

ANNA CLÁUDIA CALVIELLI CASTELO BRANCO

**Efeito da obesidade na imunidade antiviral da interface materno-fetal na
infecção por Zika vírus**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

São Paulo

2023

ANNA CLÁUDIA CALVIELLI CASTELO BRANCO

**Efeito da obesidade na imunidade antiviral da interface materno-fetal na
infecção por Zika vírus**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Imunologia.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Notomi Sato

Versão original.

São Paulo

2023

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Calvielli Castelo Branco, Anna Cláudia
Efeito da obesidade na imunidade antiviral da
interface materno-fetal na infecção por Zika vírus /
Anna Cláudia Calvielli Castelo Branco; orientador
Maria Notomi Sato. -- São Paulo, 2023.
97 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. obesidade. 2. gestação. 3. ; placenta. 4. ;
Zika vírus. 5. fatores antivirais. I. Sato, Maria
Notomi, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Anna Cláudia Calvielli Castelo Branco

Título da Dissertação/Tese: Efeito da obesidade na imunidade antiviral da interface materno-fetal na infecção por Zika vírus

Orientador: Maria Notomi Sato

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a):

Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a):

Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a):

Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Presidente:

Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Dedico este trabalho a todas as gestantes, que merecem viver esse momento de suas vidas com amparo científico, direito à saúde pública, protagonismo e respeito às suas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para que eu pudesse voar. Que me ensinaram a perseguir meus sonhos, a respeitar minhas limitações e acreditar que eu era forte para encarar o que quer que fosse. Vocês são o que eu tenho de melhor.

À minha irmã, que ampara, conforta e me lembra diariamente que eu nunca estarei sozinha.

Ao Felipe, que viveu esse doutorado junto comigo, até nos dias mais frios de Indiana. Que vibrou na felicidade, que apoiou incondicionalmente nos momentos de indecisão, e cuidou nos dias mais desafiadores. É um privilégio poder caminhar junto com você.

À minha avó Edna, que sempre acolhe com uma palavra de carinho, que participa de cada detalhe da minha vida, que é um exemplo de força e resiliência.

Ao meu nono, que vibrou por mim até o último dia, você não imagina a falta que faz.

À Maria, não tenho palavras para agradecer por todos esses anos de ensinamentos, apoio, compreensão e paciência em todas essas minhas fases e mudanças.

Ao Dr. David Aronoff, que me recebeu com muito acolhimento e forneceu todo o suporte para que meu período nos EUA fosse inesquecível.

À Lisa Rogers, que se dedica ao próximo de uma forma admirável, em pouco tempo se tornou uma grande amiga.

Às minhas irmãs do coração, Nat e Marina, que compartilham lutas, dores, alegrias, visão de mundo, viagens, memórias e muitos podcasts, vou sentir falta do nosso convívio diário.

A todos os meus amigos da Experimental: Anna J, Nilson, Luanda, Luana, Fabinho, Kelly, Fran, Iara, Dani, Emily, Milena, Júlia, Elaine, Yasmin, Raquel, Sarah e Ricardo. Obrigada por todos os ensinamentos, ajudas e principalmente por tornarem meus dias mais felizes.

À Prof. Patrícia Rondó, Prof. Naiara Dejani, Dra. Tamires Azamor e Dr. Zilton Vascondelos pela colaboração e acesso à coorte das gestantes.

Ao Dr. Amaro Neto, Dr. Luis Fernando da Silva, Dra. Mirian Sotto, Dra. Naiura Pereira e Dra. Fernanda Guedes, pela ajuda nas análises de imuno-histoquímica e histopatológicas da placenta.

Aos membros da banca de qualificação, Dr. Niels Olsen, Dra. Naiara Dejadi e Dra. Jamille Dombrowski pelas críticas e sugestões.

Aos colegas do LIM56 por garantirem um ótimo ambiente de trabalho.

À Coordenação do Programa de Imunologia da USP, em especial à Prof. Ana Lepique e o Prof. Anderson Nunes, que colocam muito empenho em minimizar as dificuldades da pós graduação.

À Eni, pela ajuda em incontáveis momentos ao longo de toda a minha trajetória.

Ao Prof.º Alberto Duarte pelo apoio institucional.

Às equipes dos Centros Obstétricos dos Hospitais participantes. Estendo meus agradecimentos ainda a todas as doadoras que concordaram em participar da pesquisa, sem vocês nada disso seria possível.

A todos que de alguma forma contribuíram com a minha formação e com a realização desse projeto.

Muito obrigada!

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP, com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo: 2019/25119-7

"Num país como o Brasil, manter a esperança viva é em si um ato revolucionário."

Paulo Freire

RESUMO

BRANCO, ACCC. **Efeito da obesidade na imunidade antiviral da interface materno-fetal na infecção por Zika vírus**. 2023. 97p. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A incidência de obesidade está aumentando em todo o mundo, principalmente em mulheres, o que pode influenciar no desfecho da gravidez. Na gestação, as infecções virais representam risco para a mãe, para a unidade placentária e para o feto. O surto do ZIKV no Brasil foi responsável pela síndrome congênita do Zika (SCZ), com consequências devastadoras como a microcefalia em recém-nascidos. Neste projeto, analisamos o impacto do sobrepeso/obesidade materna na expressão de fatores antivirais no tecido placentário, na presença ou ausência da infecção gestacional pelo ZIKV. Foram analisadas amostras de placentas de mulheres com e sem obesidade, de 34 unidades de saúde pública (São Paulo) e de mães infectadas pelo ZIKV com e sem obesidade do Estudo de Coorte Clínica de Gestantes ZIKV (Rio de Janeiro, Brasil). Inicialmente, verificamos que a obesidade, na ausência de infecção, correlaciona com o aumento do peso placentário, não alterando a expressão transcricional constitutiva de fatores antivirais ou de IFNs tipo I/III. Porém, interessantemente, quando associada à infecção pelo ZIKV, foi observado a diminuição da expressão transcricional de RIG-I, IRF3 e IFIH1 (gene precursor da proteína MDA-5). A expressão de proteínas também confirmou a diminuição da expressão de RIG-I e IRF-3 na porção decidual placentária de parturientes com obesidade e infectadas pelo ZIKV. Esta alteração foi observada independentemente da ocorrência de microcefalia nos recém-natos. Também foi possível, preliminarmente, avaliar um modelo *in vitro* para obesidade, utilizando o ácido graxo de cadeia curta palmitato como estímulo na caracterização de macrófagos placentários humanos purificados. Foi observado aumento da resposta inflamatória em consequência ao palmitato. Esses achados mostram que a obesidade, associada à infecção pelo ZIKV, leva a um comprometimento da via de sinalização jusante do IFN tipo I na interface materno-fetal. O controle da obesidade gestacional é um dos fatores cruciais para a manutenção da saúde materna e determinante na formação e desenvolvimento fetal.

Palavras-chave: obesidade; gestação; placenta; Zika vírus; fatores antivirais

ABSTRACT

BRANCO, ACCC. **Effect of obesity on antiviral immunity of the maternal-fetal interface in Zika virus infection.** 2023. 97p. Thesis (PhD thesis in Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

The incidence of obesity is increasing worldwide, especially in women, which can influence the outcome of pregnancy. During pregnancy, viral infections enhance the risk to the mother, the placental unit, and the fetus. The ZIKV outbreak in Brazil was responsible for the congenital Zika syndrome (CZS), with devastating consequences such as microcephaly in newborns. In this project, we analyzed the impact of maternal overweight/obesity on the expression of antiviral factors in placental tissue, in the presence or absence of gestational ZIKV infection. We analyzed placental samples from women with and without obesity, from 34 public health units (São Paulo) and from ZIKV-infected mothers with and without obesity from the ZIKV Clinical Cohort Study of Pregnant Women (Rio de Janeiro, Brazil). Initially, we found that obesity, in the absence of infection, correlates with increased placental weight, not altering the constitutive transcriptional expression of antiviral factors or type I/III IFNs. However, interestingly, when associated with ZIKV infection, a decrease in the transcriptional expression of RIG-I, IRF3 and IFIH1 (precursor gene of the MDA-5 protein) was observed. Protein expression also confirmed the decreased expression of RIG-I and IRF-3 in the placental decidual portion of obese mothers infected with ZIKV. This change was observed regardless of the occurrence of microcephaly in newborns. It was also possible, preliminarily, to evaluate an *in vitro* model for obesity, using the short-chain fatty acid palmitate as a stimulus in the characterization of purified human placental macrophages. An increase in the inflammatory response in consequence to palmitate has been observed. These findings show that obesity, associated with ZIKV infection, leads to impairment of the IFN type I downstream signaling pathway at the maternal-fetal interface. The control of gestational obesity is one of the crucial factors for maintaining maternal health and a determinant factor in fetal formation and development.

Keywords: obesity; pregnancy; placenta; Zika virus; antiviral factors

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de mediadores pró-inflamatórios induzidos por ácidos graxos saturados via ativação de TLR4	18
Figura 2. Funções fisiológicas da leptina e seus efeitos na imunidade inata e adaptativa.....	20
Figura 3. Rotas potenciais de transmissão vertical do Zika Vírus	28
Figura 4. Características maternas e fetais da coorte de parturientes com obesidade pré-gestacional	44
Figura 5. Tecido placentário de parturientes com e sem obesidade pré-gestacional exibe perfil semelhante de expressão transcricional de fatores antivirais	45
Figura 6. Dados demográficos de mães com e sem obesidade infectadas por ZIKV e seus recém-nascidos.....	50
Figura 7. Alteração na expressão de fatores antivirais placentários desencadeados pela obesidade gestacional durante infecção congênita por ZIKV	53
Figura 8. Diminuição da expressão proteica de RIG-I na decídua de mães com obesidade e infectadas pelo ZIKV	56
Figura 9. Diminuição na expressão da proteína IRF-3 na decídua placentária de mães infectadas pelo ZIKV com obesidade	57
Figura 10. Expressão de IFN- α na placenta de mães infectadas pelo ZIKV com obesidade.....	58
Figura 11. Expressão de receptor de folato β (FR β) e marcadores de inflamação/regulação em macrófagos placentários humanos tratados com ácido fólico e estimulados com palmitato.....	61
Figura 12. Perfil de produção de citocinas em macrófagos placentários humanos tratados com ácido fólico e estimulados com palmitato	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos usados nos experimentos de real-time PCR.....	36
Tabela 2 - Dados demográficos das gestantes com e sem obesidade.....	43
Tabela 3 - Dados demográficos das gestantes com e sem obesidade infectadas com Zika virus (ZIKV).....	49
Tabela 4 - Características histopatológicas das placentas de gestantes com e sem obesidade e infecção por ZIKV.....	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Obesidade	16
1.2 Obesidade e infecções virais.....	19
1.3 Interação materno-fetal e obesidade	23
1.4 Infecção por Zika vírus e transmissão vertical.....	25
2 OBJETIVO	31
2.1 Objetivos específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Casuística.....	33
3.2 Reação em cadeia da polimerase	35
3.3 Análise histopatológica da placenta	37
3.4 Expressão de fatores antivirais por imuno-histoquímica	37
3.5 Obtenção de macrófagos placentários humanos	38
3.6 Tratamento dos macrófagos placentários com ácido fólico e estímulo com palmitato.....	39
3.7 Imunofluorescência dos macrófagos placentários.....	39
3.8 Caracterização de macrófagos placentários por citometria de fluxo	39
3.9 Dosagem de citocinas e outros fatores solúveis	40
3.10 Análise estatística.....	40
4 RESULTADOS	42
4.1 Características das parturientes com ou sem obesidade pré-gestacional .	42
4.2 Perfil de transcritos imunes antivirais no tecido placentário em gestantes com e sem obesidade na ausência de infecção	45
4.3 Dados demográficos de mães com obesidade e infectadas por ZIKV e características histopatológicas do tecido placentário.....	47
4.4 Diminuição na expressão de fatores imunes antivirais em tecido placentário de parturientes com obesidade e infectadas por ZIKV	52
4.5 Alteração do eixo IRF-3/RIG-I em tecido placentário de gestantes com obesidade na infecção por ZIKV	54
4.6 Influência do tratamento com ácido fólico e estímulo com palmitato em macrófagos placentários humanos.....	59
5 DISCUSSÃO	65

6 CONCLUSÕES	72
7 REFERÊNCIAS	73
8 APÊNDICES	81
8.1 Aprovação do trabalho na Comissão de Ética.....	81
8.2 Atividades acadêmicas desenvolvidas no período	91
8.2.1 Estágio de pesquisa no exterior	91
8.2.2 Participação em Eventos.....	91
8.2.3 Organização de Eventos	91
8.2.4 Revisão em Periódicos.....	92
8.2.5 Prêmios e Divulgação Científica.....	92
8.3 Produção científica no período.....	93
8.3.1 Artigos publicados em primeira autoria	93
8.3.2 Artigos publicados em co-autoria	94

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

Durante as últimas décadas, o aumento nos índices de obesidade mundial vem salientando a sua relação com o agravamento da saúde e na suscetibilidade a infecções e outras comorbidades. O número de pessoas com obesidade no mundo praticamente triplicou desde 1975, atingindo 1.9 bilhões de pessoas em 2016 (WHO 2018), e, segundo uma previsão publicada pela Federação Mundial de Obesidade, em 2035, seguindo as tendências atuais, 51% da população mundial, ou mais de 4 bilhões de pessoas, viverão com sobrepeso ou obesidade (WORLD OBESITY ATLAS, 2023). No Brasil, o Ministério da Saúde divulgou, de acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL 2022), que mais da metade dos adultos (60,3%, o que representa 96 milhões de pessoas) apresenta excesso de peso (Índice de massa corpórea, IMC, ≥ 25), com prevalência maior no público feminino (62,6% do total).

A obesidade é definida como um acúmulo de tecido adiposo branco anormal ou excessivo, podendo estar relacionada a distúrbios como resistência à insulina, diabetes e, conseqüentemente, síndrome metabólica (JAMES, 2008). Nesse contexto, o tecido adiposo é caracterizado por uma inflamação crônica e pode comunicar-se diretamente com o sistema imune, produzindo altas concentrações de mediadores pró-inflamatórios como citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e adipocinas, que levam ao aumento da permeabilidade capilar e extravasamento de plasma (CALABRO; CHANG; WILLERSON; YEH, 2005).

Esta comunicação entre tecido adiposo e sistema imune inicia-se com a ativação de receptores da imunidade inata, principalmente o receptor *Toll-like 4* (TLR4), que tem como ligante o lipopolissacáride bacteriano (LPS). A ativação de TLR4 tem sido observada ocorrer também por ácidos graxos saturados (SFAs), circulantes em indivíduos obesos, principalmente o palmitato (ROCHA; CALDAS; OLIVEIRA; BRESSAN *et al.*, 2016). Os SFAs podem ligar-se diretamente com CD14 em sua forma solúvel e, desta forma, serem reconhecidos pelo complexo CD14/TLR4, agindo como ligante não microbiano deste receptor (LEE; YE; GAO; YOUN *et al.*, 2003).

Além disto, como consequência da ação de SFAs, também é possível a ativação indireta do TLR4 pela modificação da microbiota, levando ao aumento de LPS (MOREIRA; TEXEIRA; FERREIRA; PELUZIO *et al.*, 2012). Podem ainda induzir o estresse oxidativo, aumentando a produção de lipoproteínas de baixa densidade minimamente modificadas (mmLDL), que são reconhecidas pelo complexo CD14/TLR4 (BOULLIER; LI; QUEHENBERGER; PALINSKI *et al.*, 2006). A sua forma oxidada (oxLDL) já pode ser reconhecida pelo complexo CD36/TLR4/TLR6 (STEWART; STUART; WILKINSON; VAN GILS *et al.*, 2010). Após ativação do TLR4, vias intracelulares são ativadas e culminam na ativação de fatores nucleares como IRF3 e NF- κ B, acarretando a produção de citocinas pró inflamatórias (LIQIANG; FANG-HUI; MINGHUI; YANAN *et al.*, 2023) e via da ciclooxigenase 2 (COX2), corroborando o estado de inflamação crônica observado nos indivíduos obesos (Figura 1).

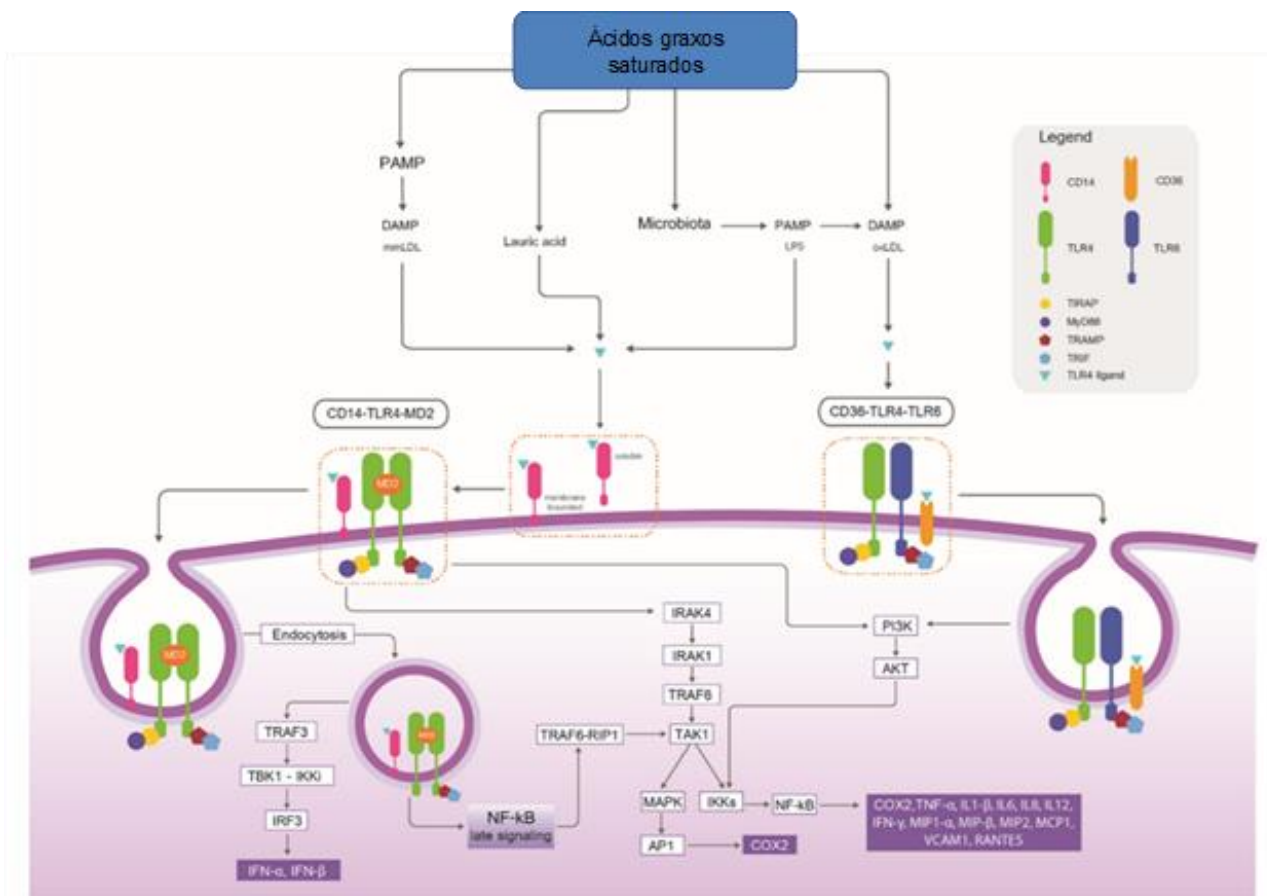


Figura 1. Produção de mediadores pró-inflamatórios induzidos por ácidos graxos saturados via ativação de TLR4. Ativação do complexo CD14/TLR4/MD2 diretamente por SFAs ou indiretamente, através da indução de mmLDL e alteração da microbiota e oxLDL, ativando CD36/TLR4/TLR6, culminando na ativação de vias endocíticas, fator nuclear κB (NF-κB), aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias e via COX2. Modificado de Rocha, Caldas et al. 2016.

