UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

Jéssica Cristina Leme

**Expressão da Galectina-3 em células trofoblásticas de
placentas oriundas de gestantes infectadas pelo vírus Zika**

Ribeirão Preto – SP

2021

JÉSSICA CRISTINA LEME

**Expressão da Galectina-3 em células trofoblásticas de
placentas oriundas de gestantes infectadas pelo vírus Zika**

Versão corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho

RIBEIRÃO PRETO

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Versão corrigida. A versão original se encontra na secretaria do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Leme, Jéssica Cristina.

Expressão da Galectina-3 em células trofoblásticas de placentas oriundas de gestantes infectadas pelo vírus Zika. Ribeirão Preto, 2021.

64 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia.

Orientador: Ramalho, Fernando Silva.

1. Vírus Zika; 2.Placenta; 3. Células de Hofbauer; 4. Hiperplasia; 5. Galectina-3.

FOLHA DE APROVAÇÃO

LEME, JC. Expressão da Galectina -3 em células trofoblásticas de placentas oriundas de gestantes infectadas pelo vírus Zika.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

O presente trabalho foi desenvolvido no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, e teve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil” – CNPq (processo: 134131/2018-5).

AGRADECIMENTOS

Em nossa vida diária, devemos ver que não é a felicidade que nos faz agradecidos, mas a gratidão é que nos faz felizes.

Albert Clarke

A Deus pela vida e saúde, por me guiar e por sempre colocar pessoas boas no meu caminho.

Ao meu orientador Professor Dr. **Fernando Silva Ramalho**, por ter aceitado me orientar, pela paciência, conhecimentos transmitidos e disposição na execução desse trabalho. Agradeço por tudo que me ensinou!

À **Dra Leticia Apolinário Araújo** por ter iniciado esse trabalho, e executado a parte de coleta das placentas.

À Dra **Maraiza Gomes** pela companhia e por ter me recebido e ajudado no início do mestrado.

Aos integrantes do laboratório do Dr. Fernando e Dra. Leandra: **Dra. Marlei Augusto, Deisy Mara, Pedro Bonifácio e Laura Carvalho**, pelo companheirismo, risadas, convivência diária e pelos cafés! Dra. Marlei e Deisy obrigada por toda ajuda técnica na realização dos experimentos, pelo esforço e tentativas para que esse este trabalho pudesse ser concluído.

“Aos meus amigos do “Clã” **Raquel Pereira, Clara Kekis, Willian de Moura, Isabela Salvino, Mateus Salvino, Luana Grile, Pedro Salvino, Nathália Assunção e Jéssica Lavesso** pela “irmandade” e por serem meu ‘respiro’ fora da rotina acadêmica.

À **Kelly Barroso** pela amizade que iniciou na graduação e perdura até os dias atuais. Agradeço pela amizade e paciência diária para ouvir todas as minhas reclamações!

Ao meu amigo **Tiago Souza**, pelo incentivo diário que me dava no período que trabalhávamos no Hospital São Lucas para que eu procurasse algo na minha área. Foi o “empurrão” necessário para que eu saísse do comodismo.

A todos os meus familiares que mesmo com a correria diária, e com encontros poucos frequentes fazem parte da minha história.

A minha mãe, **Sueli Joaquim** por ser minha companheira, conselheira, e meu exemplo de vida. Obrigada por todo esforço e criação que me deu. Te amo!

A minha tia **Marli Joaquim**, por todo apoio, ajuda e incentivo mandado de longe, mas sempre presente na minha vida.

Aos funcionários e demais alunos do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP-USP por toda ajuda prestada no período do mestrado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que não mencionei, mas que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

RESUMO

LEME. Jéssica Cristina. Expressão da Galectina-3 em células trofoblásticas de placentas oriundas de gestantes infectadas pelo vírus Zika. 2021. 64 p. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Introdução: A Síndrome Congênita do vírus ZIKA (SCZ) resulta em graves anomalias fetais e ocorre por meio de infecção transplacentária. As células de Hofbauer (CH), como macrófagos residentes nas vilosidades placentárias, participam na defesa do feto contra patógenos, mas são permissivas à infecção pelo vírus ZIKA (VZIKA). A proteína galectina-3 (Gal-3) é uma lectina que se liga a estruturas contendo β -galactosídeos, e é capaz de modular processos inflamatórios. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de Gal-3 em placentas de gestantes infectadas e não infectadas pelo VZIKA. **Material e Métodos:** Foram analisadas 45 placentas, das quais 39 eram procedentes de gestantes comprovadamente infectadas pelo VZIKA durante a gestação. As amostras placentárias foram alocadas nos seguintes grupos: ZIKA – amostras oriundas de gestantes infectadas pelo VZIKA cujos neonatos não exibiram comprometimento encefálico; SCZ - amostras oriundas de gestantes infectadas pelo VZIKA cujos neonatos eram portadores de alterações encefálicas graves; Controle – amostras oriundas de gestantes não infectadas pelo VZIKA. As placentas foram investigadas quanto à expressão de Gal-3, quanto ao número e à atividade mitogênica das CH, e ainda quanto à infecção pelo VZIKA. **Resultados:** As placentas do grupo SCZ exibiram necrose coagulativa, edema de vilosidades e descolamento do trofoblasto viloso. Foi demonstrada hiperexpressão de Gal-3 nas células citotrofoblásticas das placentas do grupo SCZ, e co-localização do antígeno viral NS2B. Observou-se, ainda, hiperplasia de CH e exacerbada atividade proliferativa das células trofoblásticas e das CH. **Conclusão:** A Gal-3 é altamente expressa nas microvilosidades placentárias quando os neonatos exibem dano encefálico grave. A hiperplasia das CH é também mais intensa quando há comprometimento fetal grave. Tendo em vista que a Gal-3 exerce importante papel na amplificação da resposta inflamatória, e que CH infectadas podem atuar favorecendo a passagem de partículas virais através da barreira placentária, pode-se conjecturar uma provável relação entre

a hiperexpressão placentária de Gal-3, a hiperplasia das CH e uma maior gravidade da infecção fetal pelo VZIKA.

Palavras-chave: Vírus Zika; Placenta; Células de Hofbauer; Hiperplasia; Células trofoblásticas; Galectina-3

ABSTRACT

LEME. JC. Galectin-3 expression in trophoblastic cells of placentas from pregnant women infected by Zika virus. 2021. 64 p. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Introduction: Congenital Syndrome of Zika virus (CSZ) results in severe fetal abnormalities, and occurs through transplacental infection. Hofbauer cells (HBC), as macrophages residing in the placental villi, and also participate in the defense of the fetus against pathogens, but are permissive to infection by the ZIKA virus (ZIKV). The protein galectin-3 (Gal-3) is a lectin that binds to structures containing β -galactosides, and is capable of modulating inflammatory processes. The purpose of this work was to evaluate the expression of Gal-3 in placentas of pregnant women infected and not infected by ZIKV. **Material and Methods:** 45 placentas were analyzed, of which 39 were from pregnant women proven to be infected with ZIKV during pregnancy. Placental samples were allocated to the following groups: ZIKA - samples from pregnant women infected with ZIKV whose neonates did not exhibit brain damage; CSZ - samples from pregnant women infected with ZIKV whose neonates had brain changes; Control - placental samples from pregnant women not infected by ZIKV. Placentas were investigated for Gal-3 expression, for cell proliferative activity and HC number in placental microvilli, and for ZIKAV infection. **Results:** CSZ group placentas exhibited coagulative necrosis, villous edema and villous trophoblast detachment. Overexpression of Gal-3 was demonstrated in cytotrophoblastic cells from placentas of the CSZ group, and co-localization of the NS2B viral antigen. HBC hyperplasia and exacerbated proliferative activity of trophoblastic cells and HBC were also observed. **Conclusion:** Gal-3 is highly expressed in placental microvilli when there is concomitant severe fetal damage. HBC hyperplasia is more important when there is severe fetal impairment. Given that Gal-3 plays an important role in amplifying the inflammatory response, and infected HBC can favor the passage of viral particles through the placental barrier, it is possible to conjecture a probable association between the placental hyperexpression of Gal-3, the hyperplasia of HBC and a greater severity of fetal infection by ZIKV.

Keywords: Zika virus; Placenta; Hofbauer Cell; Hyperplasia; Trophoblastic cells; Galectin-3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cronologia do VZIKA.....	17
Figura 2. Vírion do Flavivírus	18
Figura 3. Ilustração da alteração do perímetro cefálico na microcefalia.....	20
Figura 4. Macroscopia da placenta humana.....	23
Figura 5. Esquema ilustrativo de uma vilosidade placentárias.....	25
Figura 6. Fotomicrografias da marcação dos anticorpos CD163 e Ki67	36
Figura 7. Fotomicrografias de amostras placentárias coradas com H&E.	37
Figura 8. Representação gráfica da avaliação quantitativa da população de CH	38
Figura 9. Representação gráfica da avaliação quantitativa da atividade mitótica nas populações de CH e de células trofoblásticas.....	39
Figura 10. Fotomicrografias com marcação para a proteína viral NSB2 e prtoeína Gal-3	40
Figura 11. Fotomicrografias e avaliação quantitativa da expressão de Gal-3 nas vilosidades placentárias e células trofoblásticas	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos primários empregados	29
Tabela 2. Dados clínicos das gestantes e dos neonatos	32

LISTA DE ABREVIATURAS

CH	Células de Hofbauer
CTB	Citotrofoblasto
Gal-3	Galectina 3
IFN- γ	Intérferon gama
IL-12	Interleucina - 12
IL-13	Interleucina - 13
IL-4	Interleucina - 4
PC	Perímetro Cefálico
RM	Ressonância Magnética
SCT	Sinciciotrofoblasto
SCZ	Síndrome Congênita
SGB	Síndrome de Guillain Barré
SNC	Sistema Nervoso Central
VZIKA	Vírus Zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 VÍRUS ZIKA – BREVE HISTÓRICO.....	16
1.2 ESTRUTURA E GENOMA VIRAL	17
1.3 TRANSMISSÃO E SINTOMATOLOGIA.....	18
1.4 INFECÇÃO CONGÊNITA	19
1.5 SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA (SCZ)	19
1.6 FORMAÇÃO DA PLACENTA.....	21
1.7 VILOSIDADES CORIÔNICAS	22
1.8 PLACENTA A TERMO	22
1.9 BARREIRA PLACENTÁRIA.....	23
1.10 MACRÓFAGOS PLACENTÁRIOS – CÉLULAS DE HOFBAUER.....	24
1.11 GALECTINA-3	25
2. JUSTIFICATIVA.....	27
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Aspectos éticos	29
4.2 Seleção das amostras placentárias	29
4.3 Avaliação Histopatológica	30
4.4 Avaliação Imuno-histoquímica.....	30
4.5 Quantificação de células positivas por imuno-histoquímica	31
4.6 Western Blotting.....	31
4.7 Ensaio de PCR em tempo real	32
4.8 Análise Estatística	33
5. RESULTADOS.....	34
Tabela 2. Dados clínicos das gestantes e dos neonatos.....	34
5.1 Análise histopatológica	37
5.2 Detecção do VZIKA nas amostras placentárias	37
5.3.1 Avaliação da população de CH nas vilosidades placentárias	38
5.3.2 Avaliação da proliferação das CH e das células trofoblásticas	39
5.3.3 Expressão da Galectina -3 nas vilosidades placentárias	40
6. DISCUSSÃO	42

7. CONCLUSÃO	46
8. REFERÊNCIAS.....	47
9. ANEXOS	
Parecer Comitê de Ética em Pesquisa.....	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 VÍRUS ZIKA – BREVE HISTÓRICO

A descoberta do vírus Zika (VZIKA) se deu ao acaso por um grupo de pesquisadores que investigavam o vírus da febre amarela na floresta Zika em Uganda. Em 1947 o vírus foi isolado do soro de macacos em cativeiro e no ano seguinte de mosquitos do gênero *Aedes* [1]. Após inoculações intracranianas em camundongos foi observada degeneração neuronal, infiltrado celular, e replicação viral em neurônios e células astrogliais demonstrando o neurotropismo do vírus pelo SNC [2,3].

