no item 3.8.

Para este estudo em específico, cada bloco de TMA era composto por 4 casos, sendo que cada caso apresentava 2 amostras de 8 mm, denominadas A e B, sendo amostra A colocada no lado esquerdo da lâmina correspondendo a amostra da decídua materna (face materna) e a amostra B fixada do lado direito da lâmina correspondendo a amostra de vilosidade corial (face fetal) respectivamente. Todas as 75 placentas do grupo COVID-19 foram incluídas em 19 TMAs. Todas as 11 placentas do grupo NÃO COVID-19 também foram incluídas em TMAs.

FIGURA 8 - CONFEÇÃO DO TMA E COLORAÇÃO DA LÂMINA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA COM ANÁLISE DAS IMAGENS



FONTE: O autor (2024).

Criado com biorender.com

A – retirada do cilindro de tecido parafinado do bloco doador; B – confecção do bloco TMA com cilindros de vários blocos de amostra; C – corte do bloco TMA em fitas de 5 µm usando o micrótom; D – confecção da lâmina usando o corte histológico; E- coloração pela técnica de IHQ; F – avaliação microscópica; G – geração das imagens pelo *scanner* e posterior quantificação pelo *software*.

### 3.9 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A técnica de imuno-histoquímica foi utilizada com a finalidade de identificar a expressão tecidual dos anticópsicos contra os receptores e cofatores ECA-2, TMPRSS-2, furina, NRP-1 e ADAM-17 a fim de facilitar a sua quantificação. Foram utilizados os anticópsicos constantes no Quadro 1.

QUADRO 1 - DESCRIÇÃO DOS ANTICORPOS PRIMÁRIOS UTILIZADOS NA IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS RECEPTORES DE SARS-CoV-2

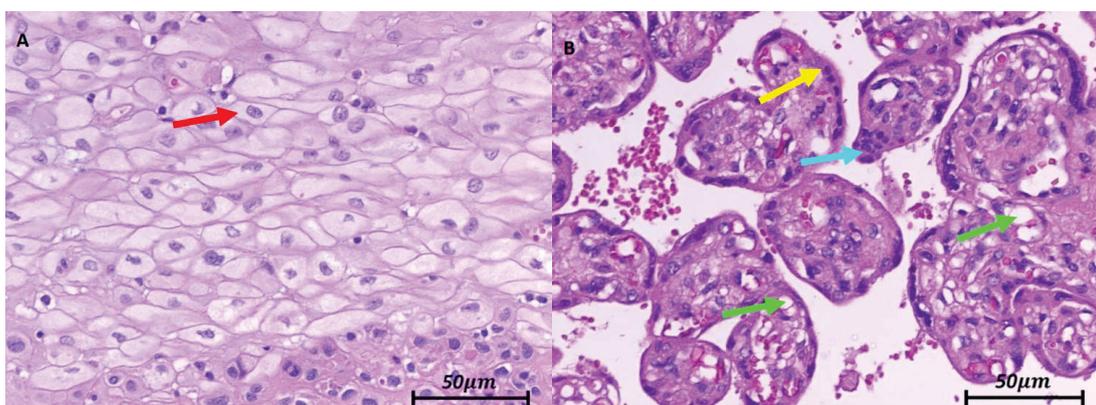
ANTICORPO	MARCA	CLONE/CÓD.	DILUIÇÃO	MONO/POLICLONAL	HOST
Anti-ECA-2	Elabscience	EAB-12224	1:100	Policlonal	Mouse
Anti-Furina	Elabscience	EAB-61709	1:200	Policlonal	Rabbit
Anti-TMPRSS2	BioSB	BSB-136	1:100	Monoclonal	Mouse
Anti-NRP-1	Clonality	AB-25998	1:100	Policlonal	Rabbit
Anti-ADAM-17	Clonality	AB-39163	1:100	Policlonal	Rabbit

FONTE: O autor (2024)

Os ensaios de imuno-histoquímica foram realizados através de um protocolo de incubação dos anticorpos primários em câmara úmida, com temperatura entre 2 e 8° C, *overnight*. O reagente conjugado secundário (Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System, Spring Bioscience, Pleasanton, CA) foi aplicado no material por 25 minutos em temperatura ambiente.

A revelação da técnica se deu com a adição do complexo 2, 3, Diaminobenzidina + substrato peróxido de hidrogênio, por tempos suficientes para o desenvolvimento da cor castanha, seguida de contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Figura 9). Os resultados foram confirmados pela reatividade de um controle positivo e negativo, onde uma amostra tecidual com imunoexpressão conhecida positiva e outra negativa para os anticorpos foram alocadas juntamente com as amostras testadas.

FIGURA 9 - IMAGENS CORADAS COM HEMATOXILINA-EOSINA EM TECIDO DE PLACENTA



FONTE: O autor (2024).

A – Amostra de decídua materna; B – Amostra de vilosidade; Seta vermelha - células da decídua materna; Seta amarela - citotrofoblasto; Seta azul - células do sinciotrofoblasto; Setas verdes vasos sanguíneos. Coloração de Hematoxilina e Eosina (objetiva 40x).

### 3.10 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

As lâminas imunomarcadas foram escaneadas com o auxílio do escâner de lâminas Axio Scan Z1® (Zeiss, Jena, Alemanha), o qual gera um mosaico de 500 imagens em CGA (magnificação objetiva 40x) com *software* ZEN Blue Edition® (Zeiss, Jena, Alemanha). Das imagens geradas foram excluídas as desfocadas, em branco e com artefatos, e das restantes foram selecionadas de modo aleatório 50 imagens sem a interferência de um observador. De cada imagem CGA, ocorreu a mensuração das áreas de imunoposição pelo *software* Image Pro-Plus® versão 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD). A mensuração das áreas de imunoposição foram obtidas por meio do emprego de um método de segmentação semiautomatizada por cores, na qual a área de imunoposição tecidual para cada biomarcador foi artificialmente delimitada e quantificada (Figura 10). Posteriormente, seu valor, expresso em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ) foi dividido pelo valor de sua respectiva área de tecido total e finalmente transformado em um valor percentual, sendo expresso na seguinte fórmula matemática: valor percentual =  $([\text{Área imunopositiva}] / [\text{Área tecido total}]) \times 100$ . Por fim foram calculados os valores de média aritmética das imagens CGA de cada paciente, de maneira que seus resultados foram organizados em planilhas de Excel e posteriormente submetidos à análise estatística.

FIGURA 10 - MENSURAÇÃO DAS ÁREAS DE IMUNOEXPRESSIONÃO PELO SOFTWARE IMAGE PRO-PLUS®



FONTE: O autor (2024).

NOTA: A cor vermelha indicada pela seta revela a área de expressão tecidual positiva.

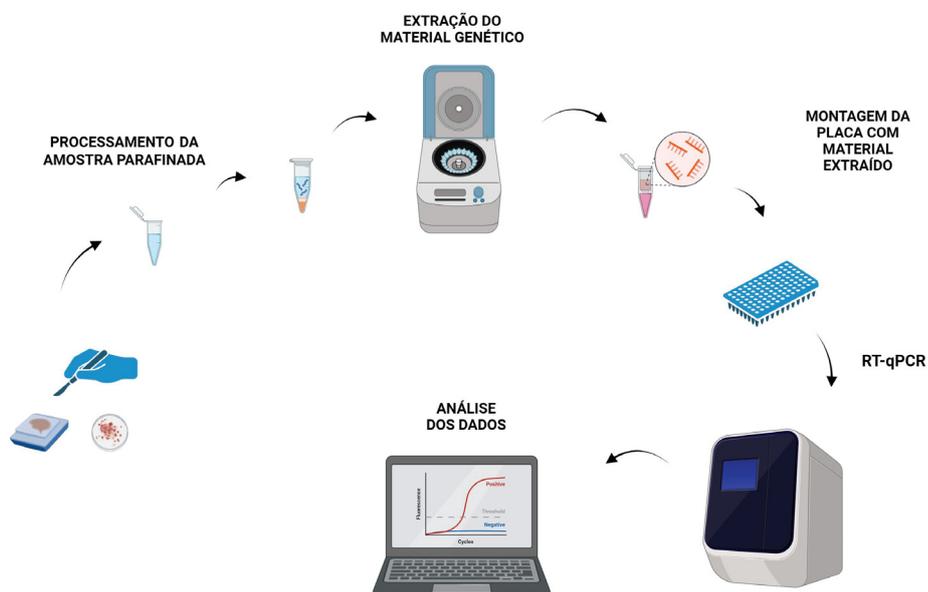
### 3.11 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL E RT-qPCR DAS AMOSTRAS DE PLACENTA PARAFINADA

#### 3.11.1 Extração do RNA viral

Para a realização da RT-qPCR das amostras de placenta parafinada do grupo COVID-19 e do grupo NÃO COVID-19, foram utilizados pequenos fragmentos dos blocos originais coletados assepticamente utilizando-se uma lâmina de bisturi para cada bloco. A região para a coleta do material foi escolhida de acordo com a observação microscópica pelo patologista, o qual marcou a região da lâmina onde observou alterações patológicas. A lâmina, então foi utilizada como guia para escolha da região do bloco a serem coletados os fragmentos de tecido parafinado.

Esses fragmentos foram, então, desparafinizados utilizando 1 mL de xilol e submetidos à extração do RNA viral utilizando o kit comercial RNeasy FFPE kit Qiagen®, de acordo com as orientações do fabricante (Figura 11).

FIGURA 11 - PROCESSAMENTO E EXTRAÇÃO DO TECIDO PARAFINADO COM POSTERIOR RT-qPCR



FONTE: O autor (2024).