Nesse contexto de inflamação, os macrófagos representam uma população celular que sofre modulação direta pela interação com adipócitos e, indiretamente, por ativação de fatores circulantes na obesidade (MCKERNAN; VARGHESE; PATEL; SINGER, 2020). Estas células podem acumular-se no tecido adiposo e receber sinais inflamatórios como os SFAs, TNF, IL-1β e hipóxia do meio extracelular, que mudam seu metabolismo, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS),

colaborando com o estabelecimento do fenótipo inflamatório M1 (ENGIN, 2017). A alteração metabólica decorrente da inflamação do tecido adiposo branco, como aumento das vias de glicólise aeróbica, tem sido relacionada a mudança de perfil M1 de macrófagos e resistência à insulina, auxiliando na compreensão da obesidade e diabetes (CASTOLDI; NAFFAH DE SOUZA; CÂMARA; MORAES-VIEIRA, 2015).

Além do processo inflamatório, observado em indivíduos com obesidade, tem sido evidenciado que este estado é um fator de risco que debilita o sistema imune de diferentes formas, podendo ocasionar o aumento de infecções (FALAGAS; KOMPOTI, 2006).

1.2 Obesidade e infecções virais

A existência de estudos epidemiológicos que evidenciam a correlação entre sobrepeso/obesidade com a ocorrência de diversos tipos de infecções é crescente. A síndrome metabólica decorrente da obesidade aumenta a prevalência de infecções do trato respiratório, infecções de pele, por *Candida Albicans*, dentre outras (PUGLIESE; LICCARDI; GRAZIADIO; BARREA *et al.*, 2022).

Várias hipóteses tentam elucidar os mecanismos envolvidos na baixa imunidade observada em indivíduos obesos. Complicações metabólicas, aspectos nutricionais, inatividade física, desbalanço crônico hormonal e microambiente aumentado de adipocinas são apontados como principais determinantes no aumento de infecções virais na obesidade. Por mecanismos pleiotrópicos, o indivíduo neste estado tem uma disfunção imune que afeta diretamente seus mecanismos de vigília e defesa (GUGLIELMI; COLANGELI;

D'ADAMO; SBRACCIA, 2021). Altas concentrações de leptina produzidas pelo tecido adiposo contribuem substancialmente para uma desregulação do sistema imune, uma vez que, fisiologicamente, este hormônio tem efeito em grande parte das células imunes, como aumento de respostas Th1, Th17, aumento de produção de citocinas inflamatórias na maior parte das células imunes inatas, além de influenciar no aumento de sua sobrevivência (Figura 2).

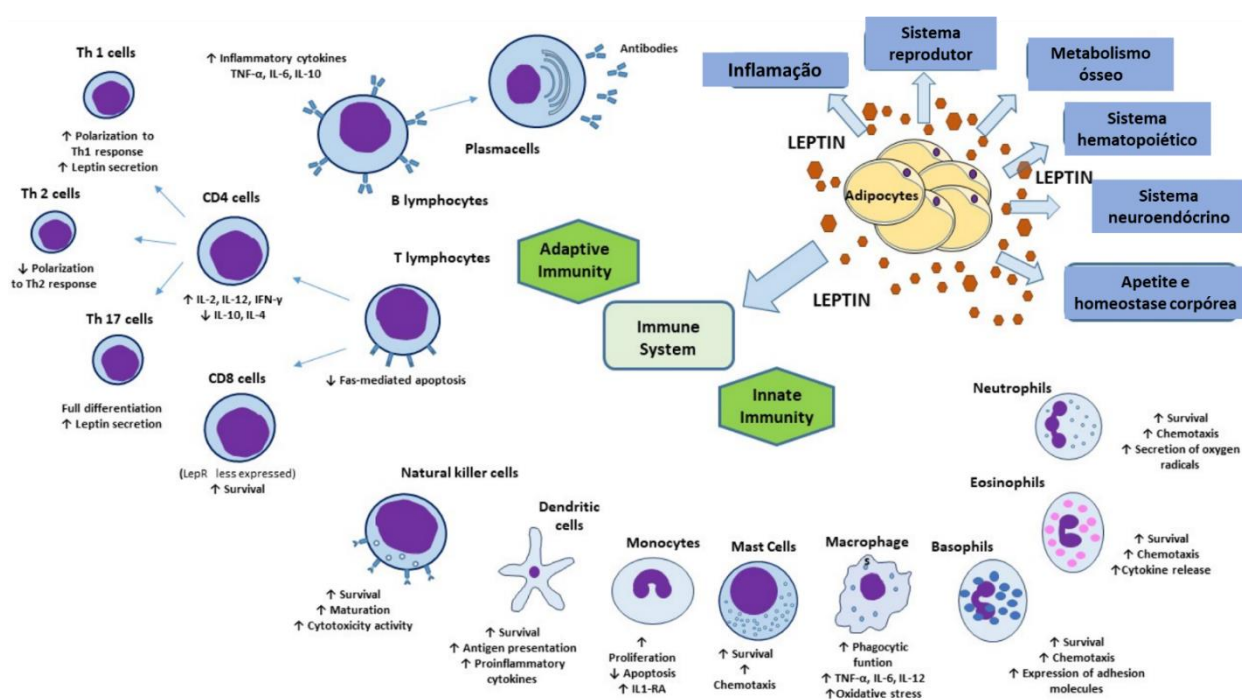


Figura 2. Funções fisiológicas da leptina e seus efeitos na imunidade inata e adaptativa. A leptina, produzida por adipócitos, exerce funções fisiológicas em diversos sistemas do corpo, como reprodutor, hematopoiético, entre outros. No sistema imune, modula a atividade e a função de neutrófilos, monócitos/macrófagos, eosinófilos, mastócitos, células NK e DCs. Na imunidade adaptativa, a leptina afeta a maturação e a sobrevivência das células T. Nas células T de memória, a leptina favorece a mudança para respostas das células Th1 e facilita as respostas Th17, além de afetar negativamente a expansão de Tregs. A leptina também ativa as respostas das células B. Modificado de Guglielmi, Colangeli et al. 2021.

Particularmente na resposta humoral, o status de sobrepeso pode se manifestar inclusive na função dos linfócitos B, induzindo aumento da secreção

de autoanticorpos, o que tem sido associado à inadequada resposta vacinal, como contra influenza, hepatite B, tétano, entre outras (FRASCA; BLOMBERG, 2020). Mais recentemente também foi evidenciado que o estado de obesidade acelera o declínio de anticorpos neutralizantes da vacinação contra a COVID-19, contribuindo para o maior risco a infecções e hospitalizações decorrentes da doença (CHAUVIN; RETNAKUMAR; BAYRY, 2023).

Em modelo murino, no tecido adiposo branco, acompanhado do estado de obesidade, foi observado aumento de linfócitos T infiltrantes específicos após desafio com o vírus linfocítico da coriomeningite (LCMV). Após um novo desafio, a resposta em camundongos obesos foi exacerbada em relação ao grupo eutrófico e, como consequência, constatou-se uma redução na sobrevivência, possivelmente devido ao dano tecidual exacerbado em outros tecidos como pancreatite, alto nível de lipase e calcificação do próprio tecido adiposo (MISUMI; STARMER; UCHIMURA; BECK *et al.*, 2019).

Com base em dados epidemiológicos, foi demonstrado que a obesidade infantil também está associada com a gravidade da infecção pediátrica (ZULKIPLI; DAHLUI; JAMIL; PERAMALAH *et al.*, 2018). Em 335 pacientes internados na Malásia com dengue, confirmada pela presença do antígeno NS1 do envelope viral, a incidência de manifestações clínicas associadas à infecção foi maior no grupo com obesidade quando comparado ao grupo sem obesidade (TAN; NGIM; LEE; RAMADAS *et al.*, 2018).

Ainda na infecção por DENV, um estudo que realizou uma meta-análise avaliando outros 47 estudos confirmou que a obesidade, juntamente com a hipertensão e o diabetes, foram as comorbidades mais associadas aos casos

graves de infecção. Em contraste com outro vírus da família *Flaviviridae*, o Vírus do Oeste do Nilo (WNV), em que a prevalência de hipertensão, diabetes e doenças cardiovasculares foi maior, não relacionou a obesidade como uma comorbidade associada à gravidade da infecção (BADAWI; VELUMMAILUM; RYOO; SENTHINATHAN *et al.*, 2018).

A avaliação de comorbidades que aumentam o risco de infecções virais torna-se ainda mais importante em cenários de pandemia. Foi evidenciando, após a pandemia de H1N1 em 2009, que a obesidade é um fator de risco para a infecção (VAN KERKHOVE; VANDEMAELE; SHINDE; JARAMILLO-GUTIERREZ *et al.*, 2011). Em modelo murino de infecção por influenza, também foi demonstrado que camundongos obesos exibiam maior mortalidade e morbidade quando comparados a camundongos não obesos (EASTERBROOK; DUNFEE; SCHWARTZMAN; JAGGER *et al.*, 2011), embora o mecanismo que levaria ao declínio da sobrevivência ainda seja uma lacuna.

Mais recentemente, durante a pandemia de COVID-19, a obesidade voltou a ser uma preocupação quando as alterações causadas por esse estado foram evidenciadas como um dos grandes fatores de risco para a infecção por SARS-Cov-2 (ALBERCA; OLIVEIRA; BRANCO; PEREIRA *et al.*, 2021). Na França, foi avaliado o IMC de 124 pacientes internados na unidade de terapia intensiva, constatando-se uma alta frequência de pacientes com obesidade e o consequente agravamento das condições da COVID-19 e do uso de ventilação mecânica invasiva (SIMONNET; CHETBOUN; POISSY; RAVERDY *et al.*, 2020).

O crescente aumento nos índices de obesidade mundial e nacional, aliado ao agravamento de outras comorbidades e infecções, evidenciam a importância

do maior entendimento da influência dessa condição em diferentes fases de vida, incluindo na gestação, que pode contribuir diretamente no perfil imunológico e metabólico dos fetos.

1.3 Interação materno-fetal e obesidade

A gestação é um dos fenômenos imunológicos mais interessantes de regulação da resposta alogênica, considerando que o sistema imune materno reconhece os aloantígenos paternos no feto, mas não os rejeita. Um mecanismo complexo de tolerância tem sido proposto na gestação, em especial na interface materno-fetal, desde as observações de Peter Medawar (1953) há 70 anos.

Em humanos, as células placentárias, como o trofoblasto viloso, estão ancoradas na decídua materna e se diferenciam em sinciotrofoblasto, citotrofoblasto e trofoblasto extra-viloso (EVT). Os trofoblastos vilosos são banhados pelo sangue materno, liberam exossomas placentários, micropartículas, células tronco fetais e hormônios, essenciais durante o curso da gestação, como a β gonadotrofina coriônica humana (β -hCG) (KNÖFLER; HAIDER; SALEH; POLLHEIMER *et al.*, 2019). Outra população celular presente na face fetal placentária são as células de Hofbauer (HBCs), macrófagos residentes com fenótipo regulador M2 (SELKOV; SELUTIN; PAVLOVA; KHROMOV-BORISOV *et al.*, 2013). Os macrófagos placentários fetais expressam marcadores como CD14, CD68, marcadores de perfil M2 como CD163 e possuem papel essencial no controle da resposta inflamatória (REYES; GOLOS, 2018).

São vários os mecanismos que promovem o ambiente tolerogênico placentário, tais como: a enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) que degrada

o triptofano, o controle da ativação de células NK uterinas (uNK), alta produção de progesterona, expressão de moléculas não clássicas de HLA (HLA-G), a presença de células mieloides supressoras (MDSC), macrófagos de perfil M2, células T reguladoras, aumento na produção de citocinas reguladoras como TGF- β e IL-10, e de moléculas inibidoras do sistema complemento. O estado tolerogênico ocorre em gestações saudáveis tanto na interface materno-fetal, como sistemicamente, pois os antígenos fetais são circulantes e, portanto, podem exercer influência em tecidos maternos extrauterinos (KÖSTLIN; HOFSTÄDTER; OSTERMEIR; SPRING *et al.*, 2016; PÉREZ LEIRÓS; RAMHORST, 2013; SVENSSON-ARVELUND; MEHTA; LINDAU; MIRRASEKHIAN *et al.*, 2015; WEI; LAI; ZHAO; ZHANG *et al.*, 2021).

Contudo, na presença de intercorrências gestacionais como obesidade, pré-eclâmpsia, diabetes gestacional, infecções virais, bacterianas, entre outras, pode ocorrer quebra da tolerância e indução de um processo inflamatório. Nos EUA, nos anos de 2004 e 2005, foi observado uma prevalência de 18,7% de obesidade pré-gestacional (CHU; KIM; BISH, 2009). No Brasil, o sobrepeso e a obesidade pré-gestacional aumentaram de 22,6% para 28,8% e de 9,8% para 19,8%, respectivamente, entre 2008 e 2018 (CARRILHO; FARIAS; BATALHA; COSTA *et al.*, 2020).

O excesso de peso no período pré-gestacional é um dos fatores de risco à saúde materna e fetal. Em uma coorte da Suécia, foi mostrado que a obesidade materna é um fator predispositor ao nascimento pré-termo (CNATTINGIUS; VILLAMOR; JOHANSSON; EDSTEDT BONAMY *et al.*, 2013). No Brasil, além da questão nutricional, foi evidenciado que os anos de escolaridade e gestação de adolescentes podem contribuir com a obesidade gestacional (DAMASO;

BETTIOL; CARDOSO; VIEIRA *et al.*, 2023), além da associação entre a obesidade das gestantes e diabetes gestacional, tromboembolismo, realização de cesariana, infecção puerperal, risco de pré-eclâmpsia e macrosomia fetal na coorte brasileira (CIDADE; MARGOTTO; PERAÇOLI, 2011; SEABRA; PADILHA; JA; C, 2011). Há evidências de que a comunicação intercelular entre placenta e tecido adiposo pode ser feita por exossomas derivados de adipócitos, contribuindo assim para o quadro de diabetes mellitus gestacional (DMG) (JAYABALAN; NAIR; NUZHAT; RICE *et al.*, 2017).

Ademais, tem sido descrita a relação entre obesidade gestacional e a maior incidência de infecções, podendo acometer também o feto, como por exemplo na infecção por influenza (KARLSSON; MARCELIN; WEBBY; SCHULTZ-CHERRY, 2012), sepse (ORR; CHIEN, 2015), e, mais recentemente, para SARS-CoV-2 (LEAL; MERCKX; FELL; KUCHENBECKER *et al.*, 2021). A imunidade inata e sua regulação, atuando em diferentes aspectos da ativação celular e na resposta antiviral, são alguns dos fatores fundamentais para entender a patologia e suscetibilidade às infecções virais nessas condições, em especial do vírus Zika.

1.4 Infecção por Zika vírus e transmissão vertical

O Zika vírus (ZIKV) é um vírus de grande importância médica global que pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*. Os casos no Brasil exibiram um pico de ocorrência em 2016 quando o Ministério da Saúde registrou 213.350 casos. Contudo, em 2017, esse número já caiu para 17.593, em 2021 foram registrados 6.753, e, recentemente, os casos notificados voltaram a crescer, sendo que só no primeiro semestre de 2023 foram registrados 8.413 casos de

infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2023). A infecção por ZIKV, no Brasil, foi considerada a mais grave já relatada na América Latina, principalmente devido à associação entre a infecção durante a gestação e a ocorrência de microcefalia em recém-natos (CAROD-ARTAL, 2016). O Boletim do Ministério da Saúde brasileiro, em 2020, informou a confirmação até então de 4.595 casos de microcefalia sugestivos de infecção congênita por ZIKV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2020).

De forma similar a outras arboviroses, a patogênese da infecção pelo ZIKV se inicia pela sua inoculação no hospedeiro através da picada do mosquito-vetor. Assim, a pele é um sítio anatômico primário de infecção e, de fato, foi constatado que fibroblastos, queratinócitos e células dendríticas (DCs) imaturas da epiderme são permissivas ao vírus (HAMEL; DEJARNAC; WICHIT; EKCHARIYAWAT *et al.*, 2015). Ainda, a inflamação induzida pela picada do mosquito promove o recrutamento de fagócitos, que podem carrear o vírus, favorecendo sua disseminação pelo organismo (PINGEN; BRYDEN; PONDEVILLE; SCHNETTLER *et al.*, 2016). Mais recentemente, também foi evidenciado que o ZIKV pode atingir os linfonodos rapidamente após a sua entrada no organismo, infectando os macrófagos residentes CD169+ e aumentando a viremia (REYNOSO; GORDON; KALIA; AGUILAR *et al.*, 2023).