A partir da década de 50, o VZIKA que antes circulava somente entre os primatas, passou a infectar humanos. Relatos esporádicos foram descritos no decorrer dos anos, porém, os casos eram restritos aos habitantes da África e da Ásia [4, 5, 6,7]. A partir de 2007 o vírus voltou a circular na Ilha de Yap, onde causou um surto que acometeu 73% da população [8]; em 2013 há registros do vírus na Polinésia Francesa [9], Ilha de Páscoa [10] e Nova Caledônia [11].

No Brasil em meados de 2015, a ocorrência de uma doença exantemática desconhecida semelhante a dengue se disseminou rapidamente entre os estados brasileiros tendo posteriormente a confirmação sorológica para o VZIKA. Autoridades brasileiras também relataram uma complicação neurológica associada à infecção pelo VZIKA em indivíduos adultos, a Síndrome de Guillain Barré (SGB) uma neuropatia autoimune [12,13].

Ainda em outubro de 2015 foi registrado o aumento exacerbado de recém-nascidos com microcefalia e também comprometimento neurológico, oftalmológico e auditivo [14]. A linha cronológica destes eventos pode ser observada na *Figura 1*. Um trabalho publicado em 2016 na revista *The Lancet* associou a microcefalia com a infecção materna pelo VZIKA em uma área epidêmica no Brasil [15]. Trabalhos posteriores também detectaram o genoma viral no líquido amniótico e IgM positiva no fluído cérebro espinhal de neonatos acometidos [16,17]

Entre 2015 e 2018, 17.041 casos suspeitos de infecção pelo VZIKA foram notificados no Brasil, sendo a maioria deles oriundos da região Nordeste do país. Em 2016, Ribeirão Preto e região notificaram 5.509 casos de gestantes supostamente infectadas pelo VZIKA [18, 19].

Figura 1. Cronologia do VZIKA - da descoberta até o surto de microcefalia no Brasil.

Fonte: do autor, 2020.

1.2 ESTRUTURA E GENOMA VIRAL

O VZIKA é um arbovírus que pertence à família *Flaviviridae* e também possui como membros os vírus da Dengue, Febre Amarela e Nilo Ocidental. Sua estrutura é formada por um capsídeo icosaédrico com 40 a 50 nm de diâmetro, com o genoma de RNA fita simples com aproximadamente 11kb, de polaridade positiva envolta por uma membrana lipídica [20].

O genoma viral é traduzido em uma poliproteína que possui três proteínas estruturais que compõem a partícula viral: a proteína C, que constitui o capsídeo viral e tem a função de empacotar o RNA genômico; e duas proteínas que constituem o envelope: prM (pré-membrana) e E (envelope) responsáveis pela ancoragem, penetração e disseminação do vírus na célula. Possui também sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) que participam da replicação, expressão viral, e patogenicidade, conforme demonstrado na *Figura 2* [21,22].

O VZIKA possui duas linhagens circulantes a africana e asiática. A cepa africana não está associada à malformação do SNC e estudos apontaram

similaridade da cepa que circulou no Brasil com a cepa da Polinésia Francesa em 2013 [23,24].

Figura 2. Vírion do Flavivírus contendo o RNA genômico e poliproteínas constituídas por proteínas estruturais (C, M, E) e não-estruturais (NS1 a NS5). Fonte: Paz, 2018 [25].

1.3 TRANSMISSÃO E SINTOMATOLOGIA

A transmissão do VZIKA ocorre através da picada do mosquito *Aedes aegypti* [26] por via sexual [27] e transplacentária [28]. Porém, há evidências da persistência do VZIKA no trato genital feminino [29] e em outros fluidos como o leite materno [30] e a urina [31].

A infecção causada pelo VZIKA é na maioria das vezes assintomática (80% dos casos) e quando sintomática geralmente é acompanhada de sintomas como febre baixa, eritema, dor de cabeça e conjuntivite não purulenta com duração de 3 a 12 dias. O vírus acomete todas as idades porém, é mais prevalente no sexo feminino [32].

Complicações neurológicas associadas a síndromes também podem ocorrer. É o caso da SGB que acomete indivíduos adultos, trata-se de um distúrbio autoimune que afeta os nervos periféricos [33]. Ainda no período intrauterino o VZIKA pode ser transmitido ao feto e causar a Síndrome Congênita do Zika (SCZ), que é caracterizada pela malformação das estruturas crânio encefálica, articulares além de limitações oculares e auditivas [34].

1.4 INFECÇÃO CONGÊNITA

Infecções maternas transmitidas ao feto no período gestacional são denominadas de Infecções Congênitas e são causa frequente de morbidade e anomalias fetais em países de baixa renda [35, 36].

Os vírus que causam infecções verticais descritos na literatura formam um grupo representado pelo acrônimo Z-TORCH e abrange os agentes etiológicos seguintes: *Toxoplasma gondii*, Outros (*Parvovírus B19*, *Varicella-Zoster*, *Treponema pallidum*, vírus da *Hepatite B*), *Rubeolla virus*, *Citomegalovírus* e vírus *Herpes Simplex* [37].

A transmissão do patógeno durante o período intrauterino ocorre por duas vias: pela corrente sanguínea materna (via hematogênica), infectando a decídua e as vilosidades coriônicas; e por via vaginal (via ascendente), resultando em infecção do âmnio, cório e cordão umbilical [38].

A transmissão materno-fetal pode ocorrer em qualquer período da idade gestacional, porém, as que ocorrem no primeiro trimestre são mais susceptíveis a causar anomalias interruptivas feto, pois é o período de organogênese fetal e baixa tolerância do sistema imune materno [39].

No caso da infecção congênita pelo VZIKA, a confirmação da transmissão transplacentária no Brasil ocorreu após registros de achados de RNA viral na placenta e feto; as evidências também demonstraram a infecção nos trofoblastos e no endotélio fetal resultante da transferência da viremia materna para a circulação do fetal [40,41]. O líquido amniótico de duas gestantes na Paraíba também foi positivo para o VZIKA, e o exame ultrassonográfico detectou microcefalia fetal [42].

1.5 SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA (SCZ)

A SCZ é caracterizada por anomalias congênitas no feto, decorrentes da infecção transplacentária pelo VZIKA. Podem ser subdivididas em alterações estruturais, que incluem anomalias morfológicas cranianas e do sistema nervoso central, além de anomalias oculares e contraturas congênitas; já as alterações funcionais, estão relacionadas com o comprometimento do desenvolvimento neurológico infantil [43].

Dentre as alterações cranianas, a microcefalia é a manifestação mais marcante da infecção fetal pelo VZIKA. A OMS traz como definição uma malformação congênita do crânio com desenvolvimento cerebral inadequado, sendo classificada como leve ou grave. A microcefalia leve é caracterizada pelo perímetro cefálico (PC) inferior a 2 desvios-padrão abaixo da média para idade gestacional e sexo, enquanto que o PC inferior a 3 desvios-padrão é considerado como microcefalia grave [44]. *Ilustrado na figura 3.*

Figura 3. Ilustração da alteração do perímetro cefálico na microcefalia. Fonte: Adaptado de <https://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/portuguese/microcephaly.html>. Acesso em 08/12/2020 [45].

O diagnóstico das alterações cranianas é feito durante o pré-natal por meio da ultrassonografia, e também é possível identificar atrofia parenquimatosa, ventriculomegalia, calcificações, agenesia/hipoplasia do corpo caloso, aplasia/hipoplasia cerebelar e do tronco cerebral [46]. Além desses achados, a literatura também descreve o comprometimento da medula espinhal com distorção da arquitetura, perda neuronal severa e microcalcificações [47]. A ressonância magnética fetal (RMF) também é um exame diagnóstico auxiliar e pode identificar malformações do desenvolvimento cortical, e alterações na substância branca [48,49].

Anomalias oculares como microftalmia, coloboma, cataratas, e calcificações intraoculares também pode se manifestar nos recém-nascidos infectados pelo VZIKA. Freitas e colaboradores analisaram 29 pacientes com

microcefalia, e dez deles apresentaram lesões oculares, sendo as mais comuns manchas pigmentares focais e atrofia coriorretiniana. A patogênese das lesões oculares é desconhecida, mas acredita-se que pode ser devido ao dano celular direto pelo ZIKV ou sequelas inflamatórias [50,43].

1.6 FORMAÇÃO DA PLACENTA

A placenta é um órgão composto de tecido maternos e fetais, sendo responsável pela nutrição e proteção do embrião, além de ser também uma barreira física e imunológica ao feto contra infecções. A placenta começa a se formar após a implantação do blastocisto na parede uterina. A massa interna do blastocisto dará origem ao embrião, enquanto a massa externa (trofoblasto) sofre proliferação celular e se diferencia em sinciotrofoblasto (SCT) e citotrofoblasto (CTB) [51, 52].

O SCT constitui a camada celular externa e ininterrupta do trofoblasto, que fica contato direto com o sangue materno. Essas células, cujo citoplasma é levemente basofílico e homogêneo, são multinucleadas, e recobrem a superfície das vilosidades e medeiam a troca de nutrientes, gases, excretas e a transferência de IgG do sangue materno para a circulação fetal [53,55]. O SCT ainda é responsável por formar as lacunas no endométrio que rompem vasos sanguíneos e extravasam o sangue materno para o espaço intervilloso. Ao final desse processo, por volta da 12ª semana de gestação, é estabelecida a circulação placentária, que assumirá a nutrição fetal até o término de seu desenvolvimento [51,52].

As células citotrofoblásticas, também chamadas de células de Langhans, possuem formato ovóide com bordas celulares bem definidas e núcleos grandes; o citoplasma é abundante e basofílico, e figuras de mitoses podem ser encontradas. Nos meses iniciais da gestação, o CTB é caracterizado por uma camada celular contínua localizada abaixo do SCT que, com o progresso da gestação, se funde ao SCT, tornando-se reduzidas em número na gestação a termo [53,54]. Eventualmente, essas células podem sofrer infecção viral, como demonstrado por estudos *in vitro* com o citomegalovírus e o VZIKA. Nesses casos, devido a localização, o acesso do vírus às células estromais, como macrófagos e células endoteliais, é bastante favorecido [55,56].

1.7 VILOSIDADES CORIÔNICAS

As vilosidades coriônicas correspondem à parte fetal da placenta e são projeções ramificadas que invadem o endométrio, e se desenvolvem oito dias após a concepção. Externamente é composta pelo SCT e na camada adjacente comporta as células do citotrofoblasto, seguido pelo estroma das vilosidades composto por fibroblastos, macrófagos placentários (células de Hofbauer) e capilares sanguíneos fetais [52].

As vilosidades são descritas e classificadas de acordo com aparência, calibre e presença de vascularização fetal. As **vilosidades primárias** surgem no início da terceira semana e são compostas apenas pelo cerne citotrofoblástico recoberto pela camada sincicial; a **vilosidade secundária** é formada a partir das células mesodérmicas que penetram no cerne das vilosidades primárias e crescem em direção à decídua. Ao término da terceira semana, as células mesodérmicas da vilosidade se diferenciam em pequenos vasos e células sanguíneas, formando a **vilosidade terciária** e estabelecendo a circulação embrionária, que com a contração do coração fetal na quarta semana, disponibilizam nutrientes e oxigênio ao embrião. As vilosidades que se estendem da placa coriônica até a decídua basal são denominadas *vilosidades de ancoragem ou troncos vilosos*, enquanto as vilosidades que se ramificam nas laterais dos troncos vilosos são chamadas de *vilosidades terminais* [53].