Criado com biorender.com

### 3.11.2 Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), em etapa única (*OneStep*)

A RT-qPCR foi realizada com o kit comercial SARS-CoV- Assay Allplex® Seegene Inc. Korea, de acordo com as instruções do fabricante. O kit permite amplificação e detecção simultâneas de ácidos nucleicos dos alvos: gene E, gene RdRP e gene N. Um gene endógeno foi utilizado como Controle Interno (CI) para monitorar todo o processo de extração de ácido nucleico e para verificar qualquer possível inibição da PCR. O limite de detecção verificado para este kit comercial utilizando RNA genômico de TWIST BIOSICENCE® é de 5000 cópias/mL. O limite verificado utilizando o SARS-CoV-2 inativado de BEI Resources® é de 1.000 equivalentes de genoma viral/mL (SEEGENE, 2020). Para a reação e detecção foi utilizado o aparelho termociclador Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems.

### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Médias, desvio padrão, medianas, valores máximos e mínimos, frequências ou percentagens foram usados para descrever os resultados. As variáveis nominais foram expressas como valores reais e frequências e analisadas pelo teste do qui-quadrado e ou pelo teste exato de Fisher. Variáveis quantitativas com a distribuição normal foram verificadas pelo teste de Shapiro-Wilk e comparadas com o teste t. Variáveis com a distribuição não normal foram verificadas pelo teste de Mann-Whitney. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi realizado para comparar as demais variáveis quantitativas entre grupos. Para os testes, a significância estatística foi definida como um valor de  $p \leq 0,05$ . Os dados foram analisados usando o software JMP Pro® 14.0.0 (SAS Institute Cary, NC).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 INFORMAÇÕES CLÍNICAS

A Tabela 1 apresenta informações do grupo COVID-19, sendo que 4 pacientes não constam pois não tinham os dados clínicos completos. De acordo com os dados a cesariana com n = 54 (76,06%) foi o tipo de parto com maior índice, seguido do parto normal n=17 (23,94%). Para as comorbidades, foram escolhidas as mais relevantes para o período gestacional, compreendendo 37 (52,11%) das pacientes com alguma comorbidade e 34 (47,89%) não apresentaram comorbidades. As comorbidades com maior número de casos foram a diabetes e obesidade n=10 (14,08%) cada, e a menor foi a hipertensão n=1 (1,41%). O principal motivo de internamento foi em decorrência da COVID-19 n=39 (54,93%), seguido de realização do parto n=32 (45,07%).

A intensidade da doença foi classificada como leve ou assintomática n=38 (53,52%), moderada n=12 (16,90%) e grave n=21 (29,58%).

O trimestre da infecção apresentou maior número de casos no terceiro trimestre com 60 (84,51%), seguido pelo segundo trimestre n=7 (9,86%) e o primeiro trimestre n=4 (5,63%).

A idade da gestante apresentou uma média de 30,89 anos com mínima de 14 anos e máxima de 42 anos. A idade gestacional em semanas apresentou média de 35,33 semanas (variando de de 27 a 41 semanas). O tempo de internamento apresentou média de 7,91 dias (variando de um a 48 dias) e, por fim, o intervalo do internamento até a data do parto apresentou média de 2,17 dias (variando de 0 a 30 dias) até o parto.

TABELA 1- INFORMAÇÕES CLÍNICAS DAS GESTANTES COM COVID-19

Tipo de parto	GRUPO COVID-19	
	n (71)*	%
Cesárea	54	76,06%
Normal	17	23,94%
<b>Comorbidades</b>		
Sim	37	52,11%
Não	34	47,89%
<b>DHEG</b>		
Sim	8	11,27%
Não	63	88,73%

continua

		continuação	
		<b>GRUPO COVID-19</b>	
<b>Tipo de parto</b>	<b>n (71)*</b>	<b>%</b>	
<b>Diabetes</b>			
Sim	10	14,08%	
Não	61	85,92%	
<b>Hipertensão</b>			
Sim	1	1,41%	
Não	70	98,59%	
<b>Obesidade</b>			
Sim	10	14,08%	
Não	61	85,92%	
<b>HIV positivo</b>			
Sim	2	2,82%	
Não	69	97,18%	
<b>Sífilis positivo</b>			
Sim	2	2,82%	
Não	69	97,18%	
<b>Tabagista</b>			
Sim	4	5,63%	
Não	67	94,37%	
<b>Motivo do internamento</b>			
Pela COVID-19	39	54,93%	
Para parto	32	45,07%	
<b>Intensidade da doença</b>			
Leve ou assintomático	38	53,52%	
Moderado	12	16,90%	
Grave	21	29,58%	
<b>Trimestre da infecção</b>			
Primeiro	4	5,63%	
Segundo	7	9,86%	
Terceiro	60	84,51%	
		<b>Média (Min-Max)</b>	
<b>Idade da gestante (anos)</b>	30,89 (14-42)		
<b>Idade gestacional (semanas)</b>	35,33 (24-41)		
<b>Duração do internamento (dias)</b>	7,91 (1-48)		
<b>Intervalo internamento-parto (dias)</b>	2,17 (0-30)		

FONTE: O autor (2024).

\* NOTA: Há 4 gestantes que não possuíam os dados clínicos completos, por isso não constam desta tabela.

A Tabela 2 apresenta o grupo NÃO COVID-19 (n = 11). Quanto ao tipo de parto do grupo NÃO COVID-19, parto normal teve o maior índice com 6 casos (54,55%), seguido de cesariana com 5 (45,45%). A presença de comorbidades para este grupo, correspondeu a 4 (36,36%) das pacientes com alguma comorbidade e 7 (63,64%) não apresentavam comorbidades. As comorbidades relevantes presentes neste grupo foram diabetes e hipertensão com 2 (18,18%) igualmente. Em relação aos hábitos de vida, 1 (9,09%) das pacientes eram tabagistas. A idade da gestante apresentou uma média de 28,27 anos com mínima de 18 anos e máxima

de 42 anos. A idade gestacional em semanas apresentou média de 33,7 semanas com mínimo de 23 semanas e máximo de 39 semanas.

TABELA 2 - INFORMAÇÕES CLÍNICAS DAS GESTANTES DO GRUPO NÃO COVID-19

<b>GESTANTES DO GRUPO NÃO COVID-19</b>		
<b>TIPO DE PARTO</b>	<b>N (11)</b>	<b>%</b>
Cesárea	5	45,45%
Normal	6	54,55%
<b>Comorbidades</b>		
Sim	4	36,36%
Não	7	63,64%
<b>DHEG</b>		
Sim	0	0%
Não	11	100%
<b>Diabetes</b>		
Sim	2	18,18%
Não	9	81,82%
<b>Hipertensão</b>		
Sim	2	18,18%
Não	9	81,82%
<b>Obesidade</b>		
Sim	0	0%
Não	11	100%
<b>HIV positivo</b>		
Sim	0	0%
Não	11	100%
<b>Sífilis positivo</b>		
Sim	0	0%
Não	11	100%
<b>Tabagista</b>		
Sim	1	9,09%
Não	10	90,91%
<b>Média (Min-Max)</b>		
<b>Idade da gestante (anos)</b>	28,27 (18-42)	
<b>Idade gestacional (semanas)</b>	33,70 (23-39)	

FONTE: O autor (2024).

A Tabela 3 demonstra os achados relevantes dos recém-nascidos (RN) do grupo COVID-19 (n = 71), no qual houve três gestações gemelares totalizando 74 recém-nascidos. Em relação ao sexo, houve predominância do sexo feminino com 40 (53,52%) dos casos, o sexo masculino representa 33 (45,08%) da amostra. Um caso não houve registro do sexo por ter apresentado óbito intrauterino. Houve três casos de óbito intrauterino, dois casos de óbito neonatal, e quatro casos de RN com sintomas de COVID-19 representados por (4,23%), (2,82%), (5,63%) respectivamente. Os pesos dos RNs tiveram variações de mínimo de 610g – 3.855g.

TABELA 3 - INFORMAÇÕES CLÍNICAS DOS RECÉM-NASCIDOS (RN) DO GRUPO COVID-19

<b>RN COVID-19</b>		
<b>Gênero</b>	<b>N (74) *</b>	<b>%</b>
Feminino	40	54,06%
Masculino	33	44,59%
Sem registro **	1	1,35%
<b>Óbito intraútero</b>		
Sim	3	4,06%
Não	71	95,94%
<b>Óbito neonatal</b>		
Sim	2	2,70%
Não	72	97,30%
<b>RN com sintomas de COVID-19</b>		
Sim	4	5,40%
Não	69	93,25%
Sem registro ***	1	1,35%
<b>RN RT-PCR positivo</b>		
Sim	9	12,16%
Não	64	86,49%
Sem registro ***	1	1,35%
<b>MÉDIA (Min-Max)</b>		
<b>Peso do RN</b>	2.773,38 (610-3.855)	
<b>MÉDIA ±DP</b>		
<b>Apgar RN no 1º minuto</b>	6,11 ± 3,00	
<b>Apgar RN no 5º minuto</b>	4,5 ± 5,19	

FONTE: O autor (2024).

\* Houve 3 gestações gemelares, por isso o número de RN é maior que o de gestantes; \*\*Sem registro do gênero pois foi um óbito intraútero; \*\*\* Óbito intraútero

NOTA: Há 4 gestantes que não possuíam os dados clínicos completos, por isso não constam desta tabela.

A Tabela 4 demonstra os achados relevantes dos RN do grupo NÃO COVID-19 (n = 11). Em relação ao sexo, houve predominância do sexo masculino com seis (54,54%) dos casos e o sexo feminino representa cinco (45,45%). Não houve casos de óbito. Os pesos dos RNs tiveram variações de mínimo de 1.180g – 3.810g.

TABELA 4 - INFORMAÇÕES CLÍNICAS DOS RECÉM-NASCIDOS (RN) DO GRUPO NÃO COVID-19

<b>RN GRUPO NÃO COVID-19</b>		
<b>Gênero</b>	<b>N (11)</b>	<b>%</b>
Feminino	5	45,45%
Masculino	6	54,54%
<b>Óbito intraútero</b>		
Sim	0	0%
Não	11	100%
<b>Óbito neonatal</b>		
Sim	0	0%
Não	11	100%
<b>MÉDIA (Min-Max)</b>		
<b>Peso do RN</b>	2.656 (1.180-3.810)	
<b>MÉDIA ±DP</b>		
<b>Apgar RN no 1º minuto</b>	6,54 ± 2,31	
<b>Apgar RN no 5º minuto</b>	8,72 ± 0,86	

FONTE: O autor (2024).