Em adultos, a maioria das infecções pelo ZIKV é benigna e auto-limitada, caracterizada por um quadro febril agudo ou mesmo assintomático. No entanto, um número diminuto de pacientes desenvolve a síndrome de Guillain-Barré, observada como uma neuropatia axonal motora (LEONHARD; TAN; VAN DER EIJK; REISIN *et al.*, 2021). Apesar da relevância da doença em adultos, o acometimento neonatal é a grande problemática na infecção pelo ZIKV. Na

síndrome congênita, a principal manifestação é a microcefalia, definida como uma redução da circunferência occipitofrontal. Também se observam lesões cerebrais, má formação do cerebelo, tronco encefálico, tálamo e comprometimento ocular, como calcificações e atrofia macular. Quando não inviabilizam o feto ou acarretam a morte prematura do recém-nato, as más formações neurológicas geram um déficit cognitivo permanente (ADAMSKI; BERTOLLI; CASTAÑEDA-ORJUELA; DEVINE *et al.*, 2018).

A microcefalia indica que o ZIKV interfere no desenvolvimento neurológico e modelos *in vitro* mostraram que o vírus consegue infectar progenitores neuronais, desregulando os ciclos de replicação celular e induzindo apoptose destas populações (TANG, 2016). Ainda, as células remanescentes parecem comportar-se como reservatórios do vírus, sem que haja ativação imunológica significativa – o que indica que a infecção poderá ter repercussões mesmo após vários meses do contato (HANNERS; EITSON; USUI; RICHARDSON *et al.*, 2016). Recentemente, nosso grupo mostrou que monócitos de recém-natos humanos e adultos saudáveis podem ser eficientemente infectados com ZIKV *in vitro*, apontando possíveis mecanismos celulares envolvidos no transporte do vírus até a barreira hematoencefálica fetal (YOSHIKAWA; PIETROBON; BRANCO; PEREIRA *et al.*, 2019).

Embora os dados com modelos humanos sejam limitados ao sistema *in vitro*, modelos experimentais com camundongos geneticamente deficientes do receptor de IFN tipo I comprovaram a relação entre a infecção pelo ZIKV e a indução da microcefalia fetal (CUGOLA; FERNANDES; RUSSO; FREITAS *et al.*, 2016; LAZEAR; STRINGER; DE SILVA, 2016). Modelos em primatas não humanos, como estudos em macacos Rhesus, mostraram que a infecção por

ZIKV durante o primeiro trimestre da gestação acarreta danos neurológicos nos fetos (MARTINOT; ABBINK; AFACAN; PROHL *et al.*, 2018). Desde que foi estabelecida a relação do ZIKV com o acometimento fetal, uma das principais questões estudadas são os mecanismos de passagem transplacentária. Alguns mecanismos envolvidos na transmissão vertical do ZIKV tem sido apontados como translocação placentária, células infectadas, vírions livres ou ainda, por microvesículas, como os exossomas (ZHANG; LI; YUAN, 2016).

Rotas potenciais de transmissão vertical do Zika Vírus

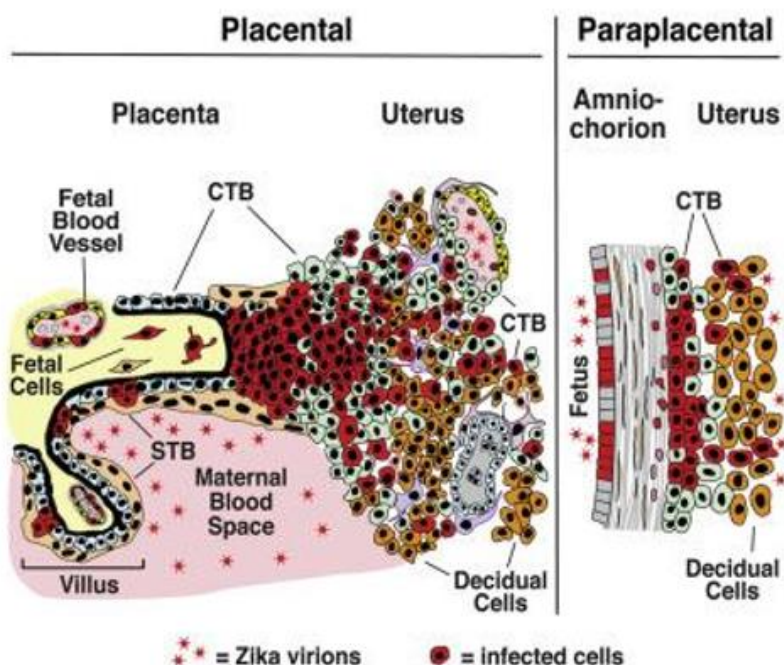


Figura 3. Rotas potenciais de transmissão vertical do Zika Vírus. Esquema representativo da interface materno-fetal e possíveis rotas para infecção fetal de Zika vírus e sua disseminação no útero. O desenho indica o lado materno (decídua) e fetal (vilo), com a passagem viral através de vírions livres ou células infectadas (citotroblastos, CTBs e sinciotroblastos, STBs). Modificado de Tabata, Pettitt *et al.* 2016 (TABATA; PETITT; PUERTA-GUARDO; MICHLMAYR *et al.*, 2016).

Embora os achados mostrem que trofoblastos isolados de placentas a termo exibem resistência natural à infecção pelo ZIKV devido à secreção

constitutiva de interferon (IFN) tipo III (BAYER; LENNEMANN; OUYANG; BRAMLEY *et al.*, 2016), dados obtidos de modelos experimentais mostram que a placenta (e o conseqüente acometimento fetal) pode ser eficientemente infectada no começo da gestação (MINER; CAO; GOVERO; SMITH *et al.*, 2016). Dados publicados evidenciaram que a SCZ está correlacionada com a exacerbação de IFN tipo I e insuficiência no IFN tipo III em tecido placentário humano após a infecção por Zika, formando uma resposta desbalanceada modulada pelo genótipo rs2257167 de IFNAR1 (AZAMOR; CUNHA; DA SILVA; BEZERRA *et al.*, 2021). Além disso, também foi observado que os macrófagos placentários fetais podem funcionar como um nicho replicativo para o ZIKV (QUICKE; BOWEN; JOHNSON; MCDONALD *et al.*, 2016), indicando que as células imunes exercem um papel importante na patogênese da infecção.

Em síntese, o surto epidêmico recente por ZIKV, aliado à problemática da infecção congênita associada a casos de microcefalia fetal, aumentou os estudos deste vírus por cientistas de todo o mundo, na tentativa da maior compreensão de sua fisiopatologia, tropismo neurológico, bem como passagem pela placenta, que, em muitas outras infecções, age como barreira protetora.

Considerando o aumento nos índices de obesidade mundial, que acomete diferentes fases de vida, dentre elas o período gestacional, e a influência desta condição nutricional nas células imunológicas, podendo instalar um processo inflamatório crônico, e, conseqüentemente favorecimento de outras comorbidades e infecções - a hipótese deste projeto é que a obesidade pré-gestacional induz alterações na resposta imune antiviral placentária, em especial nos macrófagos, favorecendo infecções como a por ZIKV, tornando-se um fator de risco para o feto.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar o impacto do sobrepeso/obesidade materna na resposta imune antiviral placentária em gestantes infectadas pelo Zika vírus na gestação.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar dados clínicos e a expressão de fatores antivirais em placentas de parturientes com obesidade na ausência da infecção;
- Analisar a influência da obesidade pré-gestacional nos dados clínicos, na histopatologia placentária e na expressão de fatores antivirais em placentas de parturientes com infecção por ZIKV;
- Verificar a expressão proteica de componentes imunes antivirais previamente selecionados pela expressão de seu mRNA em placentas de gestantes com obesidade pré-gestacional e infecção por ZIKV;
- Avaliar modelo de estudo *in vitro* da influência da obesidade em macrófagos placentários humanos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Este estudo utilizou amostras de gestantes provenientes de três projetos colaborativos:

(i) Foram recrutadas gestantes com e sem sobrepeso/obesidade não infectadas pelo ZIKV, para coleta de amostras de placenta no momento do parto. No total, 39 gestantes, com base do Índice de massa corpórea (IMC) pré-natal, foram consideradas sem obesidade (IMC 18,5-24,9; n=12) e com sobrepeso/obesidade (IMC 25-39,9; n =28). As mulheres foram selecionadas em 34 unidades públicas de saúde da cidade de Araraquara, São Paulo, a partir de parceria com a Professora Patrícia Rondó, coordenadora do Estudo Coorte da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. O termo de consentimento informado aprovado pela Comissão de Ética foi: 59787216.2.0000.5421. Foram incluídas amostras de parto normal ou cesariana, de mulheres maiores de 18 anos e com idade gestacional superior a 37 semanas. Os critérios de exclusão foram sorologia positiva para sífilis, HIV-1, hepatites B, C e toxoplasmose, bem como complicações clínicas ou obstétricas associadas ao aumento de complicações pós-operatórias. Placentas e amostras de partos anteriores a 37 semanas gestacionais e pós-termo também foram excluídas.

(ii) No total, foram incluídas 30 mulheres infectadas por ZIKV durante a gravidez, em parceria com o Dr. Zilton Vasconcelos, coordenador do Estudo Coorte Clínica de Gestantes ZIKV e seus recém-natos do Hospital Materno-infantil do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Fiocruz, no Rio de Janeiro, Brasil, coletados no período entre 2015-2016,

(IRB/CAAE: 52675616.0.000.5269). A infecção congênita pelo ZIKV foi confirmada durante a gestação pelo PCR positivo de amostras de urina, sangue ou placenta. As participantes do estudo também foram subdivididas em grupo de placentas de mulheres sem obesidade (IMC 18,5-24,9; n=14) e com sobrepeso/obesidade (IMC 25-39,9; n=16). Esta coorte incluiu mulheres grávidas adultas com mais de 18 anos de idade e os critérios de exclusão foram a infecção por HIV, infecção anterior pelo vírus da Dengue e Chikungunya, bem como outras infecções congênitas, conhecidas por causar danos neurológicos infantis (TORCH – toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus e herpes simples vírus). Após serem informadas do conteúdo da pesquisa e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, as amostras de placenta foram coletadas no momento do parto na região de inserção do cordão umbilical. Os dados clínicos de neonatos que tiveram um resultado neurológico adverso no momento do nascimento, como microcefalia (Escore Z do perímetro cefálico menor que -2), foram utilizados neste estudo.

(iii) Durante período de estágio na Faculdade de Medicina da Universidade de Indiana, Indianápolis, IN, EUA, foram coletadas amostras de placenta em parceria com o projeto em andamento do Dr. David Aronoff, que previa biorrepositório *“The Building Blocks of Pregnancy Biobank: A Biorepository of Specimens and Pregnancy Outcomes”*, sob comitê de ética número #1011003384. Foram incluídas amostras de parto cesárea, de gestantes maiores de 18 anos, idade gestacional acima de 37 semanas e IMC 18,5-24,9, n=3. Foram considerados critérios de exclusão sorologia positiva para sífilis, HIV-1, hepatite B e C, bem como intercorrências clínicas ou obstétricas associadas ao aumento de complicações pós-operatórias. Também foram excluídas

placentas e amostras de recém-natos nascidos antes de 37 semanas gestacionais e pós-termo. Para obtenção dos dados clínicos, laboratoriais e amostras de placenta, as gestantes e/ou responsáveis foram informados do conteúdo da pesquisa e da necessidade da coleta de amostras, assinando um termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2 Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para fatores antivirais foi realizada em amostras de vilo coriônico e decídua de placenta, armazenados em solução de RNA later (Qiagen, Venlo, Holanda), de mulheres não infectadas e infectadas pelo ZIKV, com e sem obesidade. Os iniciadores dos genes (STING, RIG-I, MxA, ISG15, TLR3, TLR7, IRF-3, IFNA, IFNB e IFNL) assim como o controle interno (YWHAZ), foram sintetizados pela Invitrogen (Califórnia, EUA) de acordo com a Tabela 1. A extração de RNA foi feita com o reagente RNeasy Mini Kit (Qiagen) e o cDNA foi construído usando iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Califórnia, EUA), de acordo com as instruções dos fabricantes. O ensaio foi conduzido com o reagente SYBR Green no sistema 7500 (Applied Biosystems, Waltham, EUA) e a análise dos dados foi realizada com Software 7500 v2.0.6, conforme método descrito por Livak e Schmittgen, em 2001 (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Referente as placentas de mulheres infectadas pelo ZIKV, utilizamos os dados do repositório, previamente publicados por Azamor et. al. 2021 (AZAMOR; CUNHA; DA SILVA; BEZERRA *et al.*, 2021), realizando novas análises biológicas e comparações entre subgrupos.

Tabela 1. Oligonucleotídeos usados nos experimentos de real-time PCR

Alvo	Sequência
TLR3	F: AGTGCCGTCTATTTGCCACA R: TGATTCTGTTGGATGACTGCT
TLR7	F: AATGTCACAGCCGTCCCTAC R: GCGCATCAAAAGCATTTACA
IRF-3	F: AGAGGCTCGTGATGGTCAAGGTT R: AGAGTGGGTGGCTGTTGGAAATG
STING	F: ATATCTGCGGCTGATCCTGC R: GGTCTGCTGGGGCAGTTTAT
RIG-I	F: CTGGACCCTACCTACATCCTG R: GGCATCCAAAAGCCACGG
MxA	F: AAGCTGATCCGCCTCCACTT R: TGCAATGCACCCCTGTATACC
ISG15	F: TGGCGGGCAACGAATT R: GGGTGATCTGCGCCTTCA
IFNA	F: AAATACAGCCCTTGTGCCTGG R: GGTGAGCTGGCATAACGAATCA
IFNB	F: CATTACCTGAAGGCCAAGGA R: CCATTGTCCAGTCCCAGAGG
IFNL	F: CGCCTTGGAAGAGTCACTCA R: GAAGCCTCAGGTCCCAATTC
YWHAZ	F: GCCACAATGTTCTTGGCCCATCAT

R: TGGTTGGTGACAAGACAGAAGGCT

3.3 Análise histopatológica da placenta

Nas amostras coletadas de placenta do grupo de gestantes com obesidade pré gestacional e infecção por ZIKV, foram realizados cortes histológicos de 4µm de espessura de biópsias de tecido emblocadas em parafina em lâminas silanizadas (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Os cortes histológicos foram desparafinizados em banhos de xilol e posteriormente hidratados em concentrações decrescentes de etanol. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e analisadas em microscópio. Foram considerados achados de necrose trofoblástica, vilite, intervilosite, trombos intervilos, hiperplasia das células de Hofbauer, necrose fibrinoide do vilo, calcificações vilosas, alterações da face fetal, nós sinciciais e inflamação decidual, classificadas de acordo com escore de intensidade (- ausência; + leve; ++ moderado; +++ intenso).

3.4 Expressão de fatores antivirais por imuno-histoquímica

Os cortes de placenta da coorte ZIKV+, em lâminas de vidro silanizadas, foram incubadas com anticorpo primário policlonal de coelho anti-IFNA4 (1:300, ab232899, Abcam, Boston, EUA), anticorpo monoclonal de coelho anti-IRF3 (1:60, ab76409, Abcam) ou anticorpo policlonal de cabra anti-RIG-I/DDX58 (1:30, ab111037, Abcam). Para o anticorpo IFNA4 foi utilizado o NovoLink Polymer Detection System Kit (Leica Microsystems Inc., Reino Unido), IRF3 com o Detection Micro Polymer Kit (Abcam) e RIG-I/DDX58 com o Stain MAX PO Universal Immuno-peroxidase Polymer (Nichirei Biosciences Inc., Tóquio, Japão), de acordo com as instruções dos fabricantes. As reações foram

visualizadas usando o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina-tetracloridrato (DAB; Sigma-Aldrich) e contracoradas com hematoxilina de Carazzi. Todas as reações foram acompanhadas por controles positivos (placenta e tecido de tonsila) e controles negativos. Para cada análise de proteína, foram utilizados cinco regiões aleatórias nas lâminas para as vilosidades placentárias e três regiões para a decídua. Para a quantificação foi utilizado o software Image-Pro plus versão 4.5.0.29, por meio da contagem da área positiva ou intensidade de densidade óptica (IDO) pela área total ou comprimento da membrana basal, para a decídua placentária. Para normalização, uma lente ocular de 10X foi usada para a decídua e 20X para a vilosidade placentária.

3.5 Obtenção de macrófagos placentários humanos

Após a dequitação da placenta, foram extraídos cotilédones placentários, separados da decídua basal, e lavados com PBS para remover o sangue circulante materno. O tecido foi fragmentado e colocado com solução de digestão estéril contendo 150 µg/mL de desoxirribonuclease (Sigma-Aldrich), 1 mg/mL de colagenase (Sigma-Aldrich) e 1 mg/mL de hialuronidase (Sigma-Aldrich). A placenta foi digerida por 1h à 37°C, agitando à 180 RPM. O tecido digerido foi filtrado em peneira metálica de 280 µm, seguido por telas de nylon de 180 e 80 µm. As células foram centrifugadas a 1500 RPM e ressuspendidas em gradiente de densidade Percoll (Sigma-Aldrich). Os macrófagos CD14+ foram isolados por seleção positiva, usando o sistema magnético de coluna de separação MACS® (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A pureza das amostras de macrófagos placentários foi considerada quando superior à 75%, determinada com base na positividade de CD68, por citometria de fluxo.

3.6 Tratamento dos macrófagos placentários com ácido fólico e estímulo com palmitato

Após a incubação por 18 horas dos macrófagos placentários em RPMI sem ácido fólico (Gibco) e com 10% de soro fetal bovino (Gibco), foram previamente tratados com ácido fólico 50 μ M (Sigma-Aldrich), por 1h, e posteriormente estimulados com ácido palmítico (palmitato, 400 μ M; Nu-Chek Prep, Elysian, EUA), por 24h. Após este período, o sobrenadante celular foi coletado, centrifugado e armazenado à -70°C, para posterior dosagem de fatores solúveis. As células foram divididas entre os experimentos de citometria celular e imunofluorescência.

3.7 Imunofluorescência dos macrófagos placentários

Foi realizada análise por imunofluorescência dos macrófagos placentários tratados com ácido fólico e estimulados com palmitato. Após esse período, as células foram lavadas, fixadas, bloqueadas e incubadas com anticorpos primários para CD68 e FR β (Abcam), secundários Dy594 (para CD68) e Dy488 (para FR β), além de coloração nuclear de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). As imagens foram capturadas pelo EVOS Digital Color Fluorescence Microscope (Invitrogen) em objetiva de 40X e as imagens capturadas foram processadas usando ImageJ e Adobe Photoshop.