1.8 PLACENTA A TERMO

“Termo” corresponde à idade gestacional ideal para o parto e equivale a 37- 42 semanas de gestação. A placenta a termo tem formato discóide, com diâmetro de cerca de 22 cm, espessura de 2,5 cm e um peso médio variável de 470 gramas. Macroscopicamente, quando vista do lado materno, é possível visualizar os cotilédones que possuem de 15 a 20 áreas salientes recobertas por uma camada fina de decídua basal. A superfície fetal da placenta é completamente recoberta pela membrana coriônica e ligada ao cordão umbilical [53] (Fig. 4).

Histologicamente é possível observar, em placentas maduras, a prevalência de vilosidades terminais, com uma camada de SCT descontínua e fina, e a presença de nós sinciciais (agregados de núcleos sinciciais na superfície das vilosidades terminais) [52].

Figura 4. Macroscopia da placenta humana. (A) Placa Coriônica (face fetal), onde é possível observar a superfície da membrana amniocoriônica e a inserção do cordão umbilical. (B) Placa basal (face materna) dividida em septos placentários (cotilédones).

Fonte: Adaptado de Baergen, 2011 [53].

1.9 BARREIRA PLACENTÁRIA

A barreira placentária separa o sangue materno e fetal, protegendo o feto contra possíveis patógenos. É constituída pelas camadas do SCT, CTB, tecido conjuntivo da vilosidade e o endotélio vascular. A partir do quarto mês, a membrana placentária torna-se mais delgada, e o revestimento endotelial dos vasos estabelece contato íntimo com a membrana sincicial. O mecanismo pelo qual alguns patógenos ultrapassam a barreira placentária e infectam o feto ainda durante o primeiro trimestre ainda não está completamente esclarecido. Entretanto, alguns autores como Coyne & Lazear sugeriram algumas opções de vias para transmissão de agentes infecciosos para o feto: 1- tráfego de células imunes maternas infectadas através da barreira placentária; 2- transporte paracelular ou transcelular; 3- infecção direta do sinciciotrofoblasto; 4- infecção de células endoteliais, trofoblasto extraviloso ou células

permissivas, como os macrófagos placentários (células de Hofbauer) [57,58,59].

1.10 MACRÓFAGOS PLACENTÁRIOS – CÉLULAS DE HOFBAUER

Os macrófagos desempenham papéis importantes na implantação do embrião, na placentação, na manutenção da gravidez e no parto. A função exercida pelos macrófagos é influenciada pela sinalização do microambiente, podendo sofrer alternância entre o fenótipo M1 (pró-inflamatório), quando participa na indução de “ambientes inflamatórios” (p.ex. na implantação do embrião e no parto); e o fenótipo M2 (anti-inflamatório), quando atua após o processo de placentação impedindo a rejeição do embrião [60,61].

As células de Hofbauer (CH) são macrófagos de origem fetal e residentes na placenta. Surgem no estroma da vilosidade coriônica no 18º dia de gestação, próximos às células trofoblásticas e aos capilares fetais, onde permanecem até o termo [62]. É uma célula vacuolizada, com grânulos intracitoplasmáticos e vesículas pinocíticas, com a função de fagocitar restos apoptóticos. Trata-se de uma célula classificada como macrófago M2 (anti-inflamatório), dotada de elevada capacidade migratória. Em resposta a um agente infeccioso, CH podem também secretar citocinas ou mediadores pró-inflamatórios capazes de danificar a barreira placentária, mas não há evidências que estas células possam alternar para o fenótipo M1 [63].

As CH das placentas a termo expressam marcadores de superfície, como CD163, DC-SIGN e CD209. Também participam na angiogênese e na secreção de proteínas que regulam a ramificação vilosa [61]. Estas células se demonstraram permissivas a certos tipos de vírus, como o citomegalovírus e o herpes simplex, transformando-as num reservatório para a infecção [62].

Figura 5. Esquema ilustrativo de uma vilosidade placentária e de seus componentes. Fonte: Adaptado de Quicke e colaboradores [56].

1.11 GALECTINA-3

A galectina-3 (Gal-3) é uma das 15 proteínas da família das lectinas endógenas que, através de seu domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) composto por cerca de 130 aminoácidos, se liga a estruturas que contém β -galactosídeos. É classificada como uma proteína quimera, relativamente pequena, com peso molecular de 35 kDa e com capacidade de formar oligômeros. É codificada pelo gene humano LGALS3, localizado no cromossomo 14, locus q21-22 [64].

Esta proteína é expressa abundantemente em tecidos humanos, células imunes, epiteliais, endoteliais e neurônios sensoriais. Sua localização na célula é ubíqua, podendo ser detectada tanto no interior da célula (citoplasma e núcleo), quanto extracelularmente (superfície celular). Esta versatilidade justifica a participação desta molécula em diversos processos biológicos, como embriogênese, adesão e migração celular, angiogênese e inflamação; além de

processos patológicos como infecções virais, bacterianas e neoplasias [65, 66, 67].

Nos processos inflamatórios, Gal-3 atua na imunidade inata/adaptativa, sendo expressa em macrófagos M1 e M2. A ativação dos macrófagos pode ocorrer por duas vias: quando por via clássica, se dá por meio de agentes microbianos e/ou citocinas Th1, como IFN- γ ou IL-12; ou pela via alternativa, quando são estimulados por citocinas Th2, como IL-4 ou IL-13. Por se tratar de uma proteína de elevada plasticidade, há evidências de que a Gal-3 seja capaz de ativar macrófagos por meio de ambas as vias [68, 69, 70, 71].

Tendo em vista seu papel pró-inflamatório, constatou-se que Gal-3 atua como molécula quimioatraente para monócitos e macrófagos, além de favorecer a explosão respiratória em neutrófilos e monócitos [72]. Também foi descrito que em modelos *in vivo* de colite aguda, há ativação do inflamassoma NLRP3 e secreção de IL-1 β por macrófagos [73].

Foram detectados níveis elevados desta proteína no soro e no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide, sugerindo que esta molécula possa ser utilizada como um marcador inflamatório [74].

Na placenta, é possível detectar Gal-3 nas células trofoblásticas do blastocisto [75], nas células da notocorda [76], nas vilosidades coriônicas e na decídua do terceiro trimestre, conforme demonstrado em estudos *in vitro* [77]. Nos casos de aborto espontâneo, a hiperexpressão de Gal-3 pelas células trofoblásticas resulta em apoptose das células endometriais, causando desenvolvimento anormal do endométrio e das vilosidades coriônicas [78, 79].

Em relação à participação da Gal-3 em processos infecciosos virais, sabe-se que essa lectina é capaz de se interagir às proteínas glicosiladas do envelope viral, como demonstrado Wang e colaboradores num estudo com o HIV-1 [80]. Adicionalmente, foi demonstrada hiperexpressão de Gal-3 em cultivo de células Molt-3 infectadas pelo HIV-1 [81]. O gene regulatório Tat, encontrado nas partículas do HIV-1, atua diretamente na indução da hipersecreção de Gal-3 pelas células Molt-3 em cultivo [82].

2. JUSTIFICATIVA

A Síndrome Congênita causada pelo vírus Zika representa uma grave complicação para os fetos acometidos, pois geralmente implica em defeitos morfológicos de elevada morbidade e/ou mortalidade.

Uma possível falha da função protetora da placenta justifica uma abordagem detalhada desse órgão com o objetivo de se identificar fatores responsáveis por uma maior complacência placentária à transmissão viral.

Considerando que as CH e as células citotrofoblásticas são susceptíveis à infecção pelo VZIKA, e que certos vírus possuem a capacidade de induzir a expressão de Gal-3 exacerbando o processo inflamatório, investigamos a possível participação desta molécula na infecção placentária, e analisamos sua expressão em placentas de gestantes infectadas e não infectadas pelo VZIKA.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a expressão da proteína Gal-3 em placentas oriundas de gestantes infectadas pelo vírus ZIKA e de gestantes infectadas pelo vírus ZIKA cujos neonatos exibiram a SCZ.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever as alterações histopatológicas placentárias decorrentes da infecção da gestante pelo vírus ZIKA.
2. Comparar o número e a atividade proliferativa das CH em placentas controle, em placentas infectadas pelo VZIKA e em placentas de gestantes cujos conceptos exibiram alterações encefálicas secundárias à infecção pelo VZIKA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este estudo obteve aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo (processo nº 7.404/2016).

4.2 Seleção das amostras placentárias

As amostras placentárias foram obtidas junto ao Centro Obstétrico do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, e alocadas em três grupos de acordo com os seguintes critérios:

- **Grupo controle [n=6]:** placentas de gestantes sem histórico de infecção pelo VZIKA durante a gestação e sem achados macro ou microscópicos de anormalidade;
- **Grupo Zika [n=24]:** placentas de gestantes comprovadamente infectadas pelo VZIKA (PCR positivo no sangue, urina ou líquido amniótico), e cujos conceitos não exibiram comprometimento encefálico ao exame por imagem.
- **Grupo SCZ [n=15]:** placentas de gestantes comprovadamente infectadas pelo VZIKA (PCR positivo no sangue, urina ou líquido amniótico), cujos fetos exibiram alterações encefálicas documentadas por meio de ressonância nuclear magnética fetal. Como critérios de inclusão, foram adotadas duas ou mais das seguintes alterações encefálicas: microcefalia, dilatação ventricular, calcificações intracerebrais, alterações da substância branca ou do desenvolvimento cortical cerebral.

4.3 Avaliação Histopatológica

As placentas foram fotografadas e amostradas imediatamente após o parto, sendo em seguida fixadas em formol tamponado por 48 horas. Após processamento de rotina, as amostras foram incluídas em parafina, cortadas com 4µm de espessura e coradas em hematoxilina e eosina (H&E). Na sequência, os cortes histológicos foram avaliados por microscopia óptica.

4.4 Avaliação Imuno-histoquímica

Foi analisada a expressão placentária das seguintes proteínas: Ki67 (marcador de proliferação celular), CD163 (marcador de superfície de macrófagos M2), ZIKAV e Galectina-3. Informações detalhadas sobre os anticorpos primários empregados estão disponíveis na *tabela 1*.

Os cortes foram colocados em lâminas silanizadas, desparafinizadas em solução de xilol e reidratadas em solução seriada de etanol. Os cortes foram imersos em tampão citrato (10 mmol/L, pH 6.0) e submetidas a recuperação antigênica em vapor d'água por 40 minutos. O bloqueio da peroxidase foi feito com peróxido de hidrogênio 3%. O bloqueio da proteína foi realizado em solução de bloqueio (Spring Bioscience,) por 10 minutos. As seções teciduais foram, então, incubadas com anticorpos primários durante uma hora à temperatura ambiente em câmara úmida. Os anticorpos primários utilizados e sua respectiva diluição encontram-se descritos na tabela 1 (abaixo).

Após lavagens em tampão salina-fosfato (PBS), foi aplicado o anticorpo secundário anti-camundongo (Kit Reveal Complemento, Spring Bioscience) por 10 minutos. Na sequência, as lâminas foram incubadas por 15 minutos com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado ao HRP (Kit Reveal HRP Conjugado, Spring Bioscience) e coradas por 5 minutos com 3,3-diaminobenzidina-tetrahydrocloridro (DAB) (Spring Bioscience). Hematoxilina de Mayer foi empregada como contra coloração. As lâminas foram desidratadas e montadas com PermOUNT (Fischer Scientific, Fairlawn, NJ, E.U.A.).