A Tabela 5 representa os dados de alterações anatomopatológicas das placentas coletadas do grupo COVID-19.

TABELA 5 - INFORMAÇÕES DAS ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS DAS PLACENTAS DO GRUPO COVID-19

<b>PLACENTAS - GRUPO COVID-19</b>		
	<b>n (71)</b>	<b>%</b>
<b>Alterações anatomopatológicas</b>		
Sim	54	76,06%
Não	17	23,94%
	<b>MÉDIA (Min-Max)</b>	
<b>Peso da placenta</b>	435,35 (135-710)	

FONTE: O autor (2024).

\* NOTA: Há 4 pacientes que não possuíam os dados clínicos completos, por isso não constam desta tabela.

A Tabela 6 representa os dados de alterações anatomopatológicas das placentas coletadas do grupo NÃO COVID-19.

TABELA 6 - INFORMAÇÕES DAS ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS DAS PLACENTAS DO GRUPO NÃO COVID-19

<b>PLACENTAS - GRUPO NÃO COVID-19</b>		
	<b>n (11)</b>	<b>%</b>
<b>Alterações anatomopatológicas</b>		
Sim	9	81,81%
Não	2	18,19%
	<b>MÉDIA (Min-Max)</b>	
<b>Peso da placenta</b>	527,27 (325-765)	

FONTE: O autor (2024).

## 4.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A técnica de imuno-histoquímica foi utilizada com a finalidade de identificar a expressão tecidual dos anticorpos contra os receptores e cofatores ECA-2, TMPRSS-2, furina, NRP-1 e ADAM-17 (Figura 12), após foi realizada a quantificação e a comparação dos dados através de métodos estatísticos.

Quando comparadas todas as amostras do grupo COVID-19 com o grupo NÃO COVID-19 houve significância estatística na porcentagem de expressão

tecidual apenas para o receptor NRP-1 na decídua conforme pode-se observar na Tabela 7.

TABELA 7 – IMUNO-HISTOQUÍMICA DO GRUPO COVID-19 X GRUPO NÃO COVID-19

	COVID-19 (%) Mediana (IQR)	NÃO COVID-19 (%) mediana (IQR)	p	COVID (n)*	NÃO COVID-19 (n)*
ECA-2 decídua	0,41 (0,59)	0,49 (0,35)	0,301	75	11
ECA-2 vilosidade	0,41 (0,81)	0,49 (0,36)	0,825	72	11
TMPRSS2 decídua	8,38 (11,0)	5,59 (6,09)	0,079	70	11
TMPRSS2 vilosidade	5,35 (5,33)	3,43 (4,09)	0,259	70	11
Furina decídua	21,4 (20,0)	14,7 (8,18)	0,286	74	11
Furina vilosidade	23,4 (22,2)	21,6 (10,0)	0,842	73	11
NRP-1 decídua	13,1 (13,1)	25,8 (8,73)	<b>&lt; 0,001</b>	71	11
NRP-1vilosidade	6,73 (7,63)	9,38 (7,70)	0,089	70	11

	COVID (%) Média (DP)	NÃO COVID-19 (%) Média (DP)	p	COVID (n)*	NÃO COVID-19 (n)*
ADAM-17 decídua	18,6 (11,4)	19,7 (6,57)	0,765	75	11
ADAM-17vilosidade	11,6 (6,67)	10,6 (5,05)	0,648	74	11

FONTE: O autor (2024).

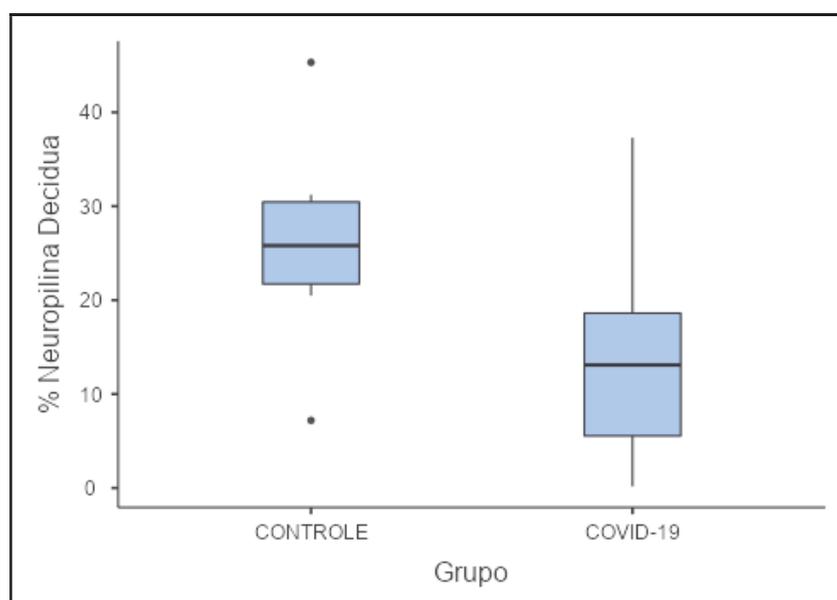
IQR – amplitude interquartil; DP – desvio padrão

NOTA: \* “n” amostral final variável devido à retirada de amostras com reações imuno-histoquímicas inadequadas.

Para a NRP-1 o valor de p foi menor que 0,001 e a expressão foi menor para o grupo COVID-19 conforme pode-se observar no

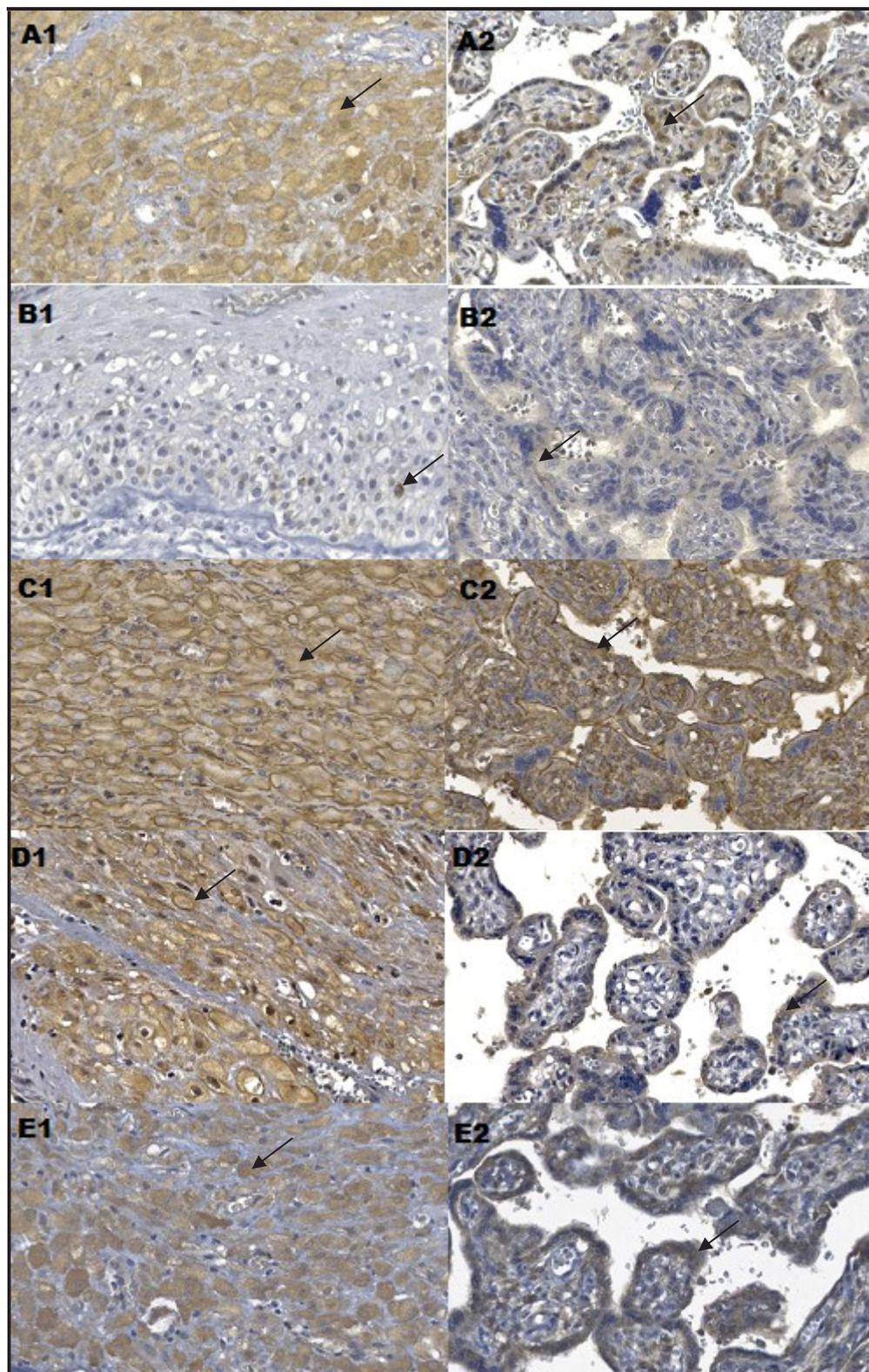
Gráfico 1.

GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DA NRP-1 ENTRE GRUPO COVID-19 E GRUPO NÃO COVID-19



FONTE: O autor (2024).

FIGURA 12 - COLORAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA OS RECEPTORES NA DECÍDUA E VILOSIDADES



FONTE: O autor (2024)

LEGENDA: A1 – ADAM 17 decídua; A2 – ADAM 17 vilosidades; B1 – ECA-2 decídua; B2 – ECA-2 vilosidades; C1 – Furina decídua; C2 – Furina vilosidades; D1 – Tmprss2 decídua; D2 – Tmprss2 vilosidades; E1 – Neuropilina 1 decídua; E2 – Neuropilina 1 vilosidades  
As setas indicam a coloração castanha das áreas positivas (objetiva de 40X).