3.8 Caracterização de macrófagos placentários por citometria de fluxo

A caracterização dos macrófagos placentários foi realizada pela marcação de moléculas extracelulares e intracelular (CD68). Os anticorpos utilizados para marcação foram: CD45 (APC Cy7), CD68 (BV421), receptor β de folato (FR β ;

APC), CD14 (BV711), CD80 (FITC), CD163 (PerCP-e-fluor 710), CD206 (BV650), FcR Block e marcador de viabilidade (AmCyan). A aquisição foi feita por citometria de fluxo (LSR Fortessa– BD Biosciences, San Jose, EUA) e a análise dos dados foi realizada utilizando-se o software FlowJo™.

3.9 Dosagem de citocinas e outros fatores solúveis

Foi determinada a presença de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-1RA, IL-10, Arginase e IP-10 nos sobrenadantes dos macrófagos estimulados utilizando-se kit comercial de *Bead Array* (LEGENDPlex™, BioLegend, San Diego, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A aquisição foi feita no citômetro de fluxo (LSR Fortessa–BD Biosciences) e a análise dos dados foi feita pelo LEGENDplex Data Analysis Software (BioLegend). Os limites de detecção foram: 1.4pg/mL para TNF- α , 1.1pg/mL para IL-6, 1.3pg/mL para IL-1 β , 48.7pg/mL para IL-1RA, 1.0pg/mL para IL-10, 82.2pg/mL para Arginase e 1.4pg/mL para IP-10.

3.10 Análise estatística

A comparação entre dois grupos foi realizada por teste *Mann-Whitney* e a comparação de três grupos foi feita pelo teste *Kruskal-Wallis*. Na comparação entre três ou mais grupos pareados, foi realizado teste *Friedman* com pós teste *Dunn's* de múltiplas comparações. Os valores de p foram considerados significativos para $*p \leq 0.05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Características das parturientes com ou sem obesidade pré-gestacional

Para acessar a influência da obesidade gestacional na resposta antiviral da interface materno- fetal, analisamos parturientes provenientes de um Estudo Coorte, em parceria com a Prof. Patrícia Rondó, da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, selecionadas em 34 unidades públicas da cidade de Araraquara, São Paulo com sobrepeso/obesidade (Índice de massa corpórea na primeira consulta do pré-natal 25-39,9; n=28) e mulheres sem obesidade pré-gestacional (IMC 18,5-24,9; n=12) (Tabela 2; Figura 4).

A idade gestacional nos grupos foi similar, e toda a amostragem de nascimentos foram acima de 37 semanas de gestação. As mulheres com obesidade tiveram maior peso placentário ($575\text{g} \pm 21,9$, média \pm SEM) em comparação com as mulheres sem obesidade ($455\text{g} \pm 25,7$). Além disso, o percentual de gordura corporal materna no primeiro trimestre gestacional foi aumentado nas mulheres com obesidade ($36,3\% \pm 0,84$) em comparação ao grupo controle ($29,3\% \pm 1,57$). O tipo de parto foi similar entre parto vaginal e cesariana, em ambos os grupos (Figura 4).

Tabela 2. Dados demográficos das gestantes com e sem obesidade

Características	Sem Obesidade (n = 12)		Obesidade (n = 28)		valor p			
	Média	SEM	Média	SEM				
Idade materna (anos)	25,07	1,47	26,41	1,15	0,6563			
Idade gestacional (semanas)	39,57	0,41	39,71	0,35	0,8383			
Peso placentário (g)	455	25,75	575	21,92	0,0028			
Peso recém-nato (g)	3165	154,75	3375	94,55	0,1564			
Comprimento recém-nato (cm)	277	2,86	278	2,42	0,8383			
Percentual de gordura materno (%)	29,30	1,57	36,30	0,84	<0,0001			
Tipo de parto	Vaginal (n/N)	%	Cesárea (n/N)	%	Vaginal (n/N)	%	Cesárea (n/N)	%
	6/12	50	6/12	50	13/28	46,4	15/28	53,6

n = número de gestantes parcial; N = número de gestantes total; SEM = erro padrão da média; ns = não significativo

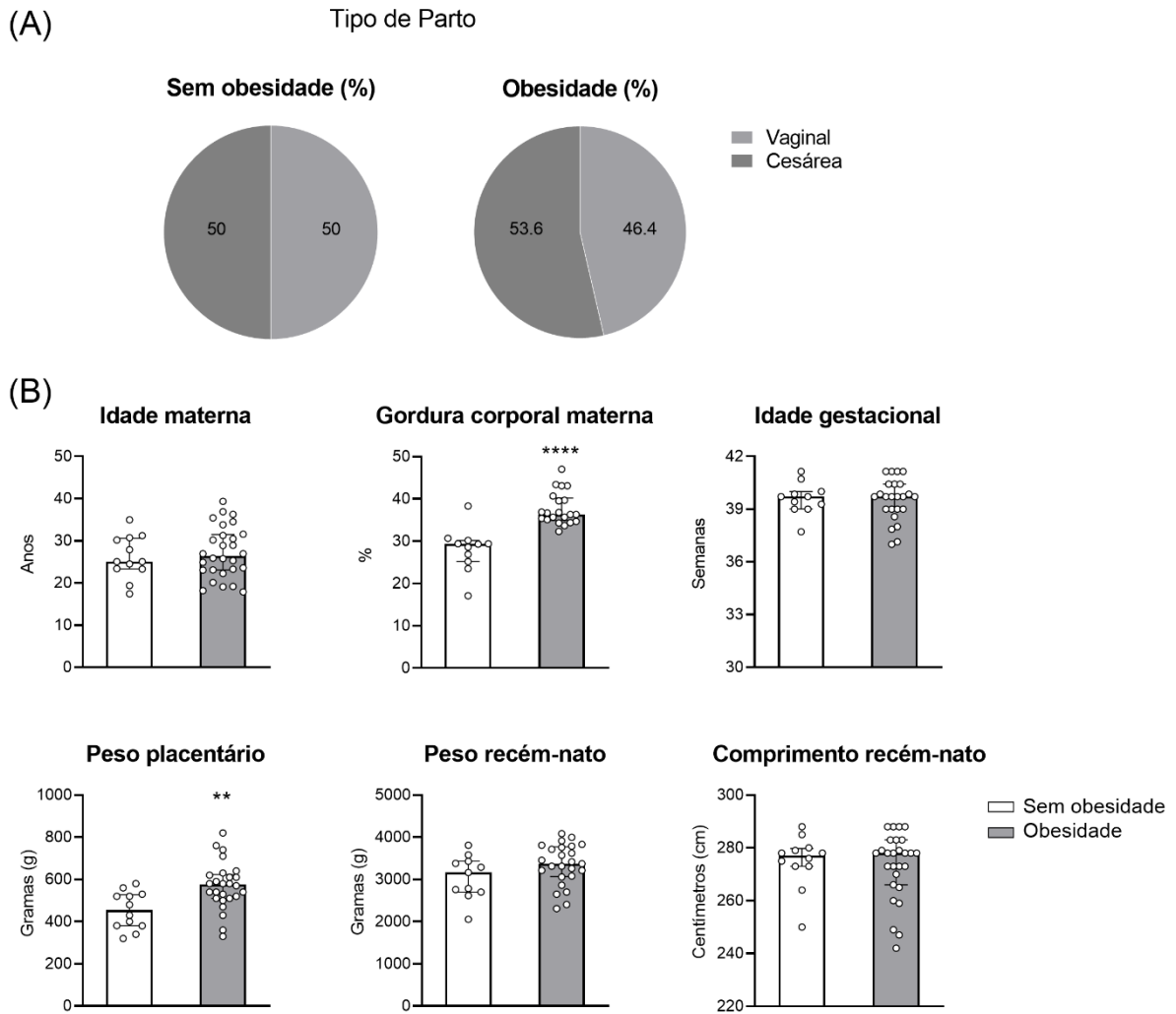


Figura 4. Características maternas e fetais da coorte de parturientes com obesidade pré-gestacional. Foram incluídas no estudo placentas provenientes de parturientes sem obesidade (n=12) ou com obesidade pré gestacional (n=28). Foram avaliados os percentuais (%) de tipo de parto (A), representados pelos diagramas. Os gráficos (B) mostram dados referentes a idade materna, o percentual de gordura corporal materna no primeiro trimestre gestacional, idade gestacional, peso da placenta e peso e comprimento dos recém-natos. As barras representam a mediana dos valores e o intervalo interquartil. *Mann-Whitney*. ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$.

4.2 Perfil de transcritos imunes antivirais no tecido placentário em gestantes com e sem obesidade na ausência de infecção

Inicialmente, avaliamos o tecido placentário das mulheres com e sem obesidade na ausência de infecção viral, para verificar se a obesidade pré-gestacional poderia alterar os fatores imunológicos associados à resposta antiviral. Os valores de expressão foram normalizados com o gene interno YWHAZ, utilizado em placentas devido a sua estabilidade de expressão neste tecido (MURTHI; FITZPATRICK; BORG; DONATH *et al.*, 2008).

Foi observado um perfil semelhante da expressão transcricional constitutiva de fatores antivirais, STING, RIG-I, MxA e ISG15 entre os grupos sem obesidade e obesidade (Figura 5A). Outros fatores como os receptores inatos de reconhecimento viral, TLR3 e TLR7, o fator regulador do interferon 3 (IRF3) (Figura 5B), bem como os IFNs tipo I (IFNA e B) e III (IFNL, Figura 5C) não mostraram alteração da expressão entre os grupos. Esses dados mostram que, apesar do IMC das parturientes dessa coorte, houve uma regulação importante dos fatores de resposta contra vírus para manter a homeostase local.

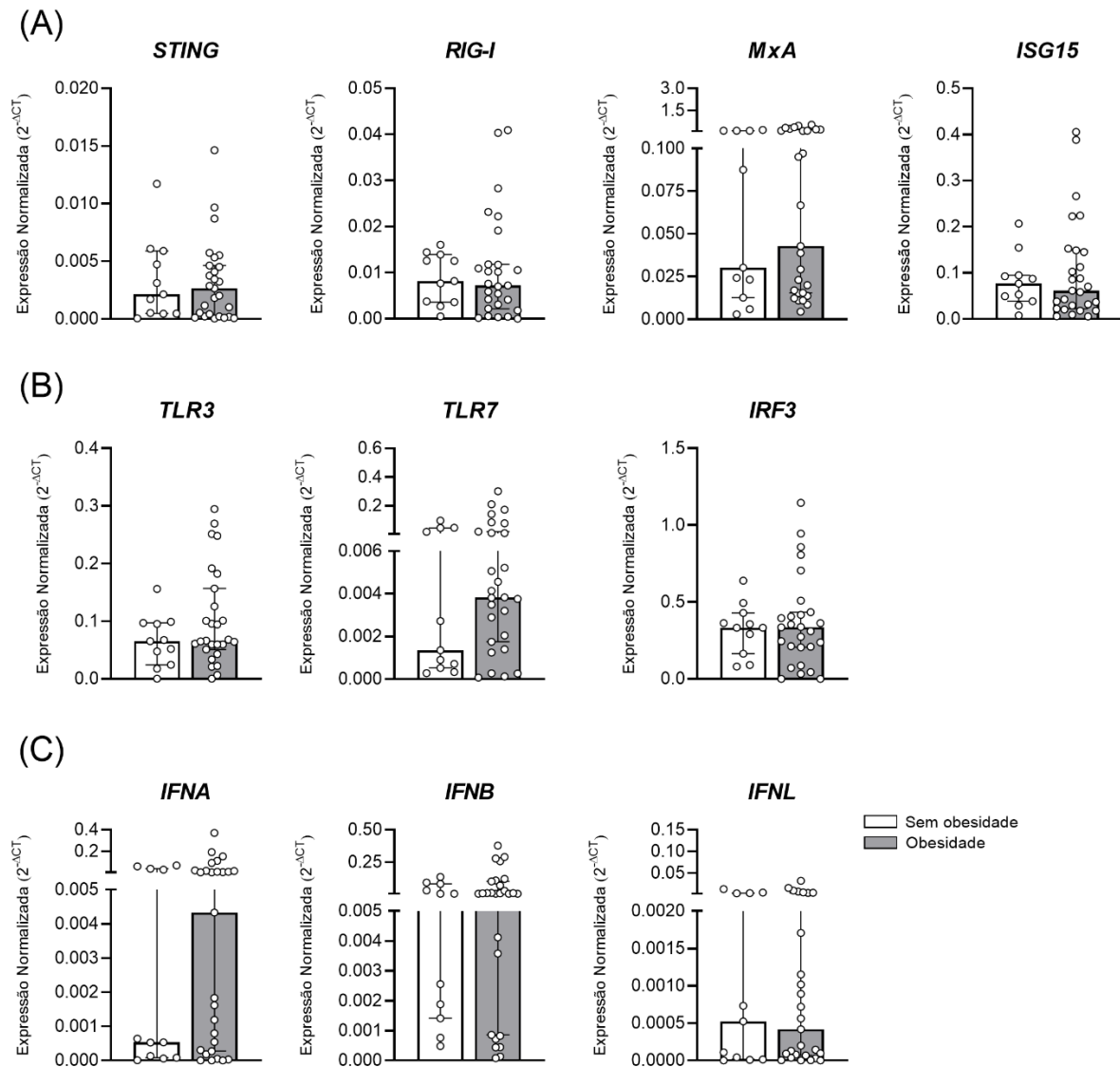


Figura 5. Tecido placentário de parturientes com e sem obesidade pré-gestacional exibe perfil semelhante de expressão transcricional de fatores antivirais.

Placentas, coletadas após o parto, foram avaliadas nos grupos sem obesidade (barra branca; n=11) e com obesidade (barra cinza; n=28). Os mRNAs dos fatores antivirais (A) *STING*, *RIG-I*, *MxA* e *ISG15*, (B) receptores *Toll-like* e a via intracelular de ativação, *TLR3*, *TLR7* e *IRF3*, e (C) interferons, *IFNA*, *IFNB* e *IFNL*, foram avaliados por qPCR, e os dados apresentados como expressão normalizada. As barras representam a mediana e o intervalo interquartil dos valores.

4.3 Dados demográficos de mães com obesidade e infectadas por ZIKV e características histopatológicas do tecido placentário

A obesidade, como uma síndrome metabólica, pode alterar a resposta imune gerando um estado de inflamação crônica. Existem poucas evidências de que a inflamação desencadeada pela obesidade durante a gravidez possa influenciar a imunidade antiviral, como fator de risco e/ou agravamento durante infecções. Portanto, avaliamos a coorte de mulheres infectadas por ZIKV durante o surto ocorrido entre 2015 e 2016, a partir de amostras coletadas do Hospital Materno-infantil do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira/Fiocruz no Rio de Janeiro/Brasil, em parceria com o Dr. Zilton Vasconcelos. Os dados demográficos das mulheres com e sem sobrepeso/obesidade pré-gestacional na coorte de mães infectadas pelo ZIKV estão descritos na Tabela 3 e ilustrados na Figura 6.

O tipo de parto de mulheres infectadas pelo ZIKV com obesidade (IMC na primeira consulta do pré-natal 25-39,9; n=16) foi principalmente por cesariana (91,7%) em comparação com as mulheres ZIKV+ sem obesidade (IMC 18,5-24,9; n=14; 45,5%; Figura 6A). O período de infecção pelo ZIKV na gestação ocorreu principalmente no primeiro trimestre (58,3%), seguido pelo segundo trimestre (25%), nas mulheres sem obesidade. Já para as gestantes com obesidade, foi o segundo trimestre (50%), seguido do primeiro trimestre (31,2%; Figura 6B). A coorte selecionada teve idade gestacional semelhante entre as parturientes com e sem obesidade, bem como o peso e comprimento dos recém-natos (Figura 6C).

Em relação ao aspecto clínico dos recém-nascidos, detectáveis no momento do parto, foram consideradas a microcefalia (escore Z do perímetro cefálico menor que -2) e alterações oculares, características importantes da Síndrome Congênita de ZIKV (CAROD-ARTAL, 2016). Foi diagnosticada microcefalia em 54,5% dos casos do grupo ZIKV+ sem obesidade e em apenas 8,3% dos casos do grupo ZIKV+ com obesidade (Figura 6D). É provável que essa diferença seja decorrente ao período de infecção pelo ZIKV, que ocorreu em maior frequência no primeiro trimestre nas mulheres sem obesidade (58,3%) em comparação aos 31,2% nas mães com obesidade (Figura 6B). Casos semelhantes de anormalidades oculares neonatais foram observados em ambos os grupos, e 30% das gestantes ZIKV+ com obesidade apresentaram hipertensão arterial sistêmica, em comparação à ausência dessa comorbidade no grupo sem obesidade (Figura 6D).

Na análise histopatológica (Tabela 4), observamos necrose trofoblástica mais intensa (+++) em 45,4% das placentas das mães com obesidade em contraste com o nível moderado de 87,5% (++) nas mães sem obesidade. Outros achados, característicos da infecção congênita por ZIKV, foram de intensidade semelhante em ambos os grupos de parturientes, como vilite, intervilosite, trombos, calcificação vilosa, entre outros.