Tabela 1: Anticorpos primários empregados

ANTICORPO	DILUIÇÃO	TIPO	FORNECEDOR	CLONE	MARCAÇÃO
ANTI-KI67	1:200	Rabbit - monoclonal	Diagnostic ByoSystems	SP6	nuclear
ANTI-CD163	1:200	Mouse - monoclonal	Novocastra	10D6	citoplasmática
ANTI- GALECTINA-3	1:100	Mouse - monoclonal	Thermo Fisher	A3A12	nuclear ou citoplasmática
ANTI-ZIKAV	1:200	Rabbit - Policlonal	Genetex		nuclear ou citoplasmática

4.5 Quantificação de células positivas por imuno-histoquímica

A expressão de cada marcador foi analisada aleatoriamente em 20 campos microscópicos (aumento de 400x). O número de células positivas foi quantificado mediante a positividade nuclear ou citoplasmática, com auxílio do software ImageJ (N.I.H., E.U.A.).

4.6 Western Blotting

Fragmentos de tecidos placentários inicialmente estocados a -80°C foram cortados (100mg) e homogeneizados em 500µl de tampão de lise com inibidores de proteases. As suspensões foram incubadas em gelo por 15 min e centrifugadas a 10.000 rpm a 4 °C por 20 min. O sobrenadante foi aliquoteado e armazenado a -80°C, e o método colorimétrico de Bradford foi utilizado para mensurar a concentração da proteína. Em seguida, 40µl de proteínas foram submetidos a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e transferidas para uma membrana de PVDF (Amersham Biosciences). Após transferência, a membrana foi incubada em solução bloqueio, TBS (pH 7,4) contendo 0,05% Tween 20 (Sigma) e 5% de leite desnatado por duas horas em temperatura ambiente. A marcação com anticorpo primário monoclonal anti-Galectina 3 (A3A12), foi “overnight” à 4°C, na diluição 1:500 e GAPDH (GA1R) usado como

controle interno, na diluição 1:1000, ambos da Thermo Fisher. Para o anticorpo secundário foi utilizada a diluição 1:2000 em TBS (pH 7,4) contendo 0,05% Tween 20 (Sigma) e 5 % de leite desnatado, incubado por uma hora.

Entre as incubações das membranas, foram realizados três ciclos de lavagem com TBS contendo 0,05% de Tween 20. SignalFire™ ECL Reagent (6883S) Cell Signaling technology®, foi o reagente revelador do sinal quimioluminescente. As imagens foram fotografadas em câmara CCD, equipamento ChemiDoc™ XRS®, BioRad.

4.7 Ensaio de PCR em tempo real

Amostras placentárias coletadas e congeladas em solução de RNA Later (R0901-Sigma) foram utilizadas para a quantificação da expressão gênica do gene NS5 do genoma do VZIKA. Os fragmentos teciduais foram homogeneizados e submetidos à extração do RNA total utilizando kit específico (RNeasy Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Alemanha). Na sequência, o DNA complementar foi obtido por transcrição reversa a partir de 1 µg de RNA total utilizando kit de retro-transcrição (Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads e pd(N)6 Random Hexamer, Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ, EUA). A amplificação gênica com simultânea quantificação foi realizada por meio do Sistema PCR “real-time” StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando-se primers específicos para o gene NS5 do VZIKA (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems), e a enzima Taq Polimerase (TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG -2X, Applied Biosystems,). O método ΔCT foi utilizado para a análise das diferenças entre as amostras, e o gene GAPDH foi utilizado como controle interno.

4.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, CA, EUA). Todos os dados foram descritos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). As comparações estatísticas foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal–Wallis seguido pelo teste de Mann–Whitney para as variáveis quantitativas, enquanto para as variáveis qualitativas foi empregado o teste Qui-quadrado de Pearson. Valores de probabilidade menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

Tabela 2. Dados clínicos das gestantes e dos neonatos

	Controle n= 6	Zika n= 24	SCZ n= 15	p
DADOS MATERNOS				
Idade materna (anos)	28,0 ± 2,1	27,6 ± 1,5	26,7 ± 1,7	0,858
Primigesta	3 (50) ^a	03 (13) ^b	01 (7) ^b	< 0,001 ^{a,b} 0,075 ^b
Secundigesta	1 (17) ^a	07 (29) ^b	03 (20) ^b	
+ 2 gestações	2 (33) ^a	14 (58) ^b	11 (73) ^b	
Parto vaginal	1 (17) ^a	20 (83) ^b	13 (87) ^b	< 0,001 ^{a,b} 0,553 ^b
Parto cesariano	5 (83) ^a	4 (17) ^b	2 (13) ^b	
<u>Infecção viral (PCR+)</u>				
1º trimestre	-	11 (46)	12 (80)	< 0,001
2º trimestre	-	10 (42)	2 (13)	
Não relatado	-	3 (12)	1 (07)	
DADOS DOS RECÉM-NASCIDOS				
Idade gestacional (semanas)	38,6 ± 0,4	38,9 ± 0,5	39,0 ± 0,6	0,932
Peso ao nascimento (g)	2.806 ± 268	3.033 ± 165	2.693 ± 276	0,498
Masculino	1 (17) ^a	09 (38) ^b	6 (40) ^b	0,001 ^{a,b} 0,557 ^b
Feminino	5 (83) ^a	15 (62) ^b	8 (53) ^b	
Não relatado	-	-	1 (07)	
Apgar 5º min ≥8	6 (100) ^a	22 (92) ^b	13 (87) ^c	0,007 ^{a,b} 0,027 ^{b,c}
Apgar 5º min <8	0 ^a	02 (08) ^b	1 (7) ^c	
Natimorto	0 ^a	0 ^b	1 (7) ^c	
<u>Alterações encefálicas (RNM fetal)</u>				
Microcefalia	-	-	9 (60)	
Calcificações intracerebrais	-	-	9 (60)	
Dilatação ventricular	-	-	9 (60)	
Malformações múltiplas	-	-	2 (13)	
Alterações do desenvolvimento cortical	-	-	2 (13)	
Alterações da substância branca	-	-	3 (20)	

*Dados apresentados como número de casos (%) ou média ± erro padrão da média

A idade materna média foi de 28 anos no grupo Controle, 27 anos no grupo Zika e 26 anos no grupo SCZ, não sendo observada diferença entre elas. Quanto ao número de partos, no grupo Controle foi observado maior percentual de primigestas ($p < 0,001$), enquanto nos demais grupos houve maior percentual de mulheres com mais de duas gestações. Também foram observadas diferenças significativas quanto ao tipo de parto. O percentual de cesarianas foi maior no grupo Controle, enquanto nos demais grupos o parto vaginal foi mais frequente.

Em relação ao momento da infecção viral materna, 80% das gestantes do grupo SCZ foram infectadas durante o primeiro trimestre gestacional, enquanto no grupo Zika esse percentual foi significativamente menor, apenas 46% ($p < 0,001$). A infecção viral em todos os casos foi confirmada por PCR, seja em amostras de sangue, urina ou líquido amniótico.

Quanto aos recém-nascidos, a idade gestacional e o peso ao nascimento médio em todos os grupos foram superiores a 37 semanas e 2.600g, respectivamente, não sendo observada diferença significativa entre eles. No grupo Controle, houve maior número de recém-nascidos do sexo feminino, enquanto nos demais grupos houve predomínio do sexo masculino. Quanto à vitalidade do neonato ao nascimento (escala de Apgar), foram observadas diferenças significativas entre todos os grupos. Os neonatos relacionados ao grupo SCZ exibiram piores índices de Apgar, seguido pelos neonatos relacionados ao grupo Zika.

Foram confirmados 14 neonatos e um natimorto com alterações encefálicas à ressonância magnética fetal. A tríade “microcefalia, dilatação ventricular e calcificações intracerebrais” corresponde ao conjunto de deformidades mais frequentes, interessando 60% dos casos. Múltiplas malformações foram detectadas no natimorto e em um neonato.

Figura 6. Fotomicrografias representativas de amostras placentárias oriundas dos grupos Controle (A, B), Zika (C, D) e SCZ (E, F) submetidas à imunomarcaço para as protenas CD163 (A, C, E) e Ki67 (B, D, F). As imagens revelam elevada populao de CH nas amostras placentrias provenientes dos grupos Zika (C) e SCZ (E), cujas atividades mitticas so tambm intensas (D, F).

5.1 Análise histopatológica

O exame histopatológico das placentas identificou focos de edema, descolamento do epitélio trofoblástico e necrose coagulativa das vilosidades, os quais se apresentavam mais frequentes nas amostras pertencentes ao grupo SCZ (Fig. 7).

Figura 7. Fotomicrografias representativas de amostras placentárias oriundas dos grupos Controle (A) e SCZ (B e C). São observadas nas imagens áreas com edema viloso (*) e com necrose coagulativa interessando toda a extensão da vilosidade placentária (círculos). (H&E; A, B – aumento 400x; C – aumento 100x).

5.2 Detecção do VZIKA nas amostras placentárias

A identificação do genoma e de antígeno do VZIKA nas amostras placentárias foi realizada por meio de RT-PCR e de reação imuno-histoquímica para a proteína NS2B, respectivamente. O genoma viral foi detectado em apenas duas amostras placentárias (5% dos casos), uma delas correspondente ao feto natimorto. Da mesma forma, houve identificação do antígeno viral NS2B no interior de células do citotrofoblasto intraviloso apenas nos dois casos em que o genoma do VZIKA havia sido detectado (Fig. 10A).

5.3 Análise Imuno-histoquímica

5.3.1 Avaliação da população de CH nas vilosidades placentárias

A população de CH foi estimada por meio da expressão da proteína CD163, a qual identifica macrófagos de fenótipo M2 (Fig. 6). A quantificação de células CD163 positivas nas vilosidades evidenciou um aumento significativo do número de CH nas amostras do grupo SCZ ($7,6 \pm 1,2$) em comparação às amostras do grupo Controle ($3,7 \pm 0,8$) ($p = 0,021$). Entretanto, embora o número médio de CH nas amostras do grupo Zika ($6,1 \pm 3,0$) tenha sido superior à média de CH do grupo Controle ($3,7 \pm 0,8$), a diferença não foi estatisticamente

significativa ($p = 0,058$) (Figs. 6 e 8).

Figura 8. Representação gráfica da avaliação quantitativa da população de CH placentas oriundas de gestantes infectadas pelo VZIKA, nas placentas de gestantes infectadas pelo VZIKA cujos neonatos exibiram a SCZ, e nas placentas controle. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M. * $p < 0,05$ - SCZ x Controle.

5.3.2 Avaliação da proliferação das CH e das células trofoblásticas

A atividade mitótica das populações de CH e de células trofoblásticas foi mensurada por meio da imunomarcção nuclear para a proteína Ki67, a qual identifica todas as células engajadas no processo proliferativo, independentemente da fase do ciclo celular (Fig. 6).

Constatou-se um maior número de células em proliferação, tanto CH quanto células trofoblásticas, nas amostras dos grupos Zika ($2,3 \pm 0,2$ e $0,52 \pm 0,09$) e SCZ ($2,6 \pm 0,5$ e $0,53 \pm 0,16$) em comparação às amostras do grupo Controle ($0,8 \pm 0,30$ e $0,08 \pm 0,05$, respectivamente). No entanto, não foi observada diferença significativa na

atividade proliferativa celular entre as placentas pertencentes aos grupos Zika e SCZ (Fig. 6 e 9).

Figura 9. Representação gráfica da avaliação quantitativa da atividade mitótica nas populações de CH e de células trofoblásticas nas placentas oriundas de gestantes infectadas pelo VZIKA, nas placentas de gestantes infectadas pelo VZIKA cujos neonatos exibiram a SCZ, e nas placentas controle. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M. * $p < 0,05$ - SCZ x Controle e Zika x Controle.