Na análise de comorbidades e doenças de base também foram encontradas diferenças com significância estatística apenas para o receptor Neuropilina-1, somente nas pacientes sem comorbidade e somente na decídua conforme Tabela 8.

TABELA 8 - COMPARAÇÃO ENTRE A PORCENTAGEM DE NRP-1 ENTRE GRUPO COVID-19 E NÃO COVID-19 NAS PACIENTES SEM COMORBIDADES NA DECÍDUA

	n	Grupo COVID-19 (%) Mediana (IQR)	n	Grupo NÃO COVID-19 (%) Mediana (IQR)	P Mann-Whitney U
<b>SEM COMORBIDADES</b>	32	9,74 (13,2)	7	26,5 (6,11)	<b>&lt; 0.001</b>

FONTE: O autor (2024).

Foram feitas também comparações entre os grupos COVID-19 *versus* NÃO COVID-19 e as gestantes com e sem doenças de base como: diabetes, doença hipertensiva específica da gestação (DHEG), hipertensão arterial sistêmica (HAS) e obesidade. Em todas as comparações houve significância estatística apenas nas pacientes sem as doenças de base na decídua e a porcentagem de NRP-1 foi menor no grupo COVID-19 do que no grupo controle conforme Tabela 9 .

TABELA 9 - COMPARAÇÃO ENTRE A PORCENTAGEM DE NRP-1 ENTRE GRUPO COVID-19 E NÃO COVID-19 NAS PACIENTES SEM AS DOENÇAS DE BASE NA DECÍDUA

	n*	Grupo COVID-19 (%) Mediana (IQR)	n*	Grupo NÃO COVID-19 (%) Mediana (IQR)	P Mann-Whitney U
<b>SEM DIABETES</b>	61	13,5 (13,1)	9	25,8 (8,73)	<b>0.002</b>
<b>SEM HAS</b>	69	12,7 (13,0)	9	25,8 (8,72)	0.001
<b>SEM OBESIDADE</b>	61	12,1 (13,0)	11	25,8 (8,73)	<b>&lt; 0.001</b>
<b>SEM DHEG</b>	63	12,7 (13,2)	11	25,8 (8,73)	<b>&lt; 0.001</b>

FONTE: O autor (2024).

NOTA: \* "n" amostral variável devido à variação de gestantes com cada doença de base

Todas as análises acima foram também realizadas nas amostras de vilosidade, porém sem diferença significativa em nenhuma delas.

### 4.3 RT-qPCR PARA SARS-COV-2 EM AMOSTRAS PLACENTÁRIAS PARAFINADAS

Uma segunda bateria de análises foi realizada apenas com as amostras de decíduas e vilosidades que tiveram resultado detectado no teste de RT-qPCR para SARS-CoV-2 em tecido placentário parafinado comparando com o grupo NÃO COVID-19.

Através da técnica de RT-qPCR em amostras placentárias parafinadas (tanto na decídua como na vilosidade placentária) do grupo COVID-19 foram identificadas 11 amostras de decídua positivas para a presença de RNA do SARS-CoV-2, além de 8 amostras de vilosidades também positivas para este vírus. Quando comparado a imuno-histoquímica das 11 amostras deciduais positivas para SARS-CoV-2 do grupo COVID-19 com as do grupo NÃO COVID-19, houve diferença significativa apenas para o receptor NRP-1 sendo que a menor porcentagem de expressão tecidual deste marcador foi observada para o grupo COVID-19 SARS-CoV-2 positivo na decídua (Tabela 10). Este resultado coincide com os resultados anteriores da imuno-histoquímica. As 8 amostras do grupo COVID-19 onde as vilosidades placentárias foram positivas para SARS-CoV-2 foram comparadas com amostras do grupo NÃO COVID-19, sendo que não houve resultados com significância estatística.

TABELA 10 - COMPARAÇÃO DAS 11 AMOSTRAS DE DECÍDUAS POSITIVAS NA RT-qPCR COM O GRUPO NÃO COVID-19

IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS RECEPTORES	COVID-19 (%) Mediana (IQR)	NÃO COVID-19 (%) Mediana (IQR)	Valor de p Mann-Whitney U
ECA-2	0,56 (0,57)	0,49 (0,35)	0,949
TMPRSS 2	6,26 (6,95)	3,43 (4,09)	0,272
FURINA	23,6 (18,8)	14,7 (8,18)	0,748
NRP 1	9,17 (9,40)	25,8 (8,73)	<b>&lt; 0,001</b>
ADAM-17	14,8 (12,8)	20,8 (6,95)	0,562

FONTE: O autor (2024).

## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, onde se comparou um grupo de gestantes, que tiveram diagnóstico de COVID-19 em algum momento da gestação, com um grupo de gestantes conhecidamente negativas, verificou-se uma menor porcentagem de expressão tecidual do receptor neuropilina-1 (NRP-1) somente nas amostras de decídua para o grupo COVID-19 comparado ao grupo NÃO COVID-19. Este resultado foi confirmado quando foram comparadas somente as 11 amostras em que foi demonstrada a presença do RNA viral por RT-qPCR com as amostras do grupo NÃO COVID-19. Nenhum dos outros receptores pesquisados teve resultado significativo quando foi realizada a mesma comparação.

Assim como outros vírus, o SARS-CoV-2 precisa utilizar fatores celulares do hospedeiro para infecção e replicação. A enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2) é o receptor canônico para a ligação da proteína *spike* do SARS-CoV-2. A ligação à ECA-2 é seguida pela preparação da proteína S pela serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2) o que permite a fusão do vírus com as membranas celulares do hospedeiro (ALIPOOR; MIRSAEIDI, 2022; HOFFMANN et al., 2020).

Pique-Regi e colaboradores investigaram a expressão de ECA-2 e TMPRSS2 em placentas usando dados de sequenciamento de RNA de célula única e verificaram que muito poucas células coexpressam ECA-2 e TMPRSS2. Adicionalmente, Bloise e colaboradores usando sequenciamento de RNA mensageiro para ambos os receptores demonstraram que a expressão de ambos é regulada negativamente conforme a gestação progride, sendo maior no primeiro trimestre e caindo gradativamente a níveis insignificantes no terceiro trimestre. Considerando que 84,51% das placentas deste estudo eram de terceiro trimestre e estas teriam níveis extremamente baixos de ECA-2 e TMPRSS2, a ausência de diferença significativa entre os dois grupos foi consistente com os dados da literatura (BLOISE et al., 2021; PIQUE-REGI et al., 2020).

Embora esta seja a via principal para a entrada viral, foi demonstrado que o SARS-CoV-2 pode infectar células que expressam muito pouco ou mesmo não expressam ECA-2 ou TMPRSS-2, o que sugere que existem outros receptores e cofatores os quais podem ser utilizados por este vírus (ARGUETA et al., 2021; GADANEC et al., 2021; KONG et al., 2022; NAIDU et al., 2024).

Ouyang e colaboradores demonstraram a expressão de RNA mensageiro tanto de ECA-2 e TMPRSS2 quanto de furina em células de placenta, porém sem levar em consideração os períodos gestacionais. Eles verificaram que a furina é amplamente expressa na placenta, porém devido à sua atuação realizando uma pré clivagem da proteína S preparando-a, assim, para a posterior clivagem pela TMPRSS2 é improvável que ela atue isoladamente como um receptor para o SARS-CoV-2, o que poderia explicar a ausência de diferença significativa entre os dois grupos (OUYANG et al., 2021).

ADAMs são metaloproteínases dependentes de zinco que clivam porções extracelulares de proteínas transmembranares (MAAS; DONNERS; VAN DER VORST, 2023). A ADAM 17 é conhecida por clivar a porção extracelular de ECA-2, gerando uma forma de ectodomínio solúvel desta enzima (WANG; ZHAO; AN, 2022). Jocher e colaboradores identificaram a ADAM17 como um facilitador da entrada do SARS-CoV-2 nas células, esta cliva a proteína *spike* do SARS-CoV-2 in vitro, assim contribuindo para a preparação (*priming*) da proteína S (JOCHER et al., 2022). Apesar disso, o papel que esta proteína exerce na infecção por este vírus, bem como em qual via de entrada está envolvido não está totalmente elucidado necessitando de mais pesquisas para seu esclarecimento. Neste estudo não foram encontrados resultados significativamente estatísticos para esta protease.

Alguns trabalhos indicam que o SARS-CoV-2 pode estar não somente presente, mas também se replicar em células placentárias levantando a questão de que receptores não canônicos poderiam estar envolvidos no ciclo biológico do vírus nessas células (ARGUETA et al., 2022a; CONSTANTINO et al., 2021; RADAN et al., 2024).

Um provável candidato é a proteína transmembrana NRP-1, que foi recentemente identificada como um fator hospedeiro que facilita a entrada e a infectividade do SARS-CoV-2 nas células. A NRP-1 foi originalmente identificada como um correceptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) nas células endoteliais, mas é expresso também na interface materno-fetal, nas células decíduas e no sincitiotrofoblasto onde desempenha papéis importantes durante a gravidez e no sistema imunológico (ARAD et al., 2017; HE; TESSIER-LAVIGNE, 1997; KOLODKIN et al., 1997).

Segundo Naidoo e colaboradores (2022), NRP-1 é altamente expressa na decídua humana, células sincitiotrofoblásticas e trofoblásticas extravilosas, células

endoteliais de capilares e vasos vilosos da placenta, onde desempenha um papel fundamental no estabelecimento e manutenção do microambiente materno-fetal. A NRP-1 também é essencial para o crescimento fetal saudável. A expressão desregulada do gene NRP-1 neuronal e endotelial em camundongos predispõe à morte embrionária devido a complicações durante o desenvolvimento cardiopulmonar. Portanto, a forte regulação da expressão de NRP-1 é essencial durante a gravidez (NAIDOO *et al.*, 2022).

Também foi relatado que NRP-1 é expressa no endotélio vascular e linfático onde desempenha um papel fundamental na angiogênese dependente de VEGF, ou seja, na formação de novos vasos sanguíneos (NAIDU *et al.*, 2024).