Tabela 3. Dados demográficos das gestantes com e sem obesidade infectadas com Zika virus (ZIKV)

Características	Sem Obesidade(n = 14)				Obesidade (n = 16)				valor p
	Média	SEM		Média	SEM				
Idade gestacional (semanas)	39	0,43		38	0,82				0,3941
Peso recém-nato (g)	3385	190,03		2650	215,71				0,1239
Comprimento recém-nato (cm)	49	0,72		49	1,16				0,5720
Infeção ZIKV	n/N	%		n/N	%				
1º trimestre	7/12	58,3		5/16	31,2				
2º trimestre	1/12	8,3		8/16	50				
3º trimestre	3/12	25		2/16	12,5				
Assintomático	1/12	8,3		1/16	6,2				
Tipo de parto	Vaginal (n/N)	%	Cesárea (n/N)	%	Vaginal (n/N)	%	Cesárea (n/N)	%	
	6/11	54,5	5/11	45,5	1/12	8,3	11/12	91,7	
Alteração	Positiva n/N	%	Negativa n/N	%	Positiva n/N	%	Negativa n/N	%	
Microcefalia	6/11	54,5	5/11	45,5	1/12	8,3	11/12	91,7	
Anormalidade ocular	4/12	33,3	8/12	66,7	3/15	20	12/15	80	
Comorbidades	Positiva n/N	%	Negativa n/N	%	Positiva n/N	%	Negativa n/N	%	
Hipertensão sistêmica arterial	0/9	-	9/9	100	3/10	30	7/10	70	
Diabetes	0/9	-	9/9	100	0/10	-	10/10	100	

n = número de gestantes parcial; N = número de gestantes total; SEM = erro padrão da média; ns = não significativo

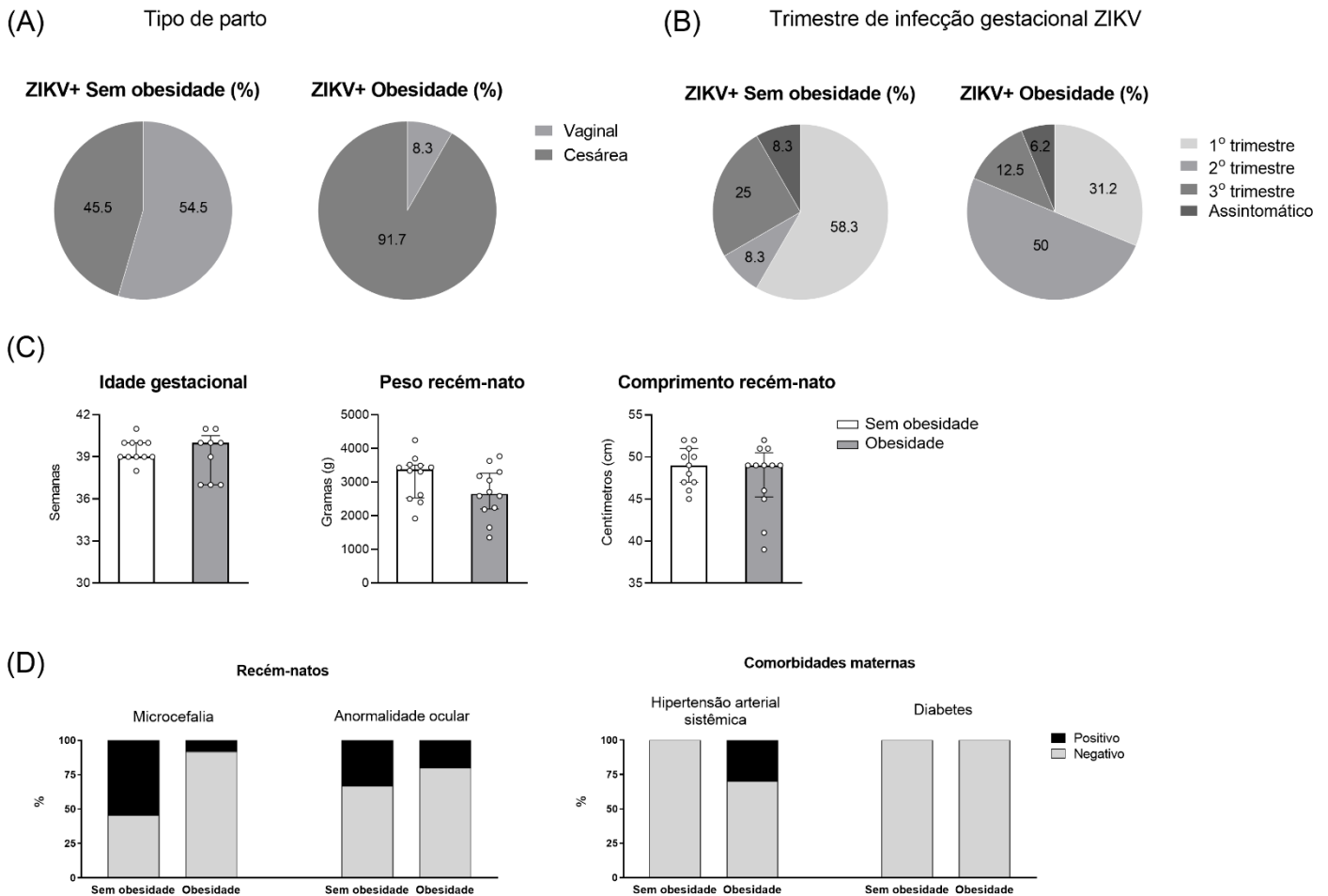


Figura 6. Dados demográficos de mães com e sem obesidade infectadas por ZIKV e seus recém-nascidos. Foi avaliada uma coorte de gestantes a partir dos grupos de infecção por ZIKV+ sem obesidade (barra branca; n=9-14) e com obesidade pré-gestacional (barra cinza; n=10-16). O tipo de parto (A) e trimestre gestacional da infecção pelo ZIKV (B) estão representados nos diagramas. A idade gestacional, peso e comprimento dos recém-nascidos (C), anormalidades dos recém-nascidos e comorbidades maternas (D), estão representados nos gráficos. As barras representam a mediana e o intervalo interquartil dos valores.

Tabela 4. Características histopatológicas das placentas de gestantes com e sem obesidade e infecção por ZIKV

Característica	ZIKV+ Sem Obesidade (n = 8)			ZIKV+ Obesidade (n = 11)		
	Escore	n/N	%	Escore	n/N	%
Necrose trofoblástica	+	(0/8)	0	+	(2/11)	18,2
	++	(7/8)	87,5	++	(4/11)	36,4
	+++	(1/8)	12,5	+++	(5/11)	45,4
Vilite	-	(7/8)	87,5	-	(8/11)	72,7
	+	(1/8)	12,5	+	(3/11)	27,3
Intervilosite	-	(8/8)	100	-	(10/11)	90,9
	+	(0/8)	0	+	(1/11)	9,1
Trombos intervilos	-	(2/8)	25	-	(0/11)	0
	+	(1/8)	12,5	+	(4/11)	36,4
	++	(4/8)	50	++	(6/11)	54,5
	+++	(1/8)	12,5	+++	(1/11)	9,1
Hiperplasia células de Hofbauer	+	(0/8)	0	+	(1/11)	9,1
	++	(6/8)	75	++	(8/11)	72,7
	+++	(2/8)	25	+++	(2/11)	18,2
Necrose fibrinoide do vilo	-	(0/8)	0	-	(2/11)	18,2
	+	(2/8)	25	+	(2/11)	18,2
	++	(6/8)	75	++	(7/11)	63,6
Calcificações vilosas	-	(0/8)	0	-	(2/11)	18,2
	+	(5/8)	62,5	+	(3/11)	27,3
	++	(0/8)	0	++	(3/11)	27,3
	+++	(3/8)	37,5	+++	(3/11)	27,3
Alterações de face fetal	-	(8/8)	100	-	(11/11)	100
Nós sinciciais	++	(2/8)	25	++	(6/11)	54,5
	+++	(6/8)	75	+++	(5/11)	45,4
Inflamação decidual	-	(6/8)	75	-	(7/11)	63,6
	+	(2/8)	25	+	(4/11)	36,4

- ausência; + leve; ++ moderado; +++ intenso; n = número de gestantes parcial; N = número de gestantes total

4.4 Diminuição na expressão de fatores imunes antivirais em tecido placentário de parturientes com obesidade e infectadas por ZIKV

Para avaliar o perfil transcricional de fatores antivirais placentários, utilizamos os dados de expressão de mRNA obtidos por PCR em tempo real do banco de dados publicado por Azamor et al. em 2021 (AZAMOR; CUNHA; DA SILVA; BEZERRA *et al.*, 2021). É a mesma coorte de gestantes infectadas pelo ZIKV, porém, agora, realizando comparações entre o grupo de mães com e sem obesidade. Observamos uma diminuição da expressão de RIG-I e IFIH1, o gene precursor da proteína MDA-5, no tecido placentário das mães ZIKV+ com obesidade (Figura 7A), em comparação com o grupo sem obesidade.

O ZIKV é composto de RNA de fita simples e pode ser reconhecido por TLRs. Avaliamos, portanto, as expressões de TLR3 e TLR7, que foram semelhantes entre os grupos. No entanto, a via de sinalização jusante à ativação desses receptores, IRF3, também mostrou estar regulada negativamente nas placentas das mães infectadas com obesidade (Figura 7B).

As expressões dos IFNs tipo I e III não se alteraram de acordo com o IMC materno (Figura 7C). É possível que, ao avaliarmos o tecido placentário no momento do parto, algumas diferenças não possam mais ser observadas, uma vez que a infecção ocorreu no início da gravidez em parte da coorte avaliada. Outro ponto a ser considerado, é que a coleta das amostras de placenta foi realizada sem a distinção da parte materna (decídua) da parte fetal (vilo coriônico), e, por esse motivo, nos resultados de expressão de mRNA não é possível inferir em qual região se dá a diferença observada dos fatores antivirais.

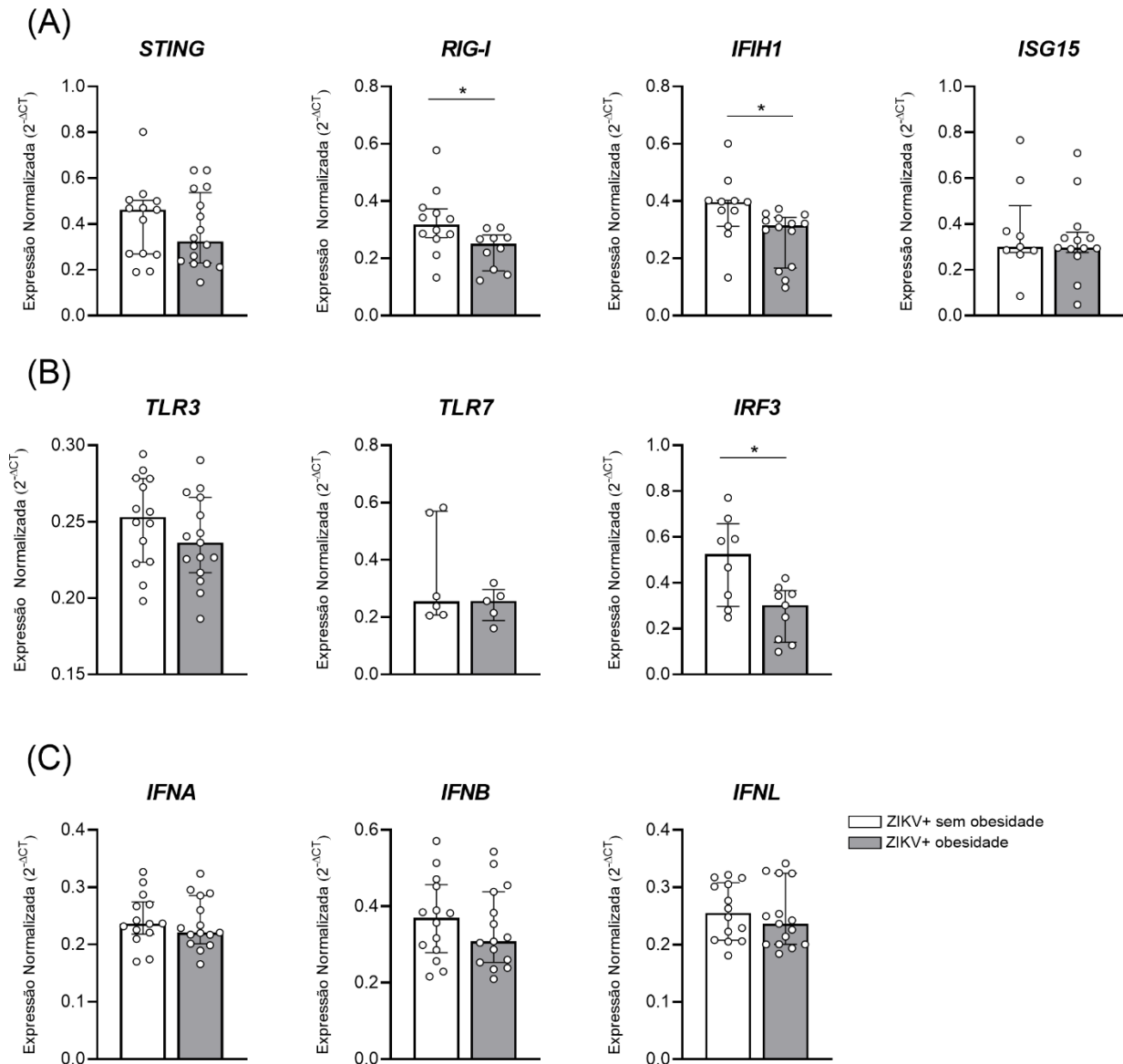


Figura 7. Alteração na expressão de fatores antivirais placentários desencadeados pela obesidade gestacional durante infecção congênita por ZIKV.

Placentas, coletadas após o parto, de mães infectadas durante a gestação pelo ZIKV+ foram separadas em grupos sem obesidade (barra branca; n=6-14) e com obesidade pré-gestacional (barra cinza; n=5-16). Os mRNAs dos fatores antivirais, (A) STING, RIG-I, IFIH1 e ISG15, receptores de imunidade inata (B) TLR3, TLR7 e IRF3 e interferons (C) IFNA, IFNB e IFNL foram avaliados por RT qPCR, a partir do banco de dados publicado por Azamor et al., 2021. As barras representam a mediana e o intervalo interquartil. *Mann-Whitney*. * $p \leq 0,05$.

4.5 Alteração do eixo IRF-3/RIG-I em tecido placentário de gestantes com obesidade na infecção por ZIKV

Em seguida, avaliamos a expressão proteica de alguns fatores alvos na resposta imune antiviral placentária, selecionados com base nos ensaios de expressão transcricional. A face materna da placenta, decídua, e o lado fetal, vilos, de gestantes infectadas pelo ZIKV com e sem obesidade foram analisados por imuno-histoquímica para IRF-3, RIG-I e IFN- α . Para cada marcador, foram utilizadas cinco e três regiões randômicas para a análise dos vilos e decídua, respectivamente. A área positiva e a intensidade de densidade óptica (IDO) foram detectadas e quantificadas para cada um dos marcadores, através do software Image-Pro plus.

A Figura 8 mostra uma diminuição na expressão da proteína RIG-I na decídua, e não no vilos, das mães infectadas pelo ZIKV com obesidade em comparação com o grupo sem obesidade, tanto na avaliação da área positiva/área total, na IDO/área e na área/comprimento de membrana basal decidual. Este achado foi semelhante ao obtido a partir da expressão de transcritos (Figura 7A).

A expressão do IRF-3 também foi diminuída nas análises de área positiva e IDO na decídua das placentas de mães com obesidade (Figura 9), já nos vilos coriônicos a expressão foi similar. A Figura 10 mostra que a expressão do IFN- α foi semelhante entre os grupos, em ambos os lados materno e fetal. A expressão proteica de IFN- β não foi analisada. A modulação negativa de RIG-I e IRF-3 não foi relacionada com as placentas das mães que tiveram recém-nascidos com microcefalia diagnosticada, mas sim com a obesidade associada à infecção pelo ZIKV. Nossos achados evidenciam uma regulação negativa de

fatores antivirais como RIG-I e IRF-3 na decídua em função da obesidade materna e à infecção pelo ZIKV durante a gravidez. Os dados reforçam que a síndrome metabólica tem impacto direto na resposta antiviral da interface materno-fetal.

RIG-I

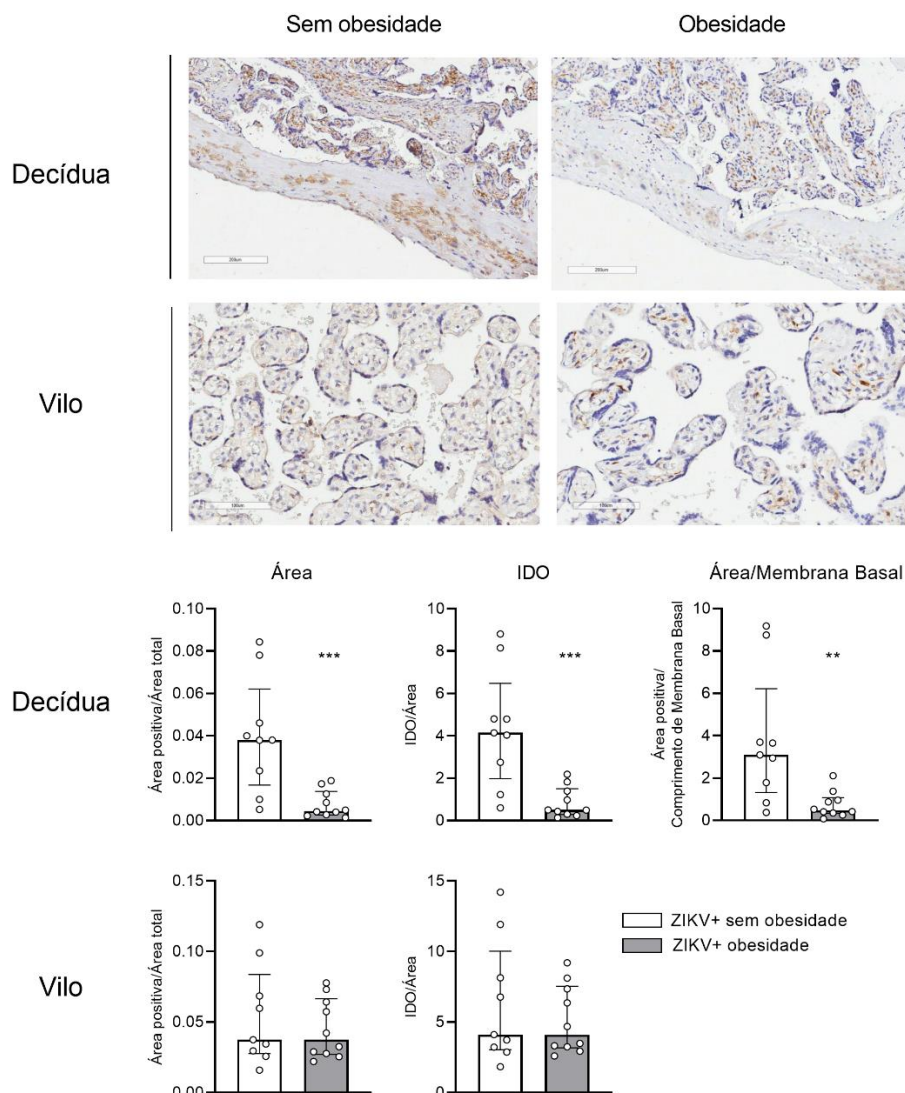


Figura 8. Diminuição da expressão proteica de RIG-I na decídua de mães com obesidade e infectadas pelo ZIKV. Placentas, coletadas após o parto, de mães infectadas pelo ZIKV+ foram separadas em grupos sem obesidade (barra branca; n=9) e com obesidade pré-gestacional (barra cinza; n=10). A expressão da proteína antiviral RIG-I foi analisada na decídua e nas vilosidades coriônicas placentárias por imunohistoquímica, representando uma média de três regiões distintas de cada lâmina para a decídua (10X) e cinco para as vilosidades (20X). As barras representam as medianas e interquartis para a área positiva/área total, a intensidade de densidade óptica (IDO)/área para a decídua e vilo, e a área positiva/comprimento da membrana basal para a decídua. *Mann-Whitney*. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