5.3.3 Expressão da Galectina -3 nas vilosidades placentárias

A proteína Gal-3 se expressou abundantemente no citoplasma e no núcleo das células citotrofoblásticas das vilosidades placentárias do grupo SCZ

Figura 10. Fotomicrografias representativas de amostras placentárias provenientes do grupo SCZ submetidas à imunomarcagem para a proteína viral NS2B (A) e para a proteína Gal-3 (B). Observa-se, nas imagens, que tanto o antígeno viral NS2B quanto a proteína Gal-3 foram identificados na camada de células citotrofoblásticas das vilosidades placentárias (aumento 1.000x).

(Fig. 10B).

A análise quantitativa da população de células citotrofoblásticas imunomarcadas para a Gal-3 demonstrou um número significativamente maior dessas células nas amostras placentárias do grupo SCZ ($1,9 \pm 0,1$) ($p < 0,05$) em comparação às amostras dos grupos Zika ($1,5 \pm 0,1$) e Controle ($1,2 \pm 0,2$) (Fig. 11A–D). Não foi observada diferença no número de células Gal-3 positivas entre as amostras placentárias dos grupos Zika e Controle ($p = 0,62$) (Fig. 11A, B, D).

Figura 11. Fotomicrografias representativas de amostras placentárias oriundas dos grupos Controle (A), Zika (B) e SCZ (C) submetidas à imunomarcação para a proteína Gal-3 (aumento 400x). (D) Representação gráfica da avaliação quantitativa do número de células trofoblásticas Gal-3 positivas nas placentas oriundas dos grupos Controle, Zika e SCZ. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M. * $p < 0,05$ - SCZ x Controle; # $p < 0,05$ - SCZ x Zika. (E) Representação das bandas proteicas de Gal-3 e de GAPDH obtidas por Western Blotting de amostras placentárias provenientes dos grupos Controle, Zika e SCZ.

A mensuração, por Western Blotting, dos níveis placentários da proteína Gal-3 revelou maior expressão nas amostras do grupo SCZ em comparação às amostras dos grupos Zika e Controle, confirmando os achados imuno-histoquímicos (Fig. 11E).

6. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou uma possível participação da proteína Gal-3 na atividade inflamatória em placentas provenientes de gestantes infectadas pelo VZKA, cujos neonatos apresentaram ou não comprometimento encefálico. Acreditamos que nossos achados possam agregar importantes informações a respeito da transmissão transplacentária desse vírus.

Em nossa casuística, observamos que o efeito abortivo sobre o feto foi raro, uma vez que na imensa maioria dos casos não foram observadas intercorrências gestacionais até o termo. Os neonatos apresentaram peso ao nascimento e índices de Apgar normais na maioria dos casos. Por outro lado, o dano encefálico induzido pelo VZKA foi extremamente grave. Microcefalia associada a calcificações intracerebrais e dilatação ventricular foram as alterações encefálicas mais observadas (60% dos casos), as quais têm sido amplamente relatadas na literatura [83, 84, 85]. Foi demonstrado por estudos *in vivo* que o VZKA causa apoptose das células progenitoras neurais [86], e por estudos *in vitro* que o vírus é capaz de limitar o desenvolvimento de organóides neurais [87]. A detecção do genoma e de proteínas virais em tecidos cerebrais de fetos abortados ou natimortos confirma o tropismo do VZKA pelo tecido neural [88, 89, 90].

A infecção materna, quando contraída no 1º trimestre gestacional, é mais propícia à indução de danos ao feto, uma vez que a formação dos órgãos fetais se dá no período embrionário, ainda no início da gestação. O desenvolvimento do SNC se inicia na quarta semana de vida do embrião, e se estende até a 8ª semana. Qualquer eventualidade neste período pode resultar em lesões cerebrais irreversíveis [46]. Consistente com os dados da literatura [84, 89, 90], verificamos que 80% das gestantes cujos neonatos apresentaram alterações encefálicas sofreram infecção pelo VZKA no primeiro trimestre gestacional. Esses achados reforçam o fato de que a infecção viral materna durante o desenvolvimento embrionário pode culminar em teratogênese fetal.

Conforme anteriormente demonstrado em infecções do tipo TORCH, a passagem do vírus através da placenta pode resultar em danos significativos à arquitetura placentária. Em nosso estudo, as placentas alocadas no grupo SCZ exibiram áreas de necrose coagulativa das vilosidades placentárias, além de

edema e descolamento do trofoblasto viloso. Esses achados são frequentemente relatados na literatura [90, 91,92].

Quanto à pesquisa do genoma viral nas amostras placentárias do presente estudo, importa relatar o resultado positivo em apenas 5% dos casos. Outros autores também registraram baixa positividade na detecção do genoma do VZIKA no tecido placentário. No estudo de Reagan-Steiner e colaboradores (2017), somente dezesseis placentas (53%) foram positivas para o genoma do VZIKA dentre trinta placentas oriundas de gestações cujo neonato exibia SCZ [94]. Deve-se considerar que a placenta possui tecidos de origem materna e fetal, e que um resultado de RT-PCR positivo não é capaz de diferenciar entre infecções materna e fetal [94]. Tendo em vista que o presente estudo foi conduzido em amostras placentárias colhidas no momento do parto, a termo na maioria dos casos, acredita-se que, nessa ocasião, não havia mais partículas virais circulantes no organismo materno. De maneira semelhante, foi possível a identificação do antígeno viral NS2B no interior de células do citotrofoblasto intraviloso apenas nos dois casos em que o genoma do VZIKA havia sido detectado.

A transferência de agentes infecciosos da circulação materna para a circulação fetal incita o recrutamento de células inflamatórias nas vilosidades coriônicas. No atual estudo, as CH presentes no interior das vilosidades placentárias exibiam um padrão difuso de distribuição, tendo sido demonstrada hiperplasia dessas células nas amostras pertencentes ao grupo SCZ. Esse achado caracteriza um quadro de vilosite crônica inespecífica, resultado concordante com os achados descritos na literatura [62,63,93]. Partindo-se do pressuposto de que a infecção viral placentária se deu no início da gestação, é concebível que uma resposta inflamatória crônica seja identificada ao final do terceiro trimestre gestacional. Esse achado é consistente com diversos estudos anteriores [59, 62, 93].

Estudos prévios demonstraram que o VZIKA é capaz de infectar e proliferar no interior de células citotrofoblásticas e de CH [55,56,59]. Considerando que CH circulam no interior das vilosidades placentárias e possuem acesso aos capilares fetais, alguns autores têm sugerido que a transferência do VZIKA ao compartimento fetal ocorre por meio da proliferação e da migração dessas células placentárias infectadas [62, 91, 93].

Relacionando esse raciocínio com os achados do presente trabalho, a hiperplasia das CH no grupo SCZ possibilitaria a “entrega” de maiores cargas virais ao compartimento fetal e, por esse motivo, os neonatos relacionados ao grupo SCZ exibiram maior comprometimento do SNC.

Este é o primeiro estudo a analisar a expressão de Gal-3 em placentas de gestantes infectadas pelo VZKA. Considerando o efeito regulatório de Gal-3 na proliferação celular e nos processos inflamatórios, presumimos que a expressão de Gal-3 estaria aumentada nas placentas do grupo SCZ.

Os nossos resultados revelaram que a expressão placentária de Gal-3 mostrava-se significativamente aumentada nas placentas cujos neonatos apresentaram alterações encefálicas graves. A expressão de Gal-3 foi documentada no citoplasma e no núcleo das células citotrofoblásticas.

Estudos prévios demonstram que a expressão de Gal-3 encontra-se aumentada nos processos inflamatórios e na proliferação celular [69, 72, 73]. Sabe-se que a infecção de células Molt-3 cultivadas pelo HIV-1 resulta em expressão exacerbada de Gal-3. Proteínas Tat de origem viral atuam diretamente sobre as células Molt-3 produzindo incremento na síntese da lectina [81,82]. Adicionalmente, o reconhecido efeito inibitório da Gal-3 sobre o processo apoptótico prolongaria a sobrevivência celular, favorecendo a replicação viral no interior das células infectadas [96]. À semelhança do HIV-1, acreditamos que o VZKA possa ter atuado sobre as células citotrofoblásticas estimulando a hiperexpressão de Gal-3 documentada pelo presente estudo.

Sharma e colaboradores demonstraram que a Gal-3 recombinante exógena aumentou significativamente a migração de macrófagos [97]. Henderson e colaboradores demonstraram que macrófagos ativados continham abundante Gal-3 no núcleo e no citoplasma, e que eram capazes de secretar quantidades substanciais de Gal-3 no sobrenadante dos cultivos celulares. A secreção de Gal-3 pode também conduzir à ativação seletiva de macrófagos ligados a processos de dano e de reparo teciduais relacionados a ações patogênicas [97,98]. Segundo Sato, após um estímulo prolongado ou após dano tecidual secundário a um processo infeccioso, Gal-3 pode ser secretada por células inflamatórias ativadas [99].

Demonstramos, no presente estudo, o potencial da proteína Gal-3 como um possível amplificador da resposta inflamatória placentária na infecção

congenita grave pelo VZKA. Conjecturamos que a hiperplasia das CH poderia estar diretamente associada à hiperexpressão de Gal-3, uma vez que essa lectina é reconhecidamente capaz de mediar a proliferação, a quimiotaxia e a ativação de macrófagos. Tendo em vista que CH infectadas atuam favorecendo a passagem de partículas virais através da barreira placentária, pode-se também conceber que os níveis placentários elevados de Gal-3 estariam intimamente relacionados com a gravidade da infecção fetal pelo VZKA.

7. CONCLUSÃO

1. Gal-3 é amplamente expressa no citotrofoblasto das microvilosidades placentárias quando os neonatos exibem dano encefálico grave.

Tendo em vista que a Gal-3 exerce importante papel na amplificação da resposta inflamatória, pode-se especular uma provável relação entre a hiperexpressão de Gal-3 nas células citotrofoblásticas, a hiperplasia das CH e uma maior gravidade da infecção fetal pelo VZIKA.

2. A infecção placentária pelo VZIKA induz hiperplasia das CH, a qual é mais intensa quando há comprometimento fetal grave.
3. As alterações histopatológicas placentárias incluem necrose coagulativa das vilosidades, edema viloso e descolamento do trofoblasto viloso.

8. REFERÊNCIAS

1. Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952; **46**: 509-520.
2. Dick GW. Zika virus II. Pathogenicity and physical properties. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952; **46**: 521-534.
3. Bell TM, Field EJ, Narang HK. Zika virus infection of the central nervous system of mice. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1971; **35**:183-193.
4. Macnamara FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1954; **48**:139-145.
5. Simpson DI. Zika Virus infection in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1964; **58**: 335-338.
6. Moore DL, Causey OR, Carey DE, Reddy S, et al. Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964-1970. *Ann Trop Med Parasitol.* 1975; **69**: 49-64.
7. Bearcroft WG. Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1956; **50**: 442-448.
8. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009; **360**: 2536-2543.
9. Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014; **20**: 1085-1086.
10. Tognarelli J, Ulloa S, Villagra E, Lagos J, et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch Virol.* 2016; **161**: 665-668.
11. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015; **21**: 381-382.
12. Pan American Health Organization/World Health Organization. Zika Epidemiological Alert, 7 May. 2015. [Online] Disponível em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/2015-may-7-cha-zika-virus-epi-alert.pdf>. Acessado em: 29 fev, 2020.
13. Katz I, Gilburd B, Shovman O. Zika autoimmunity and Guillain-Barré syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2019; **31**:484-487.
14. Pan American Health Organization/World Health Organization. Timeline of Emergence of Zika virus in the Americas. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11959Itemid=41711&lang=en:timeline-of-emergence-of-zika-virus-in-americas&. Acessado em: 29 fevereiro 2020.