Argueta e colaboradores a fim de determinar os papéis relativos de ECA-2 e NRP-1 na entrada do SARS-CoV-2 na placenta trataram aglomerados de células placentárias com anticorpos bloqueadores anti-ECA-2 ou anti-NRP-1 antes da infecção com lentivírus pseudotipado com proteína spike D614G. Ambos os anticorpos diminuíram a infectividade do lentivírus pseudotipado sendo 3,5 vezes para anti ECA-2 e 3,1 vezes para anti-NRP-1 (ARGUETA *et al.*, 2022a).

Além disso, Kong e colaboradores demonstraram que a NRP-1 (e não a ECA-2) funciona como o receptor primário para a proteína S do SARS-CoV-2 em astrócitos, já que o nível de expressão de ECA-2 em células do sistema nervoso central (SNC) é muito baixo (KONG *et al.*, 2022).

A menor expressão tecidual de NRP-1 no grupo COVID-19 sugere que a NRP-1 pode estar sendo usada como receptor alternativo, devido à baixa expressão de ECA-2 e a falta de expressão conjunta de ECA-2 e TMPRSS-2 nas células da placenta, ou tendo sua expressão alterada pelo vírus ou devido à desregulação da angiogênese e inflamação, já que é um receptor para VEGFs e a infecção por SARS-CoV-2 parece alterar angiogênese e inflamação na placenta (BOYCHUK *et al.*, 2023; GIARDINI *et al.*, 2022).

De fato, quando foram comparadas as pacientes COVID-19 com as do grupo NÃO COVID-19, ambos sem comorbidades, nota-se que somente o grupo COVID-19 teve uma menor expressão tecidual de NRP-1, o que indica que as comorbidades incluídas no estudo não tiveram um papel relevante na alteração da expressão desse receptor. Isso sugere que a NRP-1 pode estar sendo utilizada pelo vírus ou consumida por algum outro efeito patológico da infecção já que houve uma menor expressão tecidual, mesmo sem a presença das comorbidades estudadas.

No caso das amostras de vilosidades não foram encontradas diferenças significativamente estatísticas para nenhum dos receptores pesquisados. O fato de a camada de sinciciotrofoblastos, que reveste as vilosidades, não possuir junções entre as células e estas expressarem muito poucos receptores visando impedir que patógenos alcancem o sangue fetal pode ser a razão para estes resultados.

Este trabalho comparou a expressão tecidual de 5 dos principais receptores e cofatores canônicos e alternativos envolvidos na entrada do SARS-CoV-2 em células de placenta de gestantes infectadas em relação a não infectadas.

Esses resultados são importantes para orientar novos estudos acerca do papel que estes receptores desempenham tanto na entrada viral como na patogênese da infecção na placenta de gestantes infectadas por SARS-CoV-2 visando desenvolver mecanismos de bloqueio e manejo da infecção.

## 6 CONCLUSÕES

1) Em relação a comparação da expressão tecidual dos receptores e cofatores estudados entre os grupos COVID-19 e NÃO COVID-19, temos:

- verificou-se menor expressão tecidual do receptor neuropilina-1 (NRP-1) somente nas amostras de decídua para o grupo COVID-19 comparado ao grupo NÃO COVID-19. Esta menor expressão foi confirmada quando comparado as 11 amostras deciduais SARS-CoV-2 positivas do grupo COVID-19 com as amostras do grupo NÃO COVID-19;
- não houve diferença na expressão tecidual de NRP-1 nas amostras de vilosidades em nenhuma das análises realizadas;
- não houve diferença na expressão tecidual de ECA-2, TMPRSS2, furina e ADAM-17 nas amostras tanto de decídua quanto de vilosidades em nenhuma das análises realizadas.

2) Em relação a comparação da expressão tecidual dos receptores e cofatores estudados com as comorbidades das pacientes, temos:

- não houve diferença na expressão tecidual da NRP-1 quando comparado as pacientes COVID-19 e NÃO COVID-19 com comorbidades;
- somente o grupo COVID-19 teve uma menor expressão tecidual de NRP-1, quando comparadas as pacientes COVID-19 e grupo NÃO COVID-19 sem comorbidades;
- não foram encontrados quaisquer outros resultados significativos quando a expressão tecidual das outras moléculas estudadas (ECA-2, TMPRSS2, furina e ADAM-17) foi comparada à presença ou ausência de comorbidades.

## 7 LIMITAÇÕES

As limitações incluem:

- a ausência de amostras com algumas comorbidades no grupo NÃO COVID-19;
- o uso de fragmentos pequenos de placenta parafinada e a degradação do RNA viral podem ter diminuído a detecção do vírus no tecido parafinado pelo teste de RT-qPCR;
- o fato de que 84,5% das amostras eram de gestantes no terceiro trimestre pode ter limitado os resultados para o receptor ECA-2 já que existem diferenças na expressão placentária desse receptor entre os diferentes trimestres da gestação, sendo maior no primeiro trimestre e caindo gradativamente até o terceiro trimestre.

## 8 PERSPECTIVAS

O cuidado da gestante e do recém-nascido devem estar sempre entre as prioridades do atendimento em saúde, visando a redução da mortalidade materno-infantil e a saúde da mãe e do feto. Muito se tem avançado na investigação das infecções de transmissão vertical. O SARS-CoV-2 tem sido detectado em amostras de placenta, sangue de cordão e outros fluidos corporais. Portanto, conhecer os diferentes mecanismos, vias, marcadores e cofatores que podem estar envolvidos nesse processo são de extrema relevância para mapear e aprofundar os conhecimentos sobre esse processo. Os achados aqui relatados sobre a NRP-1 são altamente promissores, e os estudos devem ser continuados com a perspectiva de que esse marcador possa ser melhor caracterizado e sua participação nesse processo completamente compreendida, visando desenvolver mecanismos de bloqueio de infecção e transmissão desse vírus.

## REFERÊNCIAS

- ALIPOOR, S. D.; MIRSAEIDI, M. SARS-CoV-2 cell entry beyond the ACE2 receptor. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 11, p. 10715–10727, 2022.
- ALLOTEY, J. et al. SARS-CoV-2 positivity in offspring and timing of mother-to-child transmission: living systematic review and meta-analysis. **The BMJ**, v. 376, p. e067696, 16 mar. 2022.
- ARAD, A. et al. The Expression of Neuropilin-1 in Human Placentas From Normal and Preeclamptic Pregnancies. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 36, n. 1, p. 42, jan. 2017.
- ARGUETA, L. B. et al. SARS-CoV-2 Infects Syncytiotrophoblast and Activates Inflammatory Responses in the Placenta. **bioRxiv: The Preprint Server for Biology**, p. 2021.06.01.446676, 17 jun. 2021.
- ARGUETA, L. B. et al. Inflammatory responses in the placenta upon SARS-CoV-2 infection late in pregnancy. **iScience**, v. 25, n. 5, p. 104223, 11 abr. 2022a.
- ARGUETA, L. B. et al. Inflammatory responses in the placenta upon SARS-CoV-2 infection late in pregnancy. **iScience**, v. 25, n. 5, p. 104223, 20 maio 2022b.
- BARTHE, M. et al. Receptors and Cofactors That Contribute to SARS-CoV-2 Entry: Can Skin Be an Alternative Route of Entry? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6253, 26 mar. 2023.
- BIORENDER. **An In-depth Look into the Structure of the SARS-CoV2 Spike Glycoprotein.** , 2020. Disponível em: <<https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-5f1754e62baea000aee86904-an-in-depth-look-into-the-structure-of-the-sars-cov2-spike-g>>. Acesso em: 1 jun. 2024
- BLOISE, E. et al. Expression of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 cell entry genes, angiotensin-converting enzyme 2 and transmembrane protease serine 2, in the placenta across gestation and at the maternal-fetal interface in pregnancies complicated by preterm birth or preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 224, n. 3, p. 298.e1-298.e8, mar. 2021.
- BLUMBERG, D. A. et al. Vertical Transmission of SARS-CoV-2: What is the Optimal Definition? **American Journal of Perinatology**, v. 37, n. 08, p. 769–772, jun. 2020.
- BONDEVA, T.; WOLF, G. Role of Neuropilin-1 in Diabetic Nephropathy. **Journal of Clinical Medicine**, v. 4, n. 6, p. 1293–1311, 17 jun. 2015.
- BOOTH, C. M. et al. Clinical Features and Short-term Outcomes of 144 Patients With SARS in the Greater Toronto Area. **JAMA**, v. 289, n. 21, p. 2801–2809, 4 jun. 2003.
- BORSETTO, D. et al. Self-reported alteration of sense of smell or taste in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis on 3563 patients. **Rhinology journal**, v. 0, n. 0, 2020.

BOYCHUK, A. V. et al. PREGNANT WOMEN WITH COVID-19 AND PLACENTA ANGIOGENESIS. **Polski Merkuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego**, v. 51, n. 5, p. 441–447, 2023.

CALLAWAY, E. COVID's future: mini-waves rather than seasonal surges. **Nature**, v. 617, n. 7960, p. 229–230, 1 maio 2023.

CANTUTI-CASTELVETRI, L. et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 370, n. 6518, p. 856–860, 13 nov. 2020.

CAROSELLI, C. et al. Early Lung Ultrasound Findings in Patients With COVID-19 Pneumonia: A Retrospective Multicenter Study of 479 Patients. **Journal of Ultrasound in Medicine**, v. 41, n. 10, p. 2547–2556, 2022.

CHEN et al. Neuropilin-2, a Novel Member of the Neuropilin Family, Is a High Affinity Receptor for the Semaphorins Sema E and Sema IV but Not Sema III. **Neuron**, v. 19, n. 3, p. 547–559, 1 set. 1997.

CHEN, Y.-W. et al. TMPRSS2, a Serine Protease Expressed in the Prostate on the Apical Surface of Luminal Epithelial Cells and Released into Semen in Prostatosomes, Is Misregulated in Prostate Cancer Cells. **The American Journal of Pathology**, v. 176, n. 6, p. 2986–2996, jun. 2010.