IRF3

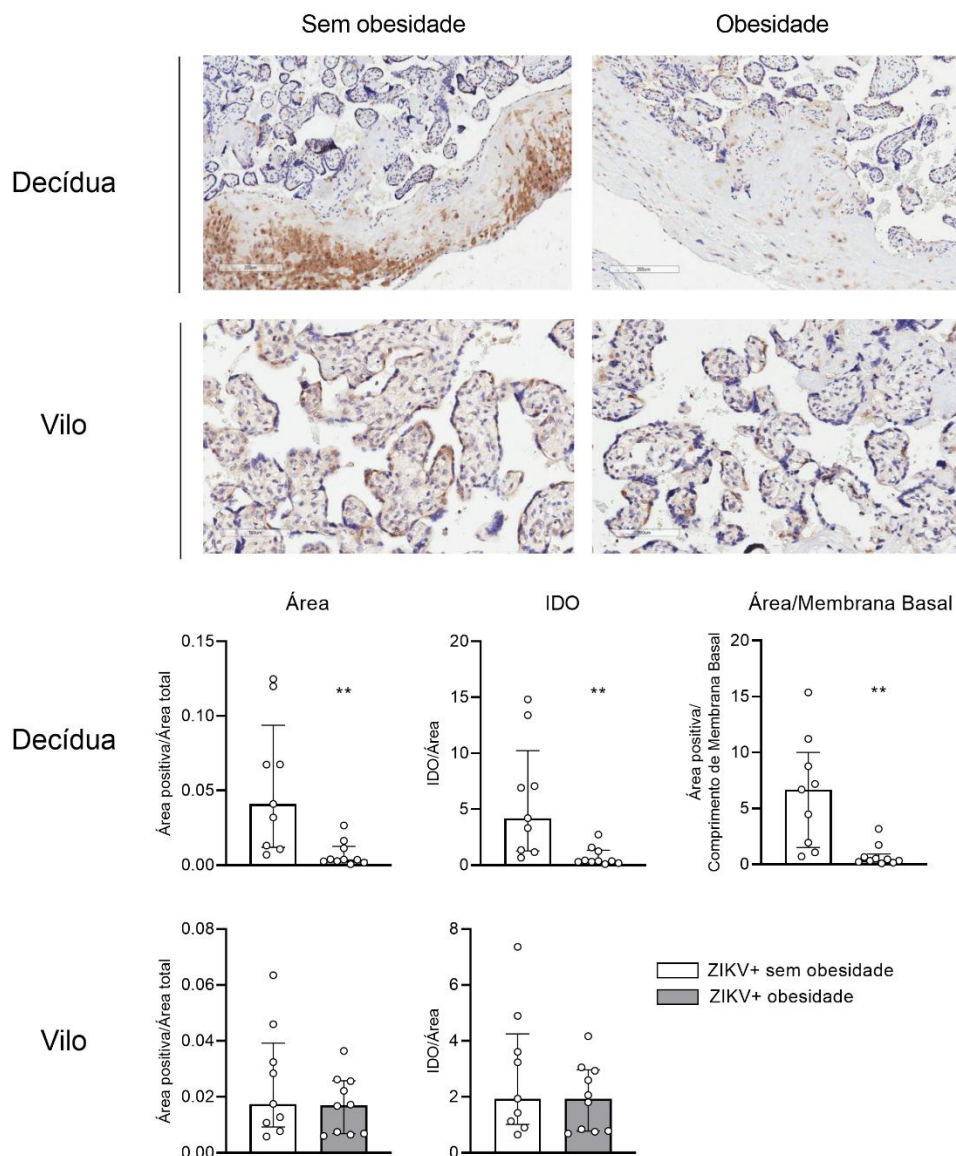


Figura 9. Diminuição na expressão da proteína IRF-3 na decídua placentária de mães infectadas pelo ZIKV com obesidade. Placentas, coletadas após o parto, de mães infectadas pelo ZIKV+ foram separadas em grupos sem obesidade (barra branca; n=9) e com obesidade pré- gestacional (barra cinza; n=10). A expressão do fator de transcrição IRF-3 foi analisada na decídua e nas vilosidades coriônicas placentárias por imuno-histoquímica, representando uma média de três regiões distintas de cada lâmina para a decídua (10X) e cinco para as vilosidades (20X). As barras representam as medianas e interquartis para a área positiva/área total, intensidade de densidade óptica (IDO)/área para a decídua e vilo, e a área positiva/comprimento da membrana basal para a decídua. *Mann-Whitney*. **p<0,01.

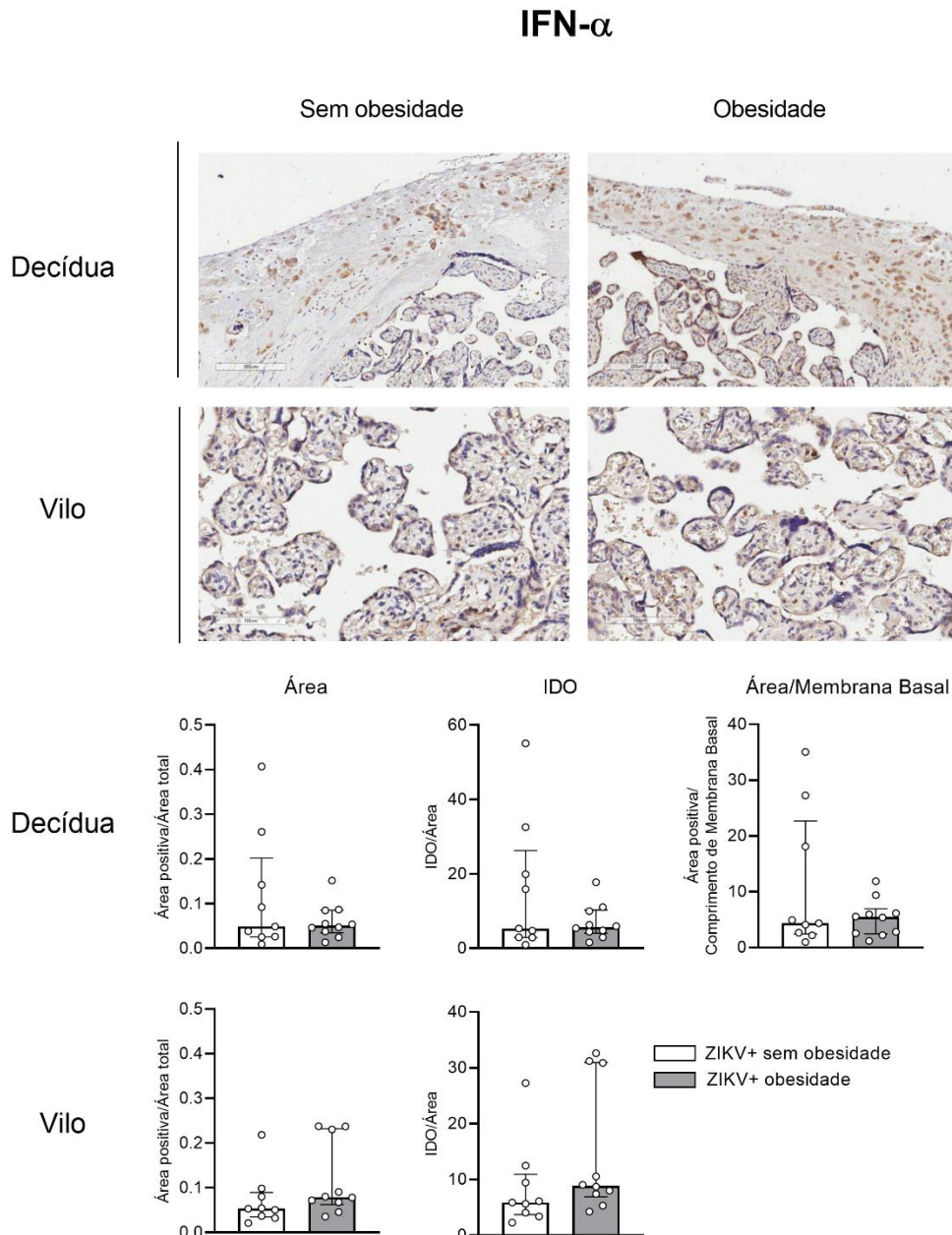


Figura 10. Expressão de IFN- α na placenta de mães infectadas pelo ZIKV com obesidade. Placentas, coletadas após o parto, de mães infectadas pelo ZIKV+ foram separadas em grupos sem obesidade (barra branca; n=9) e com obesidade pré gestacional (barra cinza; n=10). A expressão da proteína IFN- α foi analisada na decídua e vilosidades coriônicas placentárias por imuno-histoquímica, representando uma média de três regiões distintas de cada lâmina para a decídua (10X) e cinco para as vilosidades (20X). As barras representam as medianas e interquartis para a área positiva/área total, a intensidade de densidade óptica (IDO)/área para a decídua e vilo, e a área positiva/comprimento da membrana basal para a decídua.

4.6 Influência do tratamento com ácido fólico e estímulo com palmitato em macrófagos placentários humanos

Com o objetivo de aprimorar as técnicas de purificação e caracterização de macrófagos placentários humanos, bem como investigar os mecanismos de ativação e disfunção provocados pela obesidade materna, foi realizado estágio de pesquisa no laboratório do Dr. David Aronoff, da Universidade de Indiana, Estados Unidos da América. Para isso, foram utilizadas amostras de placentas provenientes de parto cesárea, de gestantes sem infecções correlacionadas, com IMC pré-gestacional de 18,5-24,9, coletadas ao nascimento no Riley Children's Hospital - Indiana Pediatrics, Indianápolis, IN, EUA, entre outubro-2022 e março-2023.

Os macrófagos foram purificados pela digestão enzimática de cotilédones placentários, seguido de gradiente de densidade e seleção positiva de células CD14 com o uso de *beads* magnéticas, considerando-se a pureza superior à 75%, determinada com base na positividade de CD68, por citometria de fluxo. Foi utilizado ácido fólico, descrito como modulador da inflamação de macrófagos e suplemento essencial no período gestacional e o ácido graxo saturado de cadeia curta, palmitato, como estímulo *in vitro*, para mimetizar os efeitos da obesidade nessas células.

Primeiramente, foi verificado de forma preliminar a influência do pré-tratamento com ácido fólico seguido do estímulo com palmitato em macrófagos placentários, na expressão de CD68 e receptor de folato β (FR β), por imunofluorescência (IF; Figura 11A), não sendo possível observar diferenças visuais de expressão. Também foram avaliados marcadores de

inflamação/regulação em macrófagos (CD80, CD206, CD163), e o percentual de expressão e intensidade mediana de fluorescência de FR β , por citometria de fluxo. De forma inicial, foi possível visualizar uma diminuição do marcador de ativação CD80, bem como aumento de FR β após a ativação por 24h com palmitato, na presença ou ausência de ácido fólico (Figura 11B).

Para verificar a atividade funcional dos macrófagos da placenta após o tratamento com ácido fólico e estímulo com o ácido graxo, foi avaliada a produção de um painel de citocinas no sobrenadante celular, por kit de *Bead Array*, através de citometria de fluxo (Figura 12). Foi avaliada a concentração de citocinas e fatores inflamatórios (TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL1RA), anti-inflamatórios (IL-10 e Arginase) e da quimiocina induzida por IFN- γ , IP-10. Foi verificado aumento na produção de IL-1 β após o estímulo com palmitato, bem como a diminuição de IL-10, evidenciando perfil inflamatório desse fator aumentado na obesidade, nos macrófagos da placenta. É necessário aumentar a amostragem para confirmar estes achados, para compreender a funcionalidade de macrófagos no ambiente materno-fetal, e a modulação por fatores nutricionais e de suplementação, como o ácido fólico.

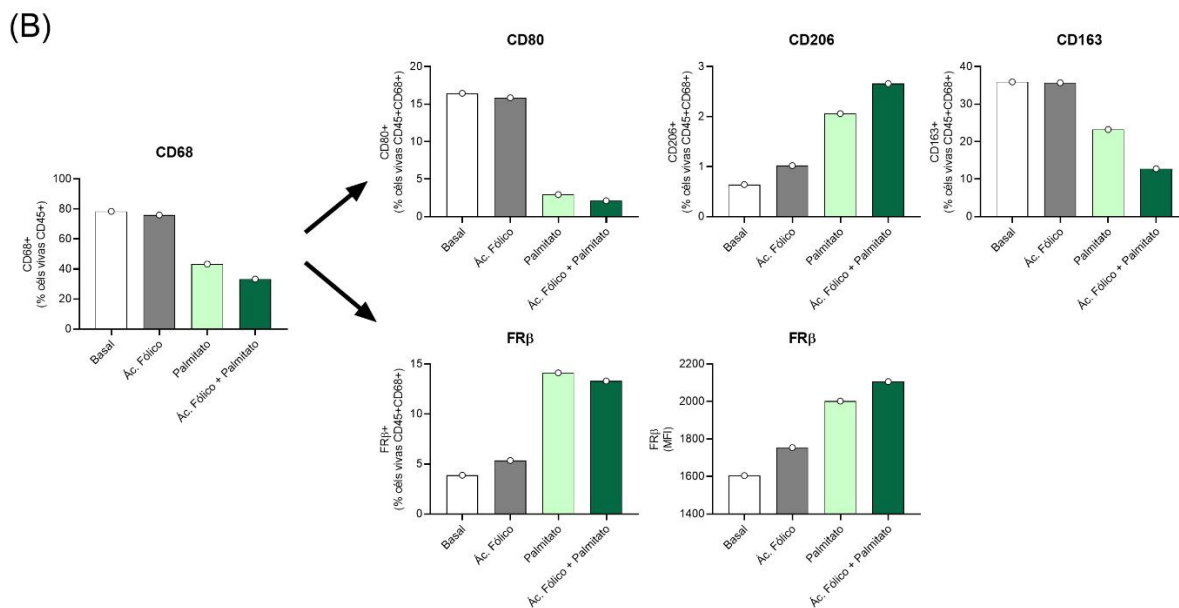
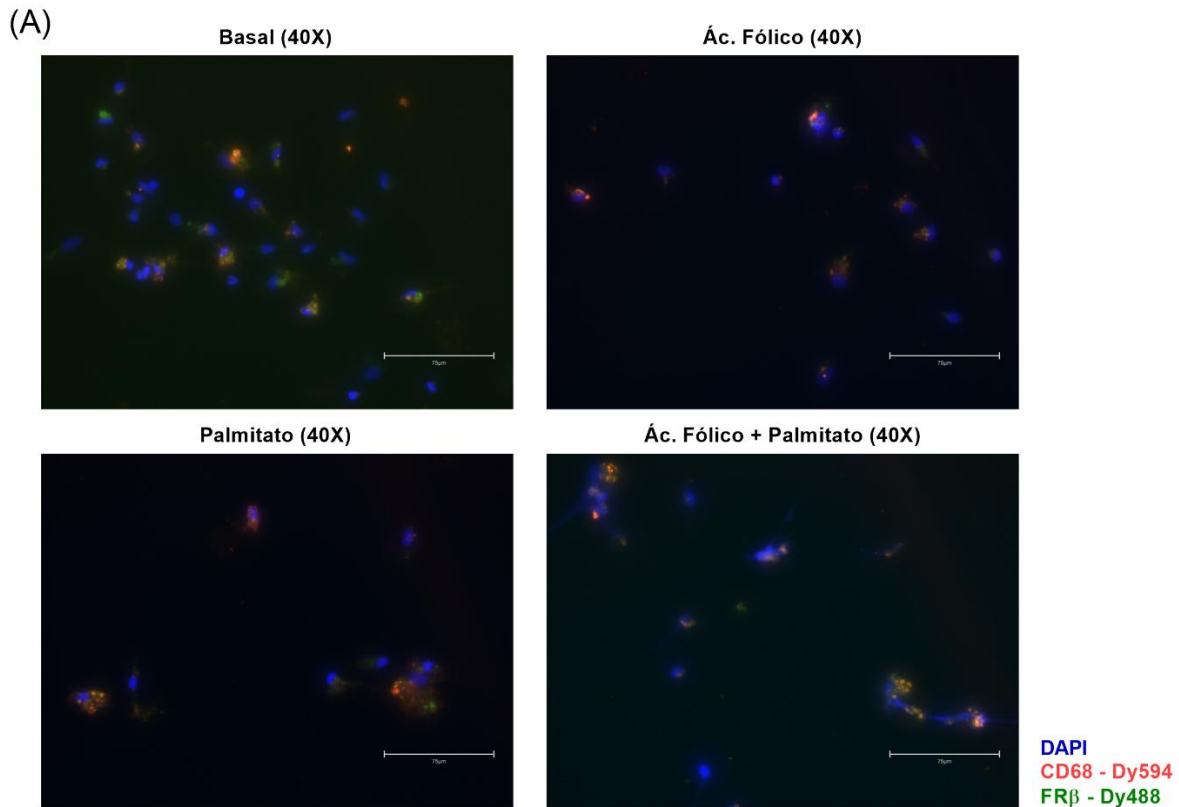


Figura 11. Expressão de receptor de folato β (FR β) e marcadores de inflamação/regulação em macrófagos placentários humanos tratados com ácido fólico e estimulados com palmitato. Macrófagos foram isolados de fragmentos de cotilédones placentários através de digestão com solução enzimática e purificação por gradiente de densidade e seleção de células CD14⁺. As células foram tratadas com ácido fólico (50 μ M) por 1h e posteriormente estimuladas com palmitato (400 μ M), por

24h. As imagens (40X) e gráficos são representativos de um ensaio preliminar. (A) Mostra a co-expressão de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) em azul, CD68 (Dy594) em vermelho e FR β (Dy488) em verde, por imunofluorescência. (B) A porcentagem de células CD68+, CD80+, CD206+, CD163+ e FR β +, e a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de FR β , por citometria de fluxo.