15. de Araújo TVB, Rodrigues LC, de Alencar Ximenes RA, et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect Dis*. 2016;**16**: 1356-1363.
16. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, S et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis*. 2016;**16**: 653-660.
17. Cordeiro MT, Pena LJ, Brito CA, et al. Positive IgM for Zika virus in the cerebrospinal fluid of 30 neonates with microcephaly in Brazil. *The Lancet*. 2016; **387**: 1811-1812.
18. Pan American Health Organization. World Health Organization. Zika suspected and confirmed cases reported by countries and territories in the Americas Cumulative cases, 2015-2016. Updated as of 29 December 2016 [Internet]. [Washington, D.C.: Pan American Health Organization; 2016]. Disponível em :<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2016-dec-29-phe-ZIKV-cases.pdf>. Acessado em: 11 dezembro 2020.
19. Boletim Epidemiológico. Divisão de Vigilância Epidemiológica. 2017. [Online] disponível em: https://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/ssauade/pdf/boletim_epidemiologico_mensal_dengue_chikungunya.pdf. Acessado em 02 março 2020.
20. Faye O, Freire CCM, Iamarino A et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; **8**: e2636. doi:10.1371/journal.pntd.0002636.
21. Hamel R, Liégeois F, Wichit S, et al. Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. *Microbes Infect*. 2016;**18**: 441-449.
22. White MK, Wollebo HS, David Beckham J, Tyler KL, Khalili K. Zika virus: An emergent neuropathological agent. *Review. Ann Neurol*. 2016; **80**: 479-489.
23. Chang C, Ortiz K, Ansari A, Gershwin ME. The Zika outbreak of the 21st century. *J Autoimmun*. 2016. **68**:1-13.
24. Sheridan MA, Balaraman V, Schust DJ et al. African and Asian strains of Zika virus differ in their ability to infect and lyse primitive human placental trophoblast. *PLoS One*. 2018. **13**: e0200086. doi: 10.1371/journal.pone.0200086
25. Paz ADC. Avaliação competência vetorial de populações de Aedes albopictus de Manaus, Amazonas ao Zika Virus. *Dissertação de mestrado*. Universidade do Amazonas. p.16. 2018.
26. Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis*. 2011; **17**: 880-882.
27. Hills SL, Russell K, Hennessey M, et al. Transmission of zika virus through sexual contact with travelers to areas of ongoing transmission - Continental United States, 2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*. 2016; **65**: 215–216.

28. Liang B, Guida JP, Costa Do Nascimento ML, Mysorekar IU. Host and viral mechanisms of congenital Zika syndrome. *Virulence*. 2019; **10**: 768-775
29. Prisant N, Bujan L, Benichou H, et al. Zika virus in the female genital tract. *Lancet Infect Dis*. 2016; **16**: 1000-1001.
30. Colt S, Garcia-Casal MN, Peña-Rosas JP, et al. Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017. 11: **e0005528**. doi: 10.1371/journal.pntd.0005528.
31. Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. *Emerg. Infect. Dis* .2015; **21**: 84–86.
32. Plourde AR, Bloch EM. A Literature Review of Zika Virus. *Emerg Infect Dis*. 2016; **22**:1185-1192.
33. Nascimento OJM, da Silva IRF. Guillain-Barré syndrome and Zika vírus outbreaks. *Curr Opin Neurol*. 2017; **30**: 500-507.
34. Wen Z, Song H, Ming GL. How does Zika virus cause microcephaly? *Genes Dev*. 2017; **31**: 849-861.
35. CLAP/OPAS. Infecções Perinatais transmitidas de mãe para filho durante a gravidez. 2010. Disponível em: https://www.paho.org/clap/index.php?Option=com_docman&view=download&category_slug=publicaciones&alias=164-infeccoes-perinatais-transmitidas-de-mae-para-filho-durante-gravidez&Itemid=219&lang=es Acessado em: 02 março 2020
36. Costa ML, de Moraes Nobrega G, Antolini-Tavares A. Key Infections in the Placenta. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2020; **47**: 133-146.
37. Yadav RK, Maity S, Saha S. A review on TORCH: groups of congenital infection during pregnancy. *Journal of Scientific and Innovative Research* 2014; **3**: 258-264.
38. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY. Infecções congênitas e perinatais. *Jornal de Pediatria*. 1999; **75**: S15-S30.
39. Pereira, L. Congenital Viral Infection: Traversing the Uterine-Placental Interface. *Annu Rev Virol*. 2018; **5**: doi:10.1146/annurev-virology-092917-043236
40. Miner JJ, Cao B, Govero J, et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell*. 2016;**165**: 1081–1091.
41. Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika Virus and Birth Defects--Reviewing the Evidence for Causality. *N Engl J Med*. 2016; **374**: 1981-1987.

42. Brasil P, Pereira JP Jr, Moreira ME, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*. 2016; **375**: 2321-2334.
43. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. *JAMA Pediatr*. 2017;**171**: 288-295.
44. Ministério da Saúde. Microcefalia 2019. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/microcefalia> Acessado em: 02 março 2020.
45. Centers for Disease and preventions (CDC). Disponível em: <https://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/portuguese/microcephaly.html>. Acesso em 08/12/2020
46. Chimelli L, Melo ASO, Avvad-Portari E, et.al. The spectrum of neuropathological changes associated with congenital Zika virus infection. *Acta Neuropathol*. 2017; **133**: 983-999.
47. Ramalho FS, Yamamoto AY, Silva LL et al. Congenital Zika virus infection induces severe spinal cord injury. *Clin Infect Dis*. p.1-13, 2017.
48. Poretti A, Huisman TA. Neuroimaging findings in congenital Zika syndrome. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016; **37**: 1764-1765
49. Zare Mehrjardi M, Poretti A, Huisman TA, et al. Neuroimaging findings of congenital Zika virus infection: a pictorial essay. *Jpn J Radiol*. 2017; **35**: 89-94.
50. Freitas BP, Oliveira JRD, Prazeres J et al. Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital Infection in Salvador, Brazil. *JAMA Ophthalmol*. 2016;**134**:529-535.
51. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Embriologia básica. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.
52. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Review. Thromb Res*. 2004;**114**: 397-407.
53. Baergen RN. Manual of Pathology of the Human Placenta. 2 ed. New York; Springer; 2011.
54. Boss AL, Chamley LW, James JL. Placental formation in early pregnancy: how is the centre of the placenta made? *Hum Reprod Update*. 2018; **24**:750-760.
55. Tabata T, Pettitt M, Puerta-Guardo H, et al. Zika Virus Replicates in Proliferating Cells in Explants From First-Trimester Human Placentas, Potential Sites for Dissemination of Infection. *J Infect Dis*. 2018 **28**:1202-1213.
56. Quicke KM, Bowen JR, Johnson EL et al. (2016) Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe*. 2016; **20**: 83-90.

57. Wang Y, Zhao S. Vascular Biology of the Placenta. San Rafael (CA): *Morgan & Claypool Life Sciences*; 2010.
58. Sadler TW. Langman embriologia médica. 9 ed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*; 2005.
59. Coyne CB, Lazear HM. Zika virus - reigniting the TORCH. *Nature reviews. Microbiology*, 2016; **14**: 707–715.
60. Yao Y, Xu XH, Jin L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front Immunol*. 2019; **10**:792. doi: 10.3389/fimmu.2019.00792.
61. Wetzka B, Clark DE, Charnock-Jones DS, Zahradnik HP, Smith SK. Isolation of macrophages (Hofbauer cells) from human term placenta and their prostaglandin E2 and thromboxane production. *Hum Reprod*. 1997;**12**: 847-852.
62. Schawrtz DA. Viral infection, proliferation, and hyperplasia of Hofbauer cells and absence of inflammation characterize the placental pathology of fetuses with congenital Zika virus infection. *Arch Gynecol Obstet*. 2017; **295**: 1361-1368.
63. Simoni MK, Jurado KA, Abrahams VM, Fikrig E, Guller S. Zika virus infection of Hofbauer cells. *Am J Reprod Immunol*. 2017; **77**.
64. Cummings RD, Liu FT et al. Fundamentos de glicobiologia.2ª edição. *Cold Spring Harbor (NY)*; 2009.
65. Cardoso AC, Andrade LN, Bustos SO, Chammas R. Galectin-3 Determines Tumor Cell Adaptive Strategies in Stressed Tumor Microenvironments. *Front Oncol*. 2016; **6**:127. doi: 10.3389/fonc.2016.00127.
66. Dong R, Zhang M, Hu Q, Zheng S, Soh A, Zheng Y, Yuan H. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *Int J Mol Med*. 2018;**41**:599-614.
67. Balan V, Nangia-Makker P, Kho DH, Wang Y, Raz A. Tyrosine-phosphorylated galectin-3 protein is resistant to prostate-specific antigen (PSA) cleavage. *J Biol Chem*. 2012;**287**:5192-5198.
68. Gao J, Li T, Mo Z, et al. Overexpression of the galectin-3 during tumor progression in prostate cancer and its clinical implications. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018; **11**:839-846.
69. Breuilh L, Vanhoutte F, Fontaine J, van Stijn CM, et al. Galectin-3 modulates immune and inflammatory responses during helminthic infection: impact of galectin-3 deficiency on the functions of dendritic cells. *Infect Immun*. 2007; **75**:5148-5157.
70. Novak R, Dabelic S, Dumic J. Galectin-1 and galectin-3 expression profiles in classically and alternatively activated human macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 2012; **1820**:1383-1390.

71. MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodgkinson PS, et al. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *J Immunol.* 2008; **180**:2650-2658.
72. Sano H, Hsu DK, Yu L, et al. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J. Immunol.* 2000; **165**:2156–2164.
73. Simovic Markovic B, Nikolic A, Gazdic M, et al. Galectin-3 Plays an Important Pro-inflammatory Role in the Induction Phase of Acute Colitis by Promoting Activation of NLRP3 Inflammasome and Production of IL-1 β in Macrophages. *J Crohns Colitis.* 2016; **10**:593-606.
74. Ohshima S, Kuchen S, Seemayer CA, et al. Galectin 3 and its binding protein in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003; **48**:2788-2795.
75. Poirier F, Robertson EJ. Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin. *Development.* 1993; **119**:1229-36.
76. Fowles D, Colnot C, Ripoche MA, Poirier F. Galectin-3 is expressed in the notochord, developing bones, and skin of the post implantation mouse embryo. *Dev. Dyn.* 1995; **203**: 241-51
77. Bojić-Trbojević Ž, Jovanović Krivokuća M, Vilotić A, et al. Human trophoblast requires galectin-3 for cell migration and invasion. *Sci Rep.* 2019;**9**: 2136.
78. Sokolov DI, Kolobov AV, Lesnichija MV, et al. Regulatory mechanisms for apoptosis in placental tissue during normal pregnancy and gestosis-complicated pregnancy. *Bull Exp Biol Med.* 2009; **148**:766-770.
79. Xiao Q, Zeng FL, Tang GY, et al. Expression of galectin-3 and apoptosis in placental villi from patients with missed abortion during early pregnancy. *Exp Ther Med.* 2019; **17**: 2623-2631.
80. Wang WH, Lin CY, Chang MR et al. The role of galectins in virus infection - A systemic literature review. *J Microbiol Immunol Infect.* 2020; **53**:925-935.
81. Schröder HC, Ushijima H, Theis C, Sève AP, Hubert J, Müller WE. Expression of nuclear lectin carbohydrate-binding protein 35 in human immunodeficiency virus type 1-infected Molt-3 cells. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1995; **9**: 340-348.
82. Fogel S, Guittaut M, Legrand A, Monsigny M, Hébert E. The TAT protein of HIV-1 induces galectin-3 expression. *Glycobiology.* 1999; **9**: 383-387.
83. Cavaleiro S, Lopez A, Serra S, et al. Microcephaly and Zika virus: neonatal neuroradiological aspects. *Childs Nerv Syst.* 2016; **32**:1057-1060.
84. Melo AS, Aguiar RS, Amorim MM, et al. Congenital Zika Virus Infection: Beyond Neonatal Microcephaly. *JAMA Neurol.* 2016;**73**: 1407-1416.