CONSTANTINO, F. B. et al. Prediction of Non-canonical Routes for SARS-CoV-2 Infection in Human Placenta Cells. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, p. 614728, 8 nov. 2021.

COUTARD, B. et al. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. **Antiviral Research**, v. 176, p. 104742, abr. 2020.

DALY, J. L. et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. **Science**, v. 370, n. 6518, p. 861–865, 13 nov. 2020.

DE LUCA, D. et al. Transmission of SARS-CoV-2 from mother to fetus or neonate: What to know and what to do? **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 28, n. 1, p. 101429, fev. 2023.

ELPEK. Neuropilins and liver. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 23, p. 7065–7073, 21 jun. 2015.

FENIZIA, C. et al. Analysis of SARS-CoV-2 vertical transmission during pregnancy. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 5128, 12 out. 2020.

GADANEC, L. K. et al. Can SARS-CoV-2 Virus Use Multiple Receptors to Enter Host Cells? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 992, 20 jan. 2021.

GIARDINI, V. et al. Imbalanced Angiogenesis in Pregnancies Complicated by SARS-CoV-2 Infection. **Viruses**, v. 14, n. 10, p. 2207, 7 out. 2022.

GÓMEZ, C. E.; PERDIGUERO, B.; ESTEBAN, M. Emerging SARS-CoV-2 Variants and Impact in Global Vaccination Programs against SARS-CoV-2/COVID-19. **Vaccines**, v. 9, n. 3, p. 243, 11 mar. 2021.

GOSTOMCZYK, K. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 Placental Transmission. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 72, n. 1, 1 jan. 2024.

GU, C. et al. Characterization of Neuropilin-1 Structural Features That Confer Binding to Semaphorin 3A and Vascular Endothelial Growth Factor 165 \*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 20, p. 18069–18076, 17 maio 2002.

HE, Z.; TESSIER-LAVIGNE, M. Neuropilin Is a Receptor for the Axonal Chemorepellent Semaphorin III. **Cell**, v. 90, n. 4, p. 739–751, 22 ago. 1997.

HIKMET, F. et al. The protein expression profile of ACE2 in human tissues. **Molecular Systems Biology**, v. 16, n. 7, p. e9610, jul. 2020.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271–280.e8, 2020.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 15 fev. 2020.

ICTV. **Visual Taxonomy Browser Search**. , 2024. Disponível em: <<https://ictv.global/taxonomy/visual-browser>>. Acesso em: 9 jul. 2024

JACKSON, C. B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 3–20, 2022.

JOCHER, G. et al. ADAM10 and ADAM17 promote SARS-CoV-2 cell entry and spike protein-mediated lung cell fusion. **EMBO reports**, v. 23, n. 6, p. e54305, 7 jun. 2022.

KIRK, N. M.; LIANG, Y.; LY, H. Pathogenesis and virulence of coronavirus disease: Comparative pathology of animal models for COVID-19. **Virulence**, v. 15, n. 1, p. 2316438, 2024.

KO, J. Y. et al. Adverse Pregnancy Outcomes, Maternal Complications, and Severe Illness Among US Delivery Hospitalizations With and Without a Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Diagnosis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 73, n. Suppl 1, p. S24–S31, 15 jul. 2021.

KOLODKIN, A. L. et al. Neuropilin Is a Semaphorin III Receptor. **Cell**, v. 90, n. 4, p. 753–762, 22 ago. 1997.

KOMINE-AIZAWA, S.; TAKADA, K.; HAYAKAWA, S. Placental barrier against COVID-19. **Placenta**, v. 99, p. 45–49, 15 set. 2020.

KONG, W. et al. Neuropilin-1 Mediates SARS-CoV-2 Infection of Astrocytes in Brain Organoids, Inducing Inflammation Leading to Dysfunction and Death of Neurons. **mBio**, v. 13, n. 6, p. e02308-22, 2022.

KUMAR, D.; VERMA, S.; MYSOREKAR, I. U. COVID-19 and pregnancy: clinical outcomes; mechanisms, and vaccine efficacy. **Translational Research**, v. 251, p. 84–95, jan. 2023.

KUNG, Y.-A. et al. Molecular Virology of SARS-CoV-2 and Related Coronaviruses. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 86, n. 2, p. e0002621, 15 jun. 2022.

LAN, J. et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. **Nature**, v. 581, n. 7807, p. 215–220, maio 2020.

LEE, J. K. et al. Recent Updates on Research Models and Tools to Study Virus–Host Interactions at the Placenta. **Viruses**, v. 12, n. 1, p. 5, jan. 2020.

LI, W. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. **Nature**, v. 426, n. 6965, p. 450–454, nov. 2003.

LU, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10224, p. 565–574, 22 fev. 2020.

MAAS, S. L.; DONNERS, M. M. P. C.; VAN DER VORST, E. P. C. ADAM10 and ADAM17, Major Regulators of Chronic Kidney Disease Induced Atherosclerosis? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, p. 7309, 15 abr. 2023.

MALONE, B. et al. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 21–39, jan. 2022.

MEGLI, C. J.; COYNE, C. B. Infections at the maternal–fetal interface: an overview of pathogenesis and defence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 67–82, fev. 2022.

MILLET, J. K.; JAIMES, J. A.; WHITTAKER, G. R. Molecular diversity of coronavirus host cell entry receptors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 45, n. 3, p. fuaa057, 1 maio 2021.

MINGALEEVA, R. N. et al. Biology of the SARS-CoV-2 Coronavirus. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 87, n. 12, p. 1662–1678, dez. 2022.

NAIDOO, N. et al. Neuropilin-1 in the pathogenesis of preeclampsia, HIV-1, and SARS-CoV-2 infection: A review. **Virus Research**, v. 319, p. 198880, 2 out. 2022.

NAIDOO, N. et al. Immunoexpression of neuropilin-1 in the chorionic villi of HIV-infected preeclamptic South African women of African ancestry. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 160, n. 4, p. 307–319, out. 2023.

NAIDU, A. S. et al. Precision nutrition to reset virus-induced human metabolic reprogramming and dysregulation (HMRD) in long-COVID. **NPJ Science of Food**, v. 8, p. 19, 30 mar. 2024.

NOBREGA, G. DE M. et al. Placental Sampling for Understanding Viral Infections - A Simplified Protocol for the COVID-19 Pandemic. **Revista brasileira de ginecologia e obstetricia : revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia**, v. 43, n. 5, p. 377–383, maio 2021.

OUYANG, Y. et al. Term Human Placental Trophoblasts Express SARS-CoV-2 Entry Factors ACE2, TMPRSS2, and Furin. **mSphere**, v. 6, n. 2, p. e00250-21, 2021.

PALAU, V. et al. Role of ADAM17 in kidney disease. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 317, n. 2, p. F333–F342, ago. 2019.

PELLET-MANY, C. et al. Neuropilins: structure, function and role in disease. **Biochemical Journal**, v. 411, n. 2, p. 211–226, 27 mar. 2008.

PENG, R. et al. Cell entry by SARS-CoV-2. **Trends in biochemical sciences**, v. 46, n. 10, p. 848–860, out. 2021.

PIÑANA, M. et al. Viral populations of SARS-CoV-2 in upper respiratory tract, placenta, amniotic fluid and umbilical cord blood support viral replication in placenta. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 10, p. 1542–1544, out. 2021.

PIQUE-REGI, R. et al. Does the human placenta express the canonical cell entry mediators for SARS-CoV-2? **eLife**, v. 9, p. e58716, 14 jul. 2020.

RADAN, A.-P. et al. SARS-CoV-2 replicates in the placenta after maternal infection during pregnancy. **Frontiers in Medicine**, v. 11, p. 1439181, 4 set. 2024.

RANDO, H. M. et al. Pathogenesis, Symptomatology, and Transmission of SARS-CoV-2 through Analysis of Viral Genomics and Structure. **mSystems**, v. 6, n. 5, out. 2021.

RANGU, R. et al. Going Viral in the Islet: Mediators of SARS-CoV-2 Entry Beyond ACE2. **Journal of molecular endocrinology**, v. 69, n. 2, p. R63–R79, 17 jun. 2022.

RAVI, V.; SAXENA, S.; PANDA, P. S. Basic virology of SARS-CoV 2. **Indian journal of medical microbiology**, v. 40, n. 2, p. 182–186, jun. 2022.

SALEKI, K.; ALIJANIZADEH, P.; AZADMEHR, A. Is neuropilin-1 the neuroimmune initiator of multi-system hyperinflammation in COVID-19? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 167, p. 115558, 1 nov. 2023.

SEEGENE. **Allplex™ SARS-CoV-2 Assay - Manual de instruções**. , 1 nov. 2020. Disponível em: <[https://seegenebrazil.com.br/wp-content/uploads/2021/01/RV10247Y\\_V1-15\\_PT-Manual.pdf](https://seegenebrazil.com.br/wp-content/uploads/2021/01/RV10247Y_V1-15_PT-Manual.pdf)>. Acesso em: 18 abr. 2024

SHAH, P. S. et al. Classification system and case definition for SARS-CoV-2 infection in pregnant women, fetuses, and neonates. **Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica**, v. 99, n. 5, p. 565–568, maio 2020.

SHAPIRO, J. et al. Localization of endogenous furin in cultured cell lines. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, v. 45, n. 1, p. 3–12, jan. 1997.

SIMBAR, M.; NAZARPOUR, S.; SHEIDAEI, A. Evaluation of pregnancy outcomes in mothers with COVID-19 infection: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 43, n. 1, p. 2162867, 31 dez. 2023.

ŞİMŞEK-YAVUZ, S. COVID-19: An Update on Epidemiology, Prevention and Treatment, September-2023. **Infectious Diseases & Clinical Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 165–187, 2023.

STONOĞA, E. T. S. et al. Intrauterine Transmission of SARS-CoV-2. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 2, p. 638–641, fev. 2021.