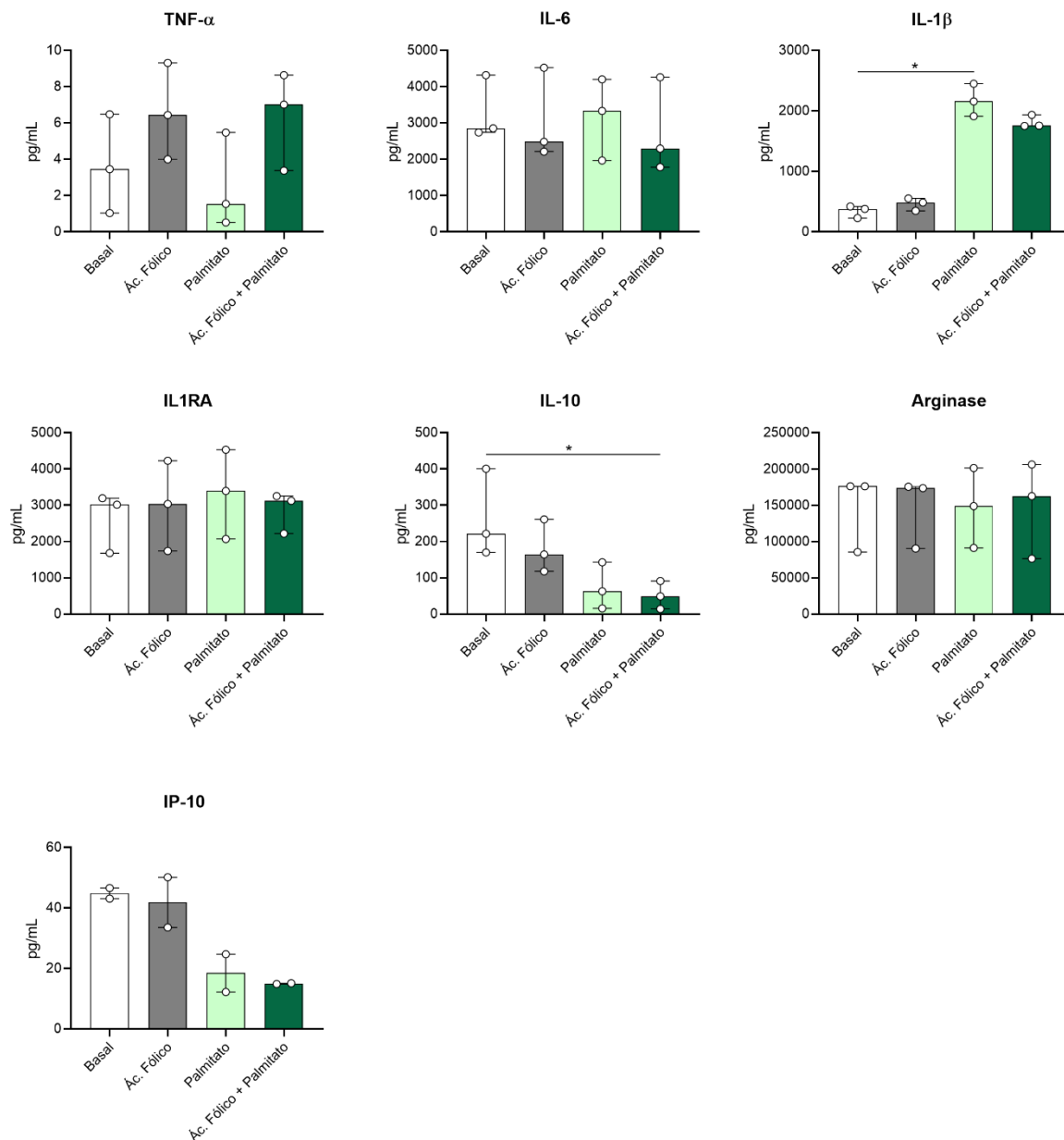


Figura 12. Perfil de produção de citocinas em macrófagos placentários humanos tratados com ácido fólico e estimulados com palmitato. Macrófagos foram isolados de fragmentos de cotilédones de placentas através de digestão com solução enzimática e purificação por gradiente de densidade e seleção de células CD14+. As células foram tratadas com ácido fólico (50 μ M) por 1h e posteriormente estimuladas com palmitato (400 μ M), por 24h. A produção de citocinas foi mensurada no sobrenadante celular (n=2-3) por citometria de fluxo, utilizando-se kit de *Bead Array*. Foram mensurados TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL1RA, IL-10, Arginase e IP-10. As barras representam a mediana e o intervalo interquartil dos dados. *Friedman test*. * $p \leq 0,05$.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A obesidade, como uma síndrome metabólica, tem impacto em diferentes fases da vida, incluindo a gestação. Pode levar a graves alterações na interface materno-fetal e no feto, dentre elas, um déficit na imunidade antiviral. Nossos achados evidenciaram um comprometimento do eixo RIG-I/IRF3 na decídua placentária de mães com obesidade em associação à infecção por ZIKV.

Para avaliar a influência da obesidade materna na resposta antiviral placentária e as consequências para os recém-natos, foi estabelecida uma parceria com a Prof. Dra. Patrícia Rondó, da Faculdade de Saúde Pública/USP, que já coordena há alguns anos um estudo prospectivo multicêntrico para avaliação de gestantes e seu estado nutricional, envolvendo 34 Unidades Básicas de Saúde e o Hospital Maternidade da cidade de Araraquara-SP. A partir da colaboração, foi possível o acesso a registros hospitalares e fragmentos de placentas, coletadas no momento do parto, preservadas em solução de RNA later, que mantém o material genético conservado. Essa parceria foi essencial para o desenvolvimento do projeto, uma vez que devido à pandemia de COVID-19, os acessos da pesquisa aos hospitais ficaram restritos, como no Ambulatório de Obstetrícia do Hospital das Clínicas FMUSP, onde inicialmente obteríamos as amostras.

Apesar do acesso à coorte Araraquara serem limitadas aos fragmentos placentários preservados, foi possível a análise e correlação dos resultados com dados clínicos maternos e fetais. Com isso, observamos um aumento do percentual de gordura corpórea materna no primeiro trimestre e aumento do peso placentário no grupo obesidade, quando comparado às gestantes sem obesidade, de acordo com a literatura existente(WALLACE; BHATTACHARYA;

CAMPBELL; HORGAN, 2014; 2016). Um dos fatores descritos para adversidades obstétricas na obesidade materna é a macrosomia fetal ($\geq 4000\text{g}$ ao nascimento; (GAUDET; FERRARO; WEN; WALKER, 2014). Contudo, nossos dados evidenciam uma normalidade no peso dos recém-natos no momento do nascimento. É possível que seja devido a seleção dos casos, em que incluímos somente parturientes com idade gestacional entre 37 e 42 semanas, excluindo os casos de obesidade materna relacionados a outras condições que podem levar a complicações obstétricas.

Para avaliar o perfil de fatores relacionados ao reconhecimento viral (TLR3, TLR7 e IRF3) e resposta antiviral (IFNs I e III, STING, RIG-I, MxA e ISG15) nas placentas de gestantes, na ausência de infecção, foi realizado ensaio de PCR em tempo real. Não foram detectadas alterações entre as amostras de gestantes com e sem obesidade mostrando que, apesar da obesidade, o ambiente placentário revelou um equilíbrio homeostático nos fatores antivirais a nível transcricional, na resposta imune inata contra vírus. É importante também ressaltar que pode ocorrer modulação pós transcricional, afetando a expressão proteica destes fatores, e que houve alta dispersão das amostras, por isso uma amostragem maior é necessária para confirmar estes achados. Além disto, nossa limitação foi que a análise de proteínas não foi realizada nestes casos.

Muito se discute sobre a produção anormal de hormônios como as adipocinas e de citocinas como TNF e IFN durante o estado de obesidade, que juntamente com o aumento dos ácidos graxos saturados de cadeia curta circulantes ativam o sistema imunológico e tornam a resposta inflamatória crônica de baixo grau descompensados, podendo comprometer a função efetora dos mecanismos antivirais (HUTTUNEN; SYRJÄNEN, 2013). Na pandemia de

COVID-19 no Brasil, assim como em outros países, a obesidade foi considerada a maior complicação gestacional com mortalidade materna, causando 12% das mortes maternas de janeiro a novembro de 2020 (LEAL; MERCKX; FELL; KUCHENBECKER *et al.*, 2021).

Como o Brasil foi o país com os casos mais graves de infecção por ZIKV durante a gestação, levando a casos de SCZ (CAROD-ARTAL, 2016), visamos estabelecer uma parceria para estudo de placentas. Foi somente em 2020, com a parceria com pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, que tivemos acesso a uma coorte de gestantes com infecção pelo ZIKV durante a gravidez, coletadas entre 2015 e 2016. Analisamos os dados clínicos maternos e dos recém-natos, bem como o banco de dados de PCR em tempo real já publicado pelo grupo (AZAMOR; CUNHA; DA SILVA; BEZERRA *et al.*, 2021) para comparar o perfil de fatores antivirais em placentas de mães infectadas pelo ZIKV com e sem obesidade.

Curiosamente, apenas um caso de microcefalia foi diagnosticado no grupo de gestantes com obesidade, enquanto no grupo sem obesidade foram seis casos. Uma justificativa possível é 30% da coorte ZIKV-obesidade ter sido infectada no primeiro trimestre gestacional, em comparação com aproximadamente 60% da coorte ZIKV-sem obesidade. Já é bem determinado que o momento da infecção pelo ZIKV no primeiro trimestre está associado à ocorrência de microcefalia fetal (PEREIRA; ARAUJO JÚNIOR; WERNER; MONTEIRO, 2020). Uma das limitações do nosso estudo foi a utilização de amostras de uma coorte já coletada no passado, não sendo possível o delineamento do estudo pareando gestantes com e sem obesidade de mesma idade gestacional e mesmo período de infecção viral.

Nas avaliações do tecido placentário, a infecção pelo ZIKV desencadeou várias alterações histopatológicas em ambos os grupos de mães (com ou sem obesidade), tais como aumento da necrose trofoblástica, necrose fibrinóide das vilosidades, calcificação, inflamação decidual e hiperplasia de macrófagos Hofbauer. Estas alterações não tiveram relação com a ocorrência de microcefalia fetal. A infecção por ZIKV durante a gravidez já demonstrou causar diversas alterações na placenta (RABELO; DE SOUZA; SALOMÃO; MACHADO *et al.*, 2020), principalmente hiperplasia de macrófagos (SCHWARTZ, 2017), o que pode indicar um nicho replicativo neste microambiente.

Deve-se notar que a infecção pelo ZIKV em associação com a obesidade induziu uma diminuição na expressão transcricional de RIG-I, IFIH1 e IRF3 no tecido placentário, em comparação com o grupo sem obesidade. Isso também foi confirmado pela diminuição da expressão das proteínas RIG-I e IRF-3 na porção decidual da placenta. Embora a obesidade não tenha alterado constitutivamente a expressão desses fatores no tecido placentário das gestantes sem infecção, a presença do vírus zika desencadeou uma resposta antiviral disfuncional na interface materno-fetal. Além disso, a decídua materna possui uma grande variedade de células imunes em sua composição e representa uma importante barreira no combate aos agentes infecciosos durante o período gestacional (LIU; DIAO; HUANG; LI *et al.*, 2017).

O eixo IRF3 e RIG-I desempenha um papel importante durante a infecção pelo ZIKV, sendo um dos principais sensores para esse vírus (SCHILLING; BRIDGEMAN; GRAY; HERTZOG *et al.*, 2020). É importante ressaltar que um dos mecanismos pelos quais o ZIKV pode antagonizar a resposta do interferon é por meio da interação com o RIG-I-MAVS (HU; DONG; HE; WU *et al.*, 2019).

Além disso, em relação à obesidade, foi descrito que camundongos deficientes no receptor RIG-I mostram piora do ganho de peso, presença de tecido adiposo branco e resistência à insulina, induzidos por dieta hiperlipídica (YANG; LEE; SEOK; KANG *et al.*, 2021).

Na análise *in vitro* de macrófagos da placenta, pela colaboração com o grupo do Dr. David Aronoff da Universidade de Indiana, EUA, foi possível o estabelecimento de um modelo para avaliar os mecanismos de desregulação imunológica provocados pela obesidade. Foi utilizado protocolo para isolar macrófagos placentários, majoritariamente do lado fetal, tratados com ácido fólico e posteriormente estimulados com palmitato, um ácido graxo de cadeia curta com alta circulação em indivíduos com obesidade (ROCHA; CALDAS; OLIVEIRA; BRESSAN *et al.*, 2016). Pudemos verificar um aumento de IL-1 β e diminuição de IL-10 no contexto da ativação com palmitato, já descrita anteriormente (ROGERS; SEREZANI; EASTMAN; HASTY *et al.*, 2020).

Em caráter preliminar, não foi possível observar uma modulação pelo ácido fólico na presença ou ausência de palmitato na expressão de receptor β de folato (FR β), e na produção de citocinas e fatores de perfil inflamatório/antinflamatório dos macrófagos da placenta. Existe uma relação causal bem estabelecida entre a deficiência de folato na gravidez e defeitos do tubo neural fetal (DTN), resultantes da falha na fusão do tubo neural entre os dias 21-27 da vida embrionária, que pode se manifestar no cérebro na forma de anencefalia ou encefalocele (SANTANDER BALLESTÍN; GIMÉNEZ CAMPOS; BALLESTÍN BALLESTÍN; LUESMA BARTOLOMÉ, 2021). A suplementação com ácido fólico durante a gravidez reduz drasticamente a incidência de DTN (LAURENCE; JAMES; MILLER; TENNANT *et al.*, 1981). Além disso, ácido fólico

tem sido descrito com um papel importante na regulação da resposta inflamatória exacerbada (AU-YEUNG; YIP; SIOW; O, 2006), como a obesidade. Alguns estudos recentes sugerem que a obesidade durante a gestação pode mascarar a deficiência de nutrientes importantes como o folato, e acarretar consequências deletérias nos recém-natos (CASTAÑO-MORENO; RONCO; CASANELLO, 2023; PATEL; SELVARAJU; BABU; GEETHA, 2023). Faz-se necessário uma amostragem satisfatória e investigações mais aprofundadas para a compreensão da interação entre a suplementação com ácido fólico e aumento de palmitato circulante na imunidade de macrófagos da placenta.

De forma geral, observamos que a obesidade pré-gestacional associada à infecção pelo ZIKV alterou o eixo RIG-I/IRF3 na placenta. Essa resposta imunológica antiviral prejudicada na obesidade gestacional, juntamente com os mecanismos virais para evadir a imunidade do hospedeiro, são um fator de risco para o feto. Estratégias de suplementação e adequação nutricional nas gestantes, como o ácido fólico, podem ser alternativas que corroborem a redução da inflamação exacerbada e disfunção imunológica.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Na ausência de infecção, mulheres com obesidade pré-gestacional possuem um perfil transcricional de fatores antivirais placentários equilibrados, porém, na vigência de infecção por ZIKV, foram vistas alterações na expressão dos fatores relacionados com a resposta de interferon, como RIG-I, IRF3 e IFIH1 na placenta;
- As alterações na expressão dos fatores antivirais nas placentas de mães com obesidade não mostraram relação com a gravidade da infecção, como ocorrência de microcefalia, considerando que, neste grupo, a infecção por ZIKV ocorreu majoritariamente no segundo trimestre gestacional;
- Dados preliminares em modelo de estudo *in vitro* permitiram a caracterização de macrófagos placentários humanos purificados, que aumentam a resposta inflamatória ao estímulo com palmitato;
- Na avaliação de fatores nutricionais, essenciais para a manutenção do curso saudável gestacional, mais ensaios são necessários para a compreensão da influência da suplementação com ácido fólico no contexto da obesidade.

7. REFERÊNCIAS

ADAMSKI, A.; BERTOLLI, J.; CASTAÑEDA-ORJUELA, C.; DEVINE, O. J. *et al.* Estimating the numbers of pregnant women infected with Zika virus and infants with congenital microcephaly in Colombia, 2015-2017. **J Infect**, Apr 2018.

ALBERCA, R. W.; OLIVEIRA, L. M.; BRANCO, A. C. C. C.; PEREIRA, N. Z. *et al.* Obesity as a risk factor for COVID-19: an overview. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 61, n. 13, p. 2262-2276, 2021.

AU-YEUNG, K. K.; YIP, J. C.; SIOW, Y. L.; O, K. Folic acid inhibits homocysteine-induced superoxide anion production and nuclear factor kappa B activation in macrophages. **Can J Physiol Pharmacol**, 84, n. 1, p. 141-147, Jan 2006.

AZAMOR, T.; CUNHA, D. P.; DA SILVA, A. M. V.; BEZERRA, O. C. L. *et al.* Congenital Zika Syndrome Is Associated With Interferon Alfa Receptor 1. **Front Immunol**, 12, p. 764746, 2021.

BADAWI, A.; VELUMMAILUM, R.; RYOO, S. G.; SENTHINATHAN, A. *et al.* Prevalence of chronic comorbidities in dengue fever and West Nile virus: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, 13, n. 7, p. e0200200, 2018.

BAYER, A.; LENNEMANN, N. J.; OUYANG, Y.; BRAMLEY, J. C. *et al.* Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. **Cell Host Microbe**, 19, n. 5, p. 705-712, May 2016.

BOULLIER, A.; LI, Y.; QUEHENBERGER, O.; PALINSKI, W. *et al.* Minimally oxidized LDL offsets the apoptotic effects of extensively oxidized LDL and free cholesterol in macrophages. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 26, n. 5, p. 1169-1176, May 2006.

CALABRO, P.; CHANG, D. W.; WILLERSON, J. T.; YEH, E. T. Release of C-reactive protein in response to inflammatory cytokines by human adipocytes: linking obesity to vascular inflammation. **J Am Coll Cardiol**, 46, n. 6, p. 1112-1113, Sep 2005.

CAROD-ARTAL, F. J. [Epidemiology and neurological complications of infection by the Zika virus: a new emerging neurotropic virus. Reply]. **Rev Neurol**, 63, n. 3, p. 143-144, 08 2016.

CARRILHO, T. R. B.; FARIAS, D. R.; BATALHA, M. A.; COSTA, N. C. F. *et al.* Brazilian Maternal and Child Nutrition Consortium: establishment, data

harmonization and basic characteristics. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 14869, Sep 10 2020.