85. Sarno M, Aquino M, Pimentel K, et al. Progressive lesions of central nervous system in microcephalic fetuses with suspected congenital Zika virus syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017; **50**:717-722.
86. Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science.* 2016; **352**: 816-818.
87. Li C, Xu D, Ye Q, et al. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell.* 2016; **19**:120-126.
88. Mlakar J, Korva M, Tul N, et al. Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med.* 2016; **374**:951–958.
89. Sousa AQ, Cavalcante DIM, Franco LM, et al. Postmortem Findings for 7 Neonates with Congenital Zika Virus Infection. *Emerg Infect Dis.* 2017; **23**:1164-1167.
90. Martines RB, Bhatnagar J, de Oliveira Ramos AM, et al. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *Lancet.* 2016;**388**: 898-904.
91. Schwartz D. A. Autopsy and Postmortem Studies Are Concordant: Pathology of Zika Virus Infection Is Neurotropic in Fetuses and Infants With Microcephaly Following Transplacental Transmission. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2017; **141**: 68–72.
92. Noronha L, Zanluca C, Azevedo ML, Luz KG, Santos CN. Zika vírus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016; **111**: 287–293.
93. Rosenberg AZ, Yu W, Hill DA, Reyes CA, Schwartz DA. Placental Pathology of Zika Virus: Viral Infection of the Placenta Induces Villous Stromal Macrophage (Hofbauer Cell) Proliferation and Hyperplasia. *Arch Pathol Lab Med.* 2017; **141**:43-48.
94. Reagan-Steiner S, Simeone R, Simon E, et al. Evaluation of Placental and Fetal Tissue Specimens for Zika Virus Infection - 50 States and District of Columbia, January-December, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2017; **66**: 636-643.
95. Fang Z, Qiu F, Zhao JF, et al. [Role and mechanism of Galectin-3 gene in proliferation, invasion, and apoptosis of oral squamous cell carcinoma]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2018; **36**:404-409.
96. Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T, et al. Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. *Mol Cell Biol.* 2004; **24**: 4395-4406.
97. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation.* 2004; **110**: 3121-3128.

98. Henderson NC, Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev.* 2009; **230**:160-171.
99. Sato S, Nieminen J. Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconj J.* 2002; 19: 583-591.

9. ANEXOS

Parecer Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: História natural da infecção pelo vírus Zika em gestantes e consequências para a gestação, o feto e a criança

Pesquisador: Marisa Marcia Mussi Pinhata

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 56522216.0.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.655.696

Apresentação do Projeto:

Desenho:

Em um modelo observacional de coorte prospectivo, este estudo recrutará uma coorte de gestantes que buscaram atendimento pré-natal em unidades básicas de saúde de Ribeirão Preto, que tenham apresentado sinais compatíveis com infecção pelo vírus Zika durante a gestação e tenham sido confirmadas como portadoras dessa infecção por meio de teste de detecção de sequências genômicas virais no sangue e/ou na urina. Essas serão acompanhadas durante a gravidez e até seis semanas após o parto. Os filhos dessas mulheres constituirão uma coorte de recém-nascidos (Coorte de recém-nascidos de mães que foram infectadas pelo ZIKV). Esse estudo nos permitirá estudar as consequências da infecção pelo ZIKV sobre os desfechos gestacionais, incluindo-se sobre o feto e o recém-nascido.

- Coorte materna – Gestantes que já tenham sido diagnosticadas como portadoras de infecção pelo ZIKV no município de Ribeirão Preto por terem se tornado sintomáticas em qualquer momento da gestação. - Coorte de recém-nascidos e crianças cujas mães tiveram infecção comprovada. Todas as crianças das gestantes com infecção confirmada. As gestantes serão acompanhadas no Ambulatório de Infecções pelo ZIKV em Gestantes (AZIG) HC-FMRPUSP criado especialmente em 04/04/2016 para atender esta nova demanda de Ribeirão Preto e região.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.655.696

Os recém-nascidos serão acompanhados no ambulatório de Crianças Expostas à Infecção Gestacional pelo vírus Zika (EZIG) que será criado especialmente para esse fim.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

i. Comparar a incidência de eventos adversos gestacionais e fetais entre mulheres que se infectaram com o ZIKV durante a gestação ii. Determinar o risco de transmissão do ZIKV ao feto após a infecção materna, segundo a idade gestacional. iii. Descrever o amplo espectro das manifestações da infecção congênita em fetos e recém-nascidos de mães infectadas em diferentes estágios da gestação. iv. Identificar eventuais consequências da

infecção congênita pelo ZIKV para a saúde da criança e o seu desenvolvimento até 2 anos de idade. v. Descrever alterações morfológicas e funcionais do cérebro fetal por ressonância magnética fetal, comparativamente à ultrassonografia, em gestantes infectadas pelo ZIKV. vi. Identificar, por meio de Ressonância Magnética, se há aparecimento ou progressão de lesões do sistema nervoso central na criança (<3meses) quando comparada ao feto entre os expostos à infecção materna pelo ZIKV. vii. Descrever alterações morfológicas e funcionais de cérebro da criança exposta à infecção materna pelo ZIKV, buscando identificar se essas estão associadas à ocorrência de infecção congênita. viii. Verificar a incidência e descrever as alterações cardiovasculares anatômicas e funcionais em crianças nascidas de gestações com infecção pelo Zika vírus, buscando identificar se essas estão associadas à ocorrência de infecção congênita.

Objetivo Secundário:

i. Identificar a duração da persistência de excreção do ZIKV no sangue, urina, saliva, secreção vaginal em diferentes momentos gestacionais e no leite no período pós-natal, assim como a cinética de anticorpos IgG e IgM contra o ZIKV em grávidas. ii. Verificar se ocorre coinfeção fetal pelo ZIKV e pelo citomegalovírus e verificar a consequência dessa coinfeção sobre a doença fetal e neonatal, quando comparada à infecção isolada pelo ZIKV. iii. Buscar a detecção do ZIKV em amostras de saliva, urina e sangue de recém-nascidos de mães com infecção comprovada durante a gestação visando o diagnóstico precoce da infecção e eventual persistência da replicação viral. iv. Identificar se o ZIKV é excretado no leite materno e se essa pode ser uma fonte de infecção para a criança. v. Identificar potenciais marcadores diagnósticos e prognósticos da infecção congênita pelo ZIKV por neuro-imagem tanto no período pré-natal quanto no período pós-natal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

RISCOS DA COORTE MATERNA:- Riscos durante a coleta de sangue: - Riscos durante a coleta de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.655.596

secreção vaginal: - Riscos durante a coleta de saliva: - Riscos durante a coleta de urina: - Riscos durante a coleta de Líquido Amniótico: - Riscos para realizar o exame de ultrassonografia: - Riscos para realização de exame de Ressonância Magnética (RM): RISCOS COORTE CRIANÇAS: - Riscos durante a coleta de sangue: - Riscos durante a coleta de líquido amniótico no estômago: - Riscos durante a coleta de saliva: - Riscos durante a coleta de urina: - Riscos ao examinar o ouvido: - Riscos ao examinar os olhos: - Riscos dos exames de imagem: ultrassom e ressonância magnética.

Benefícios:

Não há nenhum benefício direto para você por participar deste estudo. O resultado desta pesquisa pode ajudar a entender o que ocorre quando uma mulher grávida adquire o vírus Zika durante a gestação, quanto tempo este vírus permanece nos seus líquidos corporais e por que alguns bebês nascem com este vírus e outros não. Você poderá ajudar no conhecimento para se encontrar uma forma de impedir ou de modificar a infecção em bebês nascidos no futuro. Os resultados do estudo e suas conclusões serão divulgados e todos poderão se beneficiar deste conhecimento. Não há tratamento aprovado para ser usado durante a gestação. Com relação aos exames de ultrassom durante a gravidez, esse estudo trará informações adicionais do que habitualmente é disponível no cuidado pré-natal feito nas unidades básicas de saúde do município de Ribeirão Preto. Estão previstos vários exames nesse estudo, sendo que um desses exames, chamado de ultrassom morfológico, examinará atentamente se o seu bebê está bem formado ou se há alguma suspeita de alteração. Normalmente, esse exame não é feito. Dessa maneira, os resultados desses exames de ultrassom serão disponibilizados para a gestante e ao seu médico, caracterizando-se como um benefício potencial a você. Sempre que houver informações relevantes ao cuidado da gestante que foi infectada pelo vírus ZIKA geradas pelo estudo, tais como resultados de testes laboratoriais, esses serão disponibilizados para a gestante e ao seu médico. Nós lhe daremos explicações cuidadosas sobre o significado dos resultados dos exames.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Metodologia Proposta:

a. **POPULAÇÃO DE ESTUDO** estudo será desenvolvido na cidade de Ribeirão Preto. Além de possuir condições climáticas que favorecem a proliferação do vetor *Aedes aegypti*, a cidade tem vivenciado epidemias do vírus da dengue, também transmitido por esse vetor e atualmente há uma epidemia dessas infecções. Há uma preocupação geral entre os profissionais de saúde e o público sobre o impacto da infecção pelo ZIKV na gravidez. Segundo o Boletim Epidemiológico Mensal editado Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto e publicado em 01/03/2016, os dados consolidados até 15/02/2016 indicavam a existência de 5848 habitantes acometidos por dengue durante os

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.046-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.655.696

meses de janeiro e fevereiro de 2016.

No mesmo período, houve 2326 casos suspeitos de infecção pelo ZIKV, dentre eles 516 gestantes. Considerando-se a possibilidade de que esta epidemia perdure por mais tempo, o risco de infecção em gestantes permanecerá neste e nos anos seguintes. Aquelas gestantes que já tenham sido diagnosticadas pelo município como portadoras de infecção pelo ZIKV e os seus filhos expostos, constituirão uma coorte de mulheres com infecção diagnosticada e que serão avaliadas nesse estudo. Detalhes da formação deste coorte no próximo item deste projeto. b. **DESENHO DE ESTUDO** Em um modelo observacional de coorte prospectivo, este estudo recrutará uma coorte de gestantes que buscaram atendimento pré-natal em unidades básicas de saúde de Ribeirão Preto, que tenham apresentado sinais compatíveis com infecção pelo vírus Zika durante a gestação e tenham sido confirmadas como portadoras dessa infecção por meio de teste de detecção de sequências genômicas virais no sangue e/ou na urina. Essas serão acompanhadas durante a gravidez e até seis semanas após o parto. Os filhos dessas mulheres constituirão uma coorte de recém-nascidos (Coorte de recém-nascidos de mães que foram infectadas pelo ZIKV). Esse estudo nos permitirá estudar as consequências da infecção pelo ZIKV sobre os desfechos gestacionais, incluindo-se sobre o feto e o recém-nascido. • **Coorte materna** – Gestantes que já tenham sido diagnosticadas como portadoras de infecção pelo ZIKV no município de Ribeirão Preto por terem se tornado sintomáticas em qualquer momento da gestação. • **Coorte de recém-nascidos e crianças** cujas mães tiveram infecção comprovada. Todas as crianças das gestantes com infecção confirmada. As gestantes serão acompanhadas no Ambulatório de Infecções pelo ZIKV em Gestantes (AZIG) HC-FMRPUSP criado especialmente em 04/04/2016 para atender esta nova demanda de Ribeirão Preto e região. Os recém-nascidos serão acompanhados no ambulatório de Crianças Expostas à Infecção Gestacional pelo vírus Zika (EZIG) que será criado especialmente para esse fim.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Justificativa da Emenda:

Atualização dos TCLEs atuais e inclusão de novos TCLEs para aprovação do CEP.

- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para bebês nascidos de mães inscritas no período pré-natal, versão 1.2, de 12 de julho de 2016;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para mães inscritas no período pré-natal, versão 1.2, de 12 de julho de 2016;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pais e responsáveis de gestantes menores de idade inscritas no período pré-natal, versão 1.2, de 12 de julho de 2016;

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3602-2226 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.055.590

• Termo de Assentimento para menores de idade inscritas no período pré-natal, versão 1.2, de 12 de julho de 2016;

2) Termos de consentimento novos, incorporados ao estudo devido a situação dos resultados de exames pendentes para o zika vírus realizados pelo SUS:

- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para bebês nascidos de mães inscritas no período pré-natal com resultado pendente do exame para o zika vírus, versão 1.0, de 12 de julho de 2016;
- pendente do exame para o zika vírus, versão 1.0, de 12 de julho de 2016;
- Termo de Assentimento para menores de idade inscritas no período pré-natal, com resultado pendente do exame para o zika vírus, versão 1.0, de 12 de julho de 2016;

Para ciência do Comitê, encaminho os seguintes documentos, apresentando as modificações dos TCLEs com referência a versão anterior:

- Alterações marcadas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para bebês nascidos de mães inscritas no período pré-natal, versão 1.2, de 12 de julho de 2016;
- Alterações marcadas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para mães inscritas no período pré-natal, versão 1.2, de 12 de julho de 2016;
- Alterações marcadas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pais e responsáveis de gestantes menores de idade inscritas no período pré-natal, versão 1.2, de 12 de julho de 2016;
- Alterações marcadas do Termo de Assentimento para menores de idade inscritas no período pré-natal, versão 1.2, de 12 de julho de 2016.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP analisou e aprovou a emenda bem como os seguintes documentos:

- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para bebês nascidos de mães inscritas no período pré-natal, versão 1.2, de 12 de julho de 2016;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para mães inscritas no período pré-natal, versão 1.2, de 12 de julho de 2016;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pais e responsáveis de gestantes menores de idade inscritas no período pré-natal, versão 1.2, de 12 de julho de 2016;
- Termo de Assentimento para menores de idade inscritas no período pré-natal, versão 1.2, de 12

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3802-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Continuação do Parecer: 1.055.696

de julho de 2016;

- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para bebês nascidos de mães inscritas no período pré-natal com resultado pendente do exame para o zika vírus, versão 1.0, de 12 de julho de 2016;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para mães inscritas no período pré-natal com resultado pendente do exame para o zika vírus, versão 1.0, de 12 de julho de 2016;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pais e responsáveis de gestantes menores de idade inscritas no período pré-natal, com resultado pendente do exame para o zika vírus, versão 1.0, de 12 de julho de 2016;
- Termo de Assentimento para menores de idade inscritas no período pré-natal, com resultado pendente do exame para o zika vírus, versão 1.0, de 12 de julho de 2016;

O CEP tomou ciência dos seguintes documentos:

- Alterações marcadas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para bebês nascidos de mães inscritas no período pré-natal, versão 1.2, de 12 de julho de 2016;
- Alterações marcadas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para mães inscritas no período pré-natal, versão 1.2, de 12 de julho de 2016;
- Alterações marcadas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pais e responsáveis de gestantes menores de idade inscritas no período pré-natal, versão 1.2, de 12 de julho de 2016;
- Alterações marcadas do Termo de Assentimento para menores de idade inscritas no período pré-natal, versão 1.2, de 12 de julho de 2016.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_763215_E1.pdf	21/07/2016 17:08:52		Aceito
Outros	12_Alteracoes_marcadas_ZIG_Termo_a ssentimento_v1_2_12Jul2016_revAAT_ MMM_SN.pdf	21/07/2016 17:07:04	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Outros	11_Alteracoes_marcadas_ZIG_TCLE_P ais_responsaveis_Prenatal_v1_2_12Jul 2016.pdf	21/07/2016 17:06:50	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Outros	10_Alteracoes_marcadas_ZIG_TCLE_m aes_Prenatal_v1_2_12Jul2016_revAAT MMM_SN.pdf	21/07/2016 17:06:32	Claudinei Coppola Junior	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Continuação do Processo: 1.655.696

Outros	9_Alteracoes_marcadas_ZIG_TCLE_bebes_versao_1_2_12Jul2016_revAAT_MMM_SN.pdf	21/07/2016 17:06:18	Claudinei Coppola Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	8_ZIG_Termo_assentimento_v1_0_12Jul2016_resultado_PENDENTE_revAAT_MMM_SN.doc	21/07/2016 17:05:39	Claudinei Coppola Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	7_ZIG_TCLE_Pais_responsaveis_Prenatal_v1_0_12Jul2016_resultado_PENDENTE_revAAT_MMM_SN.doc	21/07/2016 17:05:28	Claudinei Coppola Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	6_ZIG_TCLE_maes_Prenatal_v1_0_12Jul2016_resultado_PENDENTE_revAAT_MMM_SN.doc	21/07/2016 17:05:15	Claudinei Coppola Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	5_ZIG_TCLE_bebes_v1_0_12Jul2016_resultado_PENDENTE_revAAT_MMM_SN.doc	21/07/2016 17:05:01	Claudinei Coppola Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4_ZIG_Termo_assentimento_v1_2_12Jul2016_revAAT_MMM_SN.doc	21/07/2016 17:04:48	Claudinei Coppola Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	3_ZIG_TCLE_Pais_responsaveis_Prenatal_Versao_1_2_12_Jul_2016_revAAT_MMM_SN.doc	21/07/2016 17:04:38	Claudinei Coppola Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2_ZIG_TCLE_maes_Prenatal_Versao_1_2_12Jul2016_revAAT_MMM_SN.doc	21/07/2016 17:04:27	Claudinei Coppola Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	1_ZIG_TCLE_bebes_versao_1_2_12Jul2016_revAAT_MMM_SN.doc	21/07/2016 17:04:19	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Outros	0_ZIG_Submissao_TCLEs_12Jul2016.pdf	21/07/2016 17:04:08	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Outros	0_ZIG_Submissao_TCLEs_12Jul2016.docx	21/07/2016 17:03:30	Claudinei Coppola Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4_ZIG_TCLE_Crianças_versao_1_1_22Jun2016.docx	22/06/2016 16:32:17	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Outros	9_ZIG_alteracoes_marcadas_Termo_assentimento_versao_1_1_22Jun2016.pdf	22/06/2016 16:30:24	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Outros	8_ZIG_alteracoes_marcadas_TCLE_Cri	22/06/2016	Claudinei Coppola Junior	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cap@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Continuação do Parecer: 1.655.696

Outros	ancas_versao_1_1_22Jun2016.pdf	16:30:06	Junior	Aceito
Outros	7_ZIG_alteracoes_marcadas_TCLE_Prenatal_Versao_1_1_22Jun2016.pdf	22/06/2016 16:29:52	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Outros	6_ZIG_alteracoes_marcadas_TCLE_Pais_responsaveis_Prenatal_Versao_1_1_22Jun2016.pdf	22/06/2016 16:29:37	Claudinei Coppola Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	5_ZIG_Termo_assentimento_versao_1_1_22Jun2016.docx	22/06/2016 16:29:00	Claudinei Coppola Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	3_ZIG_TCLE_Prenatal_Versao_1_1_22Jun2016.docx	22/06/2016 16:28:34	Claudinei Coppola Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2_ZIG_TCLE_Pais_responsaveis_Prenatal_Versao_1_1_22Jun_2016.docx	22/06/2016 16:28:24	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Outros	1_ZIG_Oficio_resposta_pendencias_parecer_CEP.pdf	22/06/2016 16:27:21	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Outros	1_ZIG_Oficio_resposta_pendencias_parecer_CEP.docx	22/06/2016 16:27:06	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Orçamento	15_ZIG_Orcamento_versao_1_0_Final_MMM_24Mai16.xlsx	25/05/2016 17:15:09	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Cronograma	14_ZIG_Cronograma_execucoes.pdf	25/05/2016 17:14:39	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Cronograma	14_ZIG_Cronograma_execucoes.doc	25/05/2016 17:14:27	Claudinei Coppola Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	13_ZIG_Termo_Assentimento_versao_1_0_25_Maio_2016.docx	25/05/2016 17:14:09	Claudinei Coppola Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	12_ZIG_TCLE_Pais_responsaveis_Prenatal_Versao_1_0_25_Maio_2016.docx	25/05/2016 17:13:51	Claudinei Coppola Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	11_ZIG_TCLE_Prenatal_Versao_1_0_25_Maio_2016.docx	25/05/2016 17:13:37	Claudinei Coppola Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	10_ZIG_TCLE_Crianças_Versao_1_0_25_Maio_2016.docx	25/05/2016 17:13:26	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Outros	9_ZIG_aprovacao_orcamento_UPC.pdf	25/05/2016 17:12:28	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Declaração de	8_ZIG_Oficio_criacao_biorrepositorio	25/05/2016	Claudinei Coppola Junior	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Continuação do Parecer: 1.055.696

Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	_estudo.pdf	17:11:59	Junior	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	8_ZIG_Oficio_criacao_biorrepositorio_estudo.docx	25/05/2016 17:11:48	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	7_ZIG_Declaracao_uso_destino_material_biologico_dados_coletados.pdf	25/05/2016 17:11:32	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	7_ZIG_Declaracao_uso_destino_material_biologico_dados_coletados.docx	25/05/2016 17:11:26	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	6_ZIG_Declaracao_uso_amstras_armazenadas_estudos_futuros.pdf	25/05/2016 17:10:35	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	6_ZIG_Declaracao_uso_amstras_armazenadas_estudos_futuros.docx	25/05/2016 17:10:27	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	5_ZIG_Declaracao_infraestrutura_HCF_MRP_USP.pdf	25/05/2016 17:09:34	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	5_ZIG_Declaracao_infraestrutura_HCF_MRP_USP.doc	25/05/2016 17:09:19	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Declaração de Pesquisadores	4_ZIG_Declaracao_compromisso_tomar_publico_resultados.pdf	25/05/2016 17:09:10	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Declaração de Pesquisadores	4_ZIG_Declaracao_compromisso_tomar_publico_resultados.docx	25/05/2016 17:09:01	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Declaração de Pesquisadores	3_ZIG_Declaracao_compromisso_etica_pesquisa.pdf	25/05/2016 17:08:40	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Declaração de Pesquisadores	3_ZIG_Declaracao_compromisso_etica_pesquisa.docx	25/05/2016 17:08:31	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	1_Protocolo_ZIG_versao1_0_25Mai16_final.docx	25/05/2016 17:07:58	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Outros	0_ZIG_Oficio_CEP.pdf	25/05/2016	Claudinei Coppola	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.046-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2226

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.655.696

Outros	0_ZIG_Oficio_CEP.pdf	17:07:41	Junior	Aceito
Outros	0_ZIG_Oficio_CEP.docx	25/05/2016 17:07:28	Claudinei Coppola Junior	Aceito
Folha de Rosto	2_ZIG_Folha_de_rosto.pdf	25/05/2016 17:06:19	Claudinei Coppola Junior	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 26 de Julho de 2016

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br