TEAM, B. **Mechanism of SARS-CoV-2 Viral Entry**. , 2020. Disponível em: <<https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-5f99eb1307ef9a009f1c61e0-mechanism-of-sars-cov-2-viral-entry>>. Acesso em: 1 jun. 2024

THOMAS, G. FURIN AT THE CUTTING EDGE: FROM PROTEIN TRAFFIC TO EMBRYOGENESIS AND DISEASE. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 3, n. 10, p. 753–766, out. 2002.

VIVANTI, A. J. et al. Transplacental transmission of SARS-CoV-2 infection. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 3572, 14 jul. 2020.

V'KOVSKI, P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 155–170, mar. 2021.

WALLS, A. C. et al. Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 42, p. 11157–11162, 17 out. 2017.

WALLS, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281- 292.e6, 16 abr. 2020.

WANG, D. et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, v. 323, n. 11, p. 1061–1069, 17 mar. 2020.

WANG, J.; ZHAO, H.; AN, Y. ACE2 Shedding and the Role in COVID-19. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 14 jan. 2022.

WASTNEDGE, E. A. N. et al. Pregnancy and COVID-19. **Physiological reviews**, v. 101, n. 1, p. 303–318, 1 jan. 2021.

WHO, W. H. O. **Definition and categorization of the timing of mother-to-child transmission of SARS-CoV-2.** , 2021. Disponível em: <<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/339422/WHO-2019-nCoV-mother-to-child-transmission-2021.1-eng.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 17 mar. 2024

WHO, W. H. O. **WHO COVID-19 dashboard.** , 2024. Disponível em: <<https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?n=c>>. Acesso em: 14 maio. 2024

WILLS, C. P.; PEREZ, B.; MOORE, J. Coronavirus Disease 2019: Past, Present, and Future. **Emergency Medicine Clinics of North America**, Infectious Disease Emergencies. v. 42, n. 2, p. 415–442, 1 maio 2024.

WONG, D. W. L. et al. Multisystemic Cellular Tropism of SARS-CoV-2 in Autopsies of COVID-19 Patients. **Cells**, v. 10, n. 8, p. 1900, 27 jul. 2021.

WONG, Y. P.; TAN, G. C.; KHONG, T. Y. SARS-CoV-2 Transplacental Transmission: A Rare Occurrence? An Overview of the Protective Role of the Placenta. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4550, 25 fev. 2023.

WOO, P. C. Y. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Coronaviridae 2023. **Journal of General Virology**, v. 104, n. 4, p. 001843, 2023.

XIE, Y.; CHOI, T.; AL-ALY, Z. Risk of Death in Patients Hospitalized for COVID-19 vs Seasonal Influenza in Fall-Winter 2022-2023. **JAMA**, v. 329, n. 19, p. 1697–1699, 16 maio 2023.

ZAKI, A. M. et al. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 19, p. 1814–1820, 8 nov. 2012.

ZAMBRANO, L. D. et al. Update: Characteristics of Symptomatic Women of Reproductive Age with Laboratory-Confirmed SARS-CoV-2 Infection by Pregnancy Status - United States, January 22-October 3, 2020. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 69, n. 44, p. 1641–1647, 6 nov. 2020.

ZHANG, M. et al. Intrauterine transmission of SARS-CoV-2 to and prenatal ultrasound abnormal findings in the fetus of a pregnant woman with mild COVID-19. **BMC pregnancy and childbirth**, v. 23, n. 1, p. 723, 11 out. 2023.

ZHENG, L. et al. Digestive system infection by SARS-CoV-2: Entry mechanism, clinical symptoms and expression of major receptors (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 51, n. 3, p. 19, 20 jan. 2023.

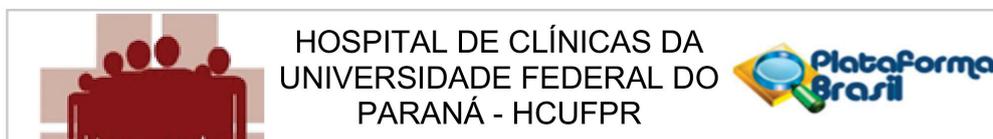
ZHONG, N.; ZHENG, B. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. **The Lancet**, v. 362, n. 9393, p. 1353–1358, 25 out. 2003.

ZHU, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020.

ZUNKE, F.; ROSE-JOHN, S. The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell**

**Research**, Proteolysis as a Regulatory Event in Pathophysiology. v. 1864, n. 11, Part B, p. 2059–2070, 1 nov. 2017.

## ANEXO I- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação de Resultados Maternos e Perinatais em Gestantes com COVID-19 em Hospitais Terciários de Curitiba - Paraná

**Pesquisador:** NARCIZO LEOPOLDO EDUARDO DA CUNHA SOBIERAY

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 35129820.6.0000.0096

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 6.845.872

**Apresentação do Projeto:**

O estudo será prospectivo, observacional, com delineamento tipo caso-controle

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar as características da doença na gestação e as implicações nos resultados maternos e perinatais de gestantes infectadas pelo SARS-CoV-2

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

As pacientes assintomáticas avaliadas no pré-natal do Hospital de Clínicas ou no PAGO que testarem positivo para o COVID-19 serão imediatamente avisadas para que tomem medidas de isolamento social conforme determinado pelos órgãos competentes. Essas pacientes serão monitoradas remotamente e em consultas de pré-natal periódicas a fim de identificar possíveis sintomas e qualquer sinal de gravidade para que venham a comprometer a saúde materna ou fetal.

Durante o acompanhamento do atendimento, admissão hospitalar e acompanhamento do internamento e parto das gestantes positivas para o COVID-19, todos os profissionais envolvidos no atendimento, na coleta e no processamento dos materiais da pesquisa utilizarão as medidas de precaução padronizadas (EPIs) pela CCIH do Complexo Hospital de Clínicas, a fim de evitar a contaminação da equipe.

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, nº181, Anexo G, 4º andar  
**Bairro:** Alto da Glória **CEP:** 80.060-900  
**UF:** PR **Município:** CURITIBA  
**Telefone:** (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br

## ANEXO II- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

### 1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Título do Projeto de Pesquisa: Avaliação anatomopatológica de placentas de gestante com COVID 19

#### INVESTIGADORES DO ESTUDO

Patricia Zadorosnei Rebutini 1 , Aline Cristina Zanchettin 2 , Emanuele Therezinha Schueda Stonoga 3 , Daniele Margarita Marani Pra' 1, Andre' Luiz Parmegiani de Oliveira1 , Felipe da Silva Deziderio 1 , Aline Simoneti Fonseca 2 , Julio Cesar Honorio Dagostini 3 , Elisa Carolina Hlatchuk 3, Isabella Naomi Furuie 4 , Jessica da Silva Longo4, Bárbara Maria Cavalli 5 , Carolina Lumi

Tan aka Dino 5 , Viviane Maria de Carvalho Hessel Dias 1 , Ana Paula Percicote 3 , Meri Bordignon Nogueira 5 , Sonia Mara Rabon i6 , Newton Sergio de Carvalho 5 , Cleber Machado-Souza 2\* and Lucia de Noronha 1

2 Postgraduate Program of Health Sciences, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná -PUCPR, Curitiba, Brazil,

3 Postgraduate Program in Biotechnology Applied in Health of Children and Adolescent, Pele' Pequeno Príncipe, Research Institute, Faculdades Pequeno Príncipe, Curitiba, Brazil,

4 Department of Medical Pathology, Clinical Hospital, Universidade Federal do Paraná -UFPR, Curitiba, Brazil,

5 Department of Tocogynecology, Clinical Hospital, Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, PR, Brazil,

6 Postgraduate Program of Tocogynecology and Women's Health, Clinical Hospital, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, Brazil,

7 Department of Infectious Disease, Clinical Hospital, Universidade Federal do Paraná -UFPR, Curitiba, Brazil

Você está sendo convidado(a) a participar do estudo “**Avaliação Anatomopatológica de Placentas de Gestante com COVID 19**”. Este estudo está sendo realizado em parceria das seguintes instituições: Pontifícia Universidade Católica, Hospital de Clínicas da UFPR e Hospital Nossa Senhora das Graças.

Este Termo de Consentimento explica porque este estudo está sendo realizado e qual será a sua participação ( ou do seu familiar ) , caso você aceite o convite. Este documento também descreve os possíveis riscos e benefícios se você quiser participar. Após analisar as informações com a pessoa que explica este Termo de Consentimento, e esclarecer suas dúvidas, você deverá ter o conhecimento necessário para tomar uma decisão esclarecida sobre sua participação ou não neste estudo.

#### JUSTIFICATIVA PARA O ESTUDO

Uma nova cepa do coronavírus respiratório (SARS-CoV-2) emergiu na China no final de 2019, espalhou-se pelo planeta, infectando milhões de pessoas e causando milhares de mortes em todo mundo. Até 29 de junho de 2020 o vírus já infectou mais de 10 milhões de pessoas, causando em torno de 500 mil mortes (WHO-2020).

Especialmente neste momento da pandemia do coronavírus, para melhor conhecer seus efeitos nos organismos das gestantes, dos fetos e dos recém-nascidos, se faz necessária e oportuna esta pesquisa.

#### OBJETIVO DO ESTUDO

Avaliação anatomopatologica de placentas de gestantes com COVID 1

#### PROCEDIMENTOS

Para execução deste estudo solicitamos que o senhor (a) autorize utilização de material biológico – PLACENTA - a qual será submetida ao exame anatomopatológico.

Também solicitamos autorização para revisão do seu prontuário médico ( ou da sua familiar gestante).

Todos estes dados serão utilizados de forma sigilosa

### **RISCOS E DESCONFORTOS PARA OS PARTICIPANTES**

Não haverá riscos ou desconforto ao paciente uma vez que a retirada da placenta faz parte do procedimento obstétrico da cesárea ou parto vaginal.

### **BENEFICIOS ESPERADOS**

Neste momento o mundo concentra esforços para o entendimento da fisiopatologia da infecção causada pelo SARS-CoV-2 para que possamos encontrar tratamento adequado o mais rápido possível.

### **LIBERDADE DE RECUSA**

A sua participação ( ou do seu familiar ) neste estudo é voluntária e não é obrigatória. Você pode aceitar participar do estudo e depois desistir a qualquer momento. Você também poderá pedir a qualquer momento que as suas informações (ou as informações do seu familiar ) sejam excluídas completamente deste estudo e que elas não sejam usadas para outros fins.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259. O Comitê de Ética em Pesquisa é um órgão colegiado multi e transdisciplinar, independente, que existe nas instituições que realizam pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil e foi criado com o objetivo de proteger os participantes de pesquisa, em sua integridade e dignidade, e assegurar que as pesquisas sejam desenvolvidas dentro de padrões éticos (Resolução nº 466/12 Conselho Nacional de Saúde).

Eu, \_\_\_\_\_ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim, e sem que esta decisão afete meu tratamento ou atendimento.

Eu concordo voluntariamente em participar deste

estudo. Curitiba, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de

---

[Assinatura do Participante de Pesquisa ou Responsável Legal]

---

[Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE]

## ANEXO III - ARTIGOS EM QUE FUI COAUTORA



## Association Between COVID-19 Pregnant Women Symptoms Severity and Placental Morphologic Features

Patricia Zadorosnei Rebutini<sup>1\*</sup>, Aline Cristina Zanchettin<sup>2</sup>, Emanuele Therezinha Schueda Stonoga<sup>3</sup>, Daniele Margarita Marani Prá<sup>1</sup>, André Luiz Parmegiani de Oliveira<sup>1</sup>, Felipe da Silva Dezidério<sup>1</sup>, Aline Simoneti Fonseca<sup>2</sup>, Júlio César Honório Dagostini<sup>3</sup>, Elisa Carolina Hlatchuk<sup>3</sup>, Isabella Naomi Furuie<sup>4</sup>, Jessica da Silva Longo<sup>4</sup>, Bárbara Maria Cavalli<sup>5</sup>, Carolina Lumi Tanaka Dino<sup>5</sup>, Viviane Maria de Carvalho Hessel Dias<sup>1</sup>, Ana Paula Percicote<sup>3</sup>, Meri Bordignon Nogueira<sup>5,6</sup>, Sonia Mara Raboni<sup>7</sup>, Newton Sergio de Carvalho<sup>5</sup>, Cleber Machado-Souza<sup>2\*</sup> and Lucia de Noronha<sup>1</sup>

## OPEN ACCESS

## Edited by:

Abhay P.S. Rathore,  
Duke University, United States

## Reviewed by:

David Alan Schwartz,  
Augusta University, United States  
Jeffery A. Goldstein,  
Northwestern Medicine, United States

## \*Correspondence:

Cleber Machado-Souza  
Cleberus@gmail.com  
Patricia Zadorosnei Rebutini  
rebutini@gmail.com

## Specialty section:

This article was submitted to  
Viral Immunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 26 March 2021

**Accepted:** 05 May 2021

**Published:** 26 May 2021

## Citation:

Rebutini PZ, Zanchettin AC,  
Stonoga ETS, Prá DIM,  
de Oliveira ALP, Dezidério FS,  
Fonseca AS, Dagostini JCH,  
Hlatchuk EC, Furuie IN, Longo JS,  
Cavalli BM, Dino CLT, Dias VMdCH,  
Percicote AP, Nogueira MB,  
Raboni SM, de Carvalho NS,  
Machado-Souza C and de Noronha L  
(2021) Association Between  
COVID-19 Pregnant Women  
Symptoms Severity and Placental  
Morphologic Features.  
*Front. Immunol.* 12:685919.  
doi: 10.3389/fimmu.2021.685919

<sup>1</sup> Postgraduate Program of Health Sciences, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná-PUCPR, Curitiba, Brazil, <sup>2</sup> Postgraduate Program in Biotechnology Applied in Health of Children and Adolescent, Pele Pequeno Príncipe, Research Institute, Faculdades Pequeno Príncipe, Curitiba, Brazil, <sup>3</sup> Department of Medical Pathology, Clinical Hospital, Universidade Federal do Paraná-UFRP, Curitiba, Brazil, <sup>4</sup> Department of Tocogynecology, Clinical Hospital, Universidade Federal do Paraná, UFRP, Curitiba, Brazil, <sup>5</sup> Postgraduate Program of Tocogynecology and Women's Health, Clinical Hospital, Universidade Federal do Paraná-UFRP, Curitiba, Brazil, <sup>6</sup> Virology Laboratory, Clinical Hospital, Universidade Federal do Paraná-UFRP, Curitiba, Brazil, <sup>7</sup> Department of Infectious Disease, Clinical Hospital, Universidade Federal do Paraná-UFRP, Curitiba, Brazil

Since the beginning of the pandemic, few papers describe the placenta's morphological and morphometrical features in SARS-CoV-2-positive pregnant women. Alterations, such as low placental weight, accelerated villous maturation, decidual vasculopathy, infarcts, thrombosis of fetal placental vessels, and chronic histiocytic intervillitis (CHI), have been described.

**Objective:** To analyze clinical data and the placental morphological and morphometric changes of pregnant women infected with SARS-CoV-2 (COVID-19 group) in comparison with the placentas of non-infected pregnant women, matched for maternal age and comorbidities, besides gestational age of delivery (Control group).

**Method:** The patients in the COVID-19 and the Control group were matched for maternal age, gestational age, and comorbidities. The morphological analysis of placentas was performed using Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement. The quantitative morphometric evaluation included perimeter diameter and number of tertiary villi, number of sprouts and knots, evaluation of deposition of villous fibrin, and deposition of intra-villous collagen I and III by Sirius Red. Additionally, Hofbauer cells (HC) were counted within villi by immunohistochemistry with CD68 marker.

**Results:** Compared to controls, symptomatic women in the COVID-19 group were more likely to have at least one comorbidity, to evolve to preterm labor and infant death, and to have positive SARS-CoV-2 RNA testing in their concepts. Compared to controls, placentas in the COVID-19 group were more likely to show features of maternal and

Julie Anne Chiste\*, Isabella Naomi Furuie, Meri Bordignon Nogueira, Jessica da Silva Longo, Cyllian Arias Fugaça, Barbara Maria Cavalli, Carolina Tanaka Dino, Sonia Mara Raboni, Narcizo Leopoldo Eduardo da Cunha Sobieray and Newton Sérgio de Carvalho

## SARS-CoV-2 in asymptomatic pregnant women in South Brazil: RT-PCR and serological detection

<https://doi.org/10.1515/jpm-2021-0173>

Received April 10, 2021; accepted May 26, 2021;  
published online June 10, 2021

### Abstract

**Objectives:** This study aims to detect the SARS-CoV-2 infection prevalence in asymptomatic pregnant women.

**Methods:** A group of 195 asymptomatic pregnant women who attended the prenatal care outclinic and to the obstetric emergency department was tested concomitantly for SARS-CoV-2 by RT-PCR and serological tests.

**Results:** The virus was detected by RT-PCR in two (1.02%) cases and 17 (8.71%) patients had antibodies detected by immunochromatographic tests.

**Conclusions:** Due to the high risk of this emerging infection in the health of pregnant women, fetuses and newborns, we suggest the universal screening of all pregnant women admitted to hospital through the combined method RT-PCR and serological.

**Keywords:** asymptomatic COVID-19; COVID-19; pregnancy; RT-PCR; SARS-CoV-2; serological antibodies.

\*Corresponding author: Julie Anne Chiste, Rua Saldanha da Gama, 86, apto 32A, Centro, Zip Code: 80060-170, Curitiba, Brazil; and Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil, Phone: +55 41 98870-1481, E-mail: julieext@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7875-4126>

Isabella Naomi Furuie, Jessica da Silva Longo, Cyllian Arias Fugaça and Narcizo Leopoldo Eduardo da Cunha Sobieray, Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

Meri Bordignon Nogueira, Virology Laboratory, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil; and Post Graduate Program in Gynecology and Obstetrics, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, Brazil

Barbara Maria Cavalli, Carolina Tanaka Dino and Sonia Mara Raboni, Virology Laboratory, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

Newton Sérgio de Carvalho, Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil; and Post Graduate Program in Gynecology and Obstetrics, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, Brazil

### Introduction

The severe acute respiratory syndrome caused by the new SARS-CoV-2 has victimized millions of people worldwide since the first case in China in December 2019. This virus is transmitted mainly via respiratory droplets when near an infected person, although the transmission can occur by asymptomatic carrier. Indeed, a systematic review suggested that the real asymptomatic transmission is uncommon, but the pre-symptomatic transmission as the major reason for its propagation [1].

There are few studies on aspects of viral infection in pregnant women, as well as the risk of vertical transmission, the fetal and neonatal compromises. However, reports have shown that pregnant and puerperal women are more susceptible for complications [2–4]. In this study we assessed the prevalence of SARS-CoV-2 infection in asymptomatic pregnant women.

### Materials and methods

This is a cohort study carried out from September to October 2020, at Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR), a tertiary care academic center in South Brazil. The Institutional Ethical Committee boarding reviewed and approved the study (CAAE: 35129820.6.0000.0096), and Informed Consent Term was signed by all participants. Pregnant women were included, randomly and voluntarily, at any gestational age, who attended the obstetrics emergency sector and the prenatal care out clinic of high-risk pregnancy. The patients were invited to participate in the research after consulting the prenatal appointment or while waiting for emergency care, and, above all, it is important to note that all participants selected from the emergency room had mild gestational complaints and were not in labor. The inclusion criteria were: pregnancy at any gestational age and the absence of COVID-19 symptoms as fever, sore throat, cough, coryza, headache, diarrhea, anosmia and ageusia. The exclusion criteria were the previous diagnosis of COVID-19 and the patient's refusal to participate. It was collected nasopharyngeal and oropharyngeal swabs for RT-PCR for SARS-CoV-2, and a serum specimen for serological tests. Samples were sent to the Virology Laboratory of the CHC-UFPR, which is certified by the health public laboratory of Paraná State, Brazil.

Detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal and oropharyngeal samples was performed by RT-PCR method targeting *ORF1ab* gene and *N* region gene. Viral RNA isolation was performed by using Biopur