CASTAÑO-MORENO, E.; RONCO, A. M.; CASANELLO, P. Metabolic Interaction Between Folate, Vitamin B12, and Polyunsaturated Fatty Acids in Pregnancy. **Adv Exp Med Biol**, 1428, p. 83-98, 2023.

CASTOLDI, A.; NAFFAH DE SOUZA, C.; CÂMARA, N. O.; MORAES-VIEIRA, P. M. The Macrophage Switch in Obesity Development. **Front Immunol**, 6, p. 637, 2015.

CHAUVIN, C.; RETNAKUMAR, S. V.; BAYRY, J. Obesity negatively impacts maintenance of antibody response to COVID-19 vaccines. **Cell Rep Med**, 4, n. 7, p. 101117, Jul 18 2023.

CHU, S. Y.; KIM, S. Y.; BISH, C. L. Prepregnancy obesity prevalence in the United States, 2004-2005. **Matern Child Health J**, 13, n. 5, p. 614-620, Sep 2009.

CIDADE, D.; MARGOTTO, P.; PERAÇOLI, J. Pre-pregnancy obesity and overweight: Prevalence and major maternal complications. **Com. Ciências Saúde**, 22, p. 13, 2011.

CNATTINGIUS, S.; VILLAMOR, E.; JOHANSSON, S.; EDSTEDT BONAMY, A. K. *et al.* Maternal obesity and risk of preterm delivery. **JAMA**, 309, n. 22, p. 2362-2370, Jun 2013.

CUGOLA, F. R.; FERNANDES, I. R.; RUSSO, F. B.; FREITAS, B. C. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, 534, n. 7606, p. 267-271, 06 2016.

DAMASO, Ê.; BETTIOL, H.; CARDOSO, V. C.; VIEIRA, C. S. *et al.* Sociodemographic and reproductive risk factors associated with obesity in a population of brazilian women from the city of Ribeirão Preto: a cross-sectional study. **BMC Public Health**, 23, n. 1, p. 1222, Jun 23 2023.

EASTERBROOK, J. D.; DUNFEE, R. L.; SCHWARTZMAN, L. M.; JAGGER, B. W. *et al.* Obese mice have increased morbidity and mortality compared to non-obese mice during infection with the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. **Influenza Other Respir Viruses**, 5, n. 6, p. 418-425, Nov 2011.

ENGIN, A. B. Adipocyte-Macrophage Cross-Talk in Obesity. **Adv Exp Med Biol**, 960, p. 327-343, 2017.

FALAGAS, M. E.; KOMPOTI, M. Obesity and infection. **Lancet Infect Dis**, 6, n. 7, p. 438-446, Jul 2006.

FRASCA, D.; BLOMBERG, B. B. The Impact of Obesity and Metabolic Syndrome on Vaccination Success. **Interdiscip Top Gerontol Geriatr**, 43, p. 86-97, 2020.

GAUDET, L.; FERRARO, Z. M.; WEN, S. W.; WALKER, M. Maternal obesity and occurrence of fetal macrosomia: a systematic review and meta-analysis. **Biomed Res Int**, 2014, p. 640291, 2014.

GUGLIELMI, V.; COLANGELI, L.; D'ADAMO, M.; SBRACCIA, P. Susceptibility and Severity of Viral Infections in Obesity: Lessons from Influenza to COVID-19. Does Leptin Play a Role? **Int J Mol Sci**, 22, n. 6, Mar 20 2021.

HAMEL, R.; DEJARNAC, O.; WICHIT, S.; EKCHARIYAWAT, P. *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **J Virol**, 89, n. 17, p. 8880-8896, Sep 2015.

HANNERS, N. W.; EITSON, J. L.; USUI, N.; RICHARDSON, R. B. *et al.* Western Zika Virus in Human Fetal Neural Progenitors Persists Long Term with Partial Cytopathic and Limited Immunogenic Effects. **Cell Rep**, 15, n. 11, p. 2315-2322, 06 2016.

HU, Y.; DONG, X.; HE, Z.; WU, Y. *et al.* Zika virus antagonizes interferon response in patients and disrupts RIG-I-MAVS interaction through its CARD-TM domains. **Cell Biosci**, 9, p. 46, 2019.

HUTTUNEN, R.; SYRJÄNEN, J. Obesity and the risk and outcome of infection. **Int J Obes (Lond)**, 37, n. 3, p. 333-340, Mar 2013.

JAMES, W. P. WHO recognition of the global obesity epidemic. **Int J Obes (Lond)**, 32 Suppl 7, p. S120-126, Dec 2008.

JAYABALAN, N.; NAIR, S.; NUZHAT, Z.; RICE, G. E. *et al.* Cross Talk between Adipose Tissue and Placenta in Obese and Gestational Diabetes Mellitus Pregnancies. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 8, p. 239, 2017.

KARLSSON, E. A.; MARCELIN, G.; WEBBY, R. J.; SCHULTZ-CHERRY, S. Review on the impact of pregnancy and obesity on influenza virus infection. **Influenza Other Respir Viruses**, 6, n. 6, p. 449-460, Nov 2012.

KNÖFLER, M.; HAIDER, S.; SALEH, L.; POLLHEIMER, J. *et al.* Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. **Cell Mol Life Sci**, 76, n. 18, p. 3479-3496, Sep 2019.

KÖSTLIN, N.; HOFSTÄDTER, K.; OSTERMEIR, A. L.; SPRING, B. *et al.* Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype. **J Immunol**, 196, n. 3, p. 1132-1145, Feb 2016.

LAURENCE, K. M.; JAMES, N.; MILLER, M. H.; TENNANT, G. B. *et al.* Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. **Br Med J (Clin Res Ed)**, 282, n. 6275, p. 1509-1511, May 09 1981.

LAZEAR, H. M.; STRINGER, E. M.; DE SILVA, A. M. The Emerging Zika Virus Epidemic in the Americas: Research Priorities. **JAMA**, 315, n. 18, p. 1945-1946, May 2016.

LEAL, L. F.; MERCKX, J.; FELL, D. B.; KUCHENBECKER, R. *et al.* Characteristics and outcomes of pregnant women with SARS-CoV-2 infection and other severe acute respiratory infections (SARI) in Brazil from January to November 2020. **Braz J Infect Dis**, 25, n. 5, p. 101620, 2021.

LEE, J. Y.; YE, J.; GAO, Z.; YOUN, H. S. *et al.* Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. **J Biol Chem**, 278, n. 39, p. 37041-37051, Sep 2003.

LEONHARD, S. E.; TAN, C. Y.; VAN DER EIJK, A. A.; REISIN, R. R. *et al.* Antecedent infections in Guillain-Barré syndrome in endemic areas of arbovirus transmission: A multinational case-control study. **J Peripher Nerv Syst**, 26, n. 4, p. 449-460, Dec 2021.

LIQIANG, S.; FANG-HUI, L.; MINGHUI, Q.; YANAN, Y. *et al.* Free fatty acids and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are correlated with chronic inflammation in obesity. **Lipids Health Dis**, 22, n. 1, p. 93, Jul 04 2023.

LIU, S.; DIAO, L.; HUANG, C.; LI, Y. *et al.* The role of decidual immune cells on human pregnancy. **J Reprod Immunol**, 124, p. 44-53, Nov 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

MARTINOT, A. J.; ABBINK, P.; AFACAN, O.; PROHL, A. K. *et al.* Fetal Neuropathology in Zika Virus-Infected Pregnant Female Rhesus Monkeys. **Cell**, Mar 2018.

MCKERNAN, K.; VARGHESE, M.; PATEL, R.; SINGER, K. Role of TLR4 in the induction of inflammatory changes in adipocytes and macrophages. **Adipocyte**, 9, n. 1, p. 212-222, Dec 2020.

MINER, J. J.; CAO, B.; GOVERO, J.; SMITH, A. M. *et al.* Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, 165, n. 5, p. 1081-1091, May 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. (2020). "Microcefalia – situação epidemiológica" ["https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/microcefalia"](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/microcefalia) Acesso em Julho/2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. (2022). "O impacto da obesidade" Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-brasil/eu-queroter-peso-saudavel/noticias/2022/o-impacto-da-obesidade>. Acesso em Julho/2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. (2023). "Painel de Monitoramento das Arboviroses" Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/monitoramento-das-arboviroses>. Acesso em Julho/2023.

MISUMI, I.; STARMER, J.; UCHIMURA, T.; BECK, M. A. *et al.* Obesity Expands a Distinct Population of T Cells in Adipose Tissue and Increases Vulnerability to Infection. **Cell Rep**, 27, n. 2, p. 514-524.e515, 04 2019.

MOREIRA, A. P.; TEXEIRA, T. F.; FERREIRA, A. B.; PELUZIO, M. O. C. *et al.* Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. **Br J Nutr**, 108, n. 5, p. 801-809, Sep 2012.

MURTHI, P.; FITZPATRICK, E.; BORG, A. J.; DONATH, S. *et al.* GAPDH, 18S rRNA and YWHAZ are suitable endogenous reference genes for relative gene expression studies in placental tissues from human idiopathic fetal growth restriction. **Placenta**, 29, n. 9, p. 798-801, Sep 2008.

ORR, K.; CHIEN, P. Sepsis in obese pregnant women. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, 29, n. 3, p. 377-393, Apr 2015.

PATEL, P.; SELVARAJU, V.; BABU, J. R.; GEETHA, T. Association of the DNA Methylation of Obesity-Related Genes with the Dietary Nutrient Intake in Children. **Nutrients**, 15, n. 13, Jun 22 2023.

PEREIRA, A. M.; ARAUJO JÚNIOR, E.; WERNER, H.; MONTEIRO, D. L. M. Zika Virus and Pregnancy: Association between Acute Infection and

Microcephaly in Newborns in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Geburtshilfe Frauenheilkd**, 80, n. 1, p. 60-65, Jan 2020.

PINGEN, M.; BRYDEN, S. R.; PONDEVILLE, E.; SCHNETTLER, E. *et al.* Host Inflammatory Response to Mosquito Bites Enhances the Severity of Arbovirus Infection. **Immunity**, 44, n. 6, p. 1455-1469, 06 2016.

PUGLIESE, G.; LICCARDI, A.; GRAZIADIO, C.; BARREA, L. *et al.* Obesity and infectious diseases: pathophysiology and epidemiology of a double pandemic condition. **Int J Obes (Lond)**, 46, n. 3, p. 449-465, Mar 2022.

PÉREZ LEIRÓS, C.; RAMHORST, R. Tolerance induction at the early maternal-placental interface through selective cell recruitment and targeting by immune polypeptides. **Am J Reprod Immunol**, 69, n. 4, p. 359-368, Apr 2013.

QUICKE, K. M.; BOWEN, J. R.; JOHNSON, E. L.; MCDONALD, C. E. *et al.* Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. **Cell Host Microbe**, 20, n. 1, p. 83-90, Jul 2016.

RABELO, K.; DE SOUZA, L. J.; SALOMÃO, N. G.; MACHADO, L. N. *et al.* Zika Induces Human Placental Damage and Inflammation. **Front Immunol**, 11, p. 2146, 2020.

REYES, L.; GOLOS, T. G. Hofbauer Cells: Their Role in Healthy and Complicated Pregnancy. **Front Immunol**, 9, p. 2628, 2018.

REYNOSO, G. V.; GORDON, D. N.; KALIA, A.; AGUILAR, C. C. *et al.* Zika virus spreads through infection of lymph node-resident macrophages. **Cell Rep**, 42, n. 2, p. 112126, Feb 15 2023.

ROCHA, D. M.; CALDAS, A. P.; OLIVEIRA, L. L.; BRESSAN, J. *et al.* Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. **Atherosclerosis**, 244, p. 211-215, Jan 2016.

ROGERS, L. M.; SEREZANI, C. H.; EASTMAN, A. J.; HASTY, A. H. *et al.* Palmitate induces apoptotic cell death and inflammasome activation in human placental macrophages. **Placenta**, 90, p. 45-51, Jan 15 2020.

SANTANDER BALLESTÍN, S.; GIMÉNEZ CAMPOS, M. I.; BALLESTÍN BALLESTÍN, J.; LUESMA BARTOLOMÉ, M. J. Is Supplementation with Micronutrients Still Necessary during Pregnancy? A Review. **Nutrients**, 13, n. 9, Sep 08 2021.

SCHILLING, M.; BRIDGEMAN, A.; GRAY, N.; HERTZOG, J. *et al.* RIG-I Plays a Dominant Role in the Induction of Transcriptional Changes in Zika Virus-Infected Cells, which Protect from Virus-Induced Cell Death. **Cells**, 9, n. 6, Jun 16 2020.

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. **Arch Pathol Lab Med**, 141, n. 1, p. 68-72, Jan 2017.

SEABRA, G.; PADILHA, P.; JA, Q.; C, S. Pre-gestational overweight and obesity: prevalence and outcomes associated with pregnancy. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 33, p. 6, 2011.

SELKOV, S. A.; SELUTIN, A. V.; PAVLOVA, O. M.; KHROMOV-BORISOV, N. N. *et al.* Comparative phenotypic characterization of human cord blood monocytes and placental macrophages at term. **Placenta**, 34, n. 9, p. 836-839, Sep 2013.

SIMONNET, A.; CHETBOUN, M.; POISSY, J.; RAVERDY, V. *et al.* High Prevalence of Obesity in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) Requiring Invasive Mechanical Ventilation. **Obesity (Silver Spring)**, 28, n. 7, p. 1195-1199, Jul 2020.

STEWART, C. R.; STUART, L. M.; WILKINSON, K.; VAN GILS, J. M. *et al.* CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. **Nat Immunol**, 11, n. 2, p. 155-161, Feb 2010.

SVENSSON-ARVELUND, J.; MEHTA, R. B.; LINDAU, R.; MIRRASEKHIAN, E. *et al.* The human fetal placenta promotes tolerance against the semiallogeneic fetus by inducing regulatory T cells and homeostatic M2 macrophages. **J Immunol**, 194, n. 4, p. 1534-1544, Feb 2015.

TABATA, T.; PETITT, M.; PUERTA-GUARDO, H.; MICHLMAYR, D. *et al.* Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. **Cell Host Microbe**, 20, n. 2, p. 155-166, Aug 2016.

TAN, V. P. K.; NGIM, C. F.; LEE, E. Z.; RAMADAS, A. *et al.* The association between obesity and dengue virus (DENV) infection in hospitalised patients. **PLoS One**, 13, n. 7, p. e0200698, 2018.

TANG, B. L. Zika virus as a causative agent for primary microencephaly: the evidence so far. **Arch Microbiol**, 198, n. 7, p. 595-601, Sep 2016.

VAN KERKHOVE, M. D.; VANDEMAELE, K. A.; SHINDE, V.; JARAMILLO-GUTIERREZ, G. *et al.* Risk factors for severe outcomes following 2009 influenza A (H1N1) infection: a global pooled analysis. **PLoS Med**, 8, n. 7, p. e1001053, Jul 2011.

WALLACE, J. M.; BHATTACHARYA, S.; CAMPBELL, D. M.; HORGAN, G. W. Inter-pregnancy weight change impacts placental weight and is associated with the risk of adverse pregnancy outcomes in the second pregnancy. **BMC Pregnancy Childbirth**, 14, p. 40, Jan 22 2014.

WALLACE, J. M.; BHATTACHARYA, S.; CAMPBELL, D. M.; HORGAN, G. W. Inter-Pregnancy Weight Change and the Risk of Recurrent Pregnancy Complications. **PLoS One**, 11, n. 5, p. e0154812, 2016.

WEI, R.; LAI, N.; ZHAO, L.; ZHANG, Z. *et al.* Dendritic cells in pregnancy and pregnancy-associated diseases. **Biomed Pharmacother**, 133, p. 110921, Jan 2021.

WHO. (2018). "Obesity and overweight." Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em Julho/2023.

WORLD OBESITY ATLAS (2023). Disponível em: <https://www.worldobesity.org/resources/resource-library/world-obesity-atlas-2023>. Acesso em Julho/2023.

YANG, G.; LEE, H. E.; SEOK, J. K.; KANG, H. C. *et al.* RIG-I Deficiency Promotes Obesity-Induced Insulin Resistance. **Pharmaceuticals (Basel)**, 14, n. 11, Nov 17 2021.

YOSHIKAWA, F. S. Y.; PIETROBON, A. J.; BRANCO, A. C. C. C.; PEREIRA, N. Z. *et al.* Zika Virus Infects Newborn Monocytes Without Triggering a Substantial Cytokine Response. **J Infect Dis**, Feb 2019.

ZHANG, Z. W.; LI, Z. L.; YUAN, S. The Role of Secretory Autophagy in Zika Virus Transfer through the Placental Barrier. **Front Cell Infect Microbiol**, 6, p. 206, 2016.

ZULKIPLI, M. S.; DAHLUI, M.; JAMIL, N.; PERAMALAH, D. *et al.* The association between obesity and dengue severity among pediatric patients: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, 12, n. 2, p. e0006263, 02 2018.

8. APÊNDICES

8.1 Aprovação do trabalho na Comissão de Ética

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Adiposidade no binômio mãe/recém-nascido: estudo coorte prospectivo

Pesquisador: PATRICIA HELEN DE CARVALHO RONDÓ

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 6

CAAE: 59787216.2.0000.5421

Instituição Proponente: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - FSP/USP

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.992.746

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivos da Pesquisa" e "Avaliação de Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo de informações básicas do projeto [PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1824316_E3.pdf, postado em 10/09/2021], do projeto de pesquisa [Projeto_detalhado.pdf, postado em 05/09/2016] e de documento assinado pela coordenadora do estudo, Profa. Tit. Patrícia Helen de Carvalho Rondó [Adendo_projeto_10092021.pdf, postado em 10/09/2021].

Trata-se de pedido de emenda a projeto anteriormente avaliado por este CEP:

"Solicito o pedido de adendo do projeto de pesquisa supracitado. A justificativa é que fragmentos placentários humanos foram previamente coletados e armazenados, já foram explorados em relação a várias expressões gênicas, podendo ainda ser mais explorados no presente subprojeto encaminhado abaixo, assim, auxiliando na compreensão da imunidade antiviral no contexto da obesidade gestacional. Esse subprojeto deve ser desenvolvido em parceria com a ex-aluna de pós-doutorado Naiara Dejani, ligada ao projeto supracitado, e também com a Profa. Maria Sato do ICB e FM, USP"

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 01.246-904

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3061-7779

Fax: (11)3061-7779

E-mail: coep@fsp.usp.br

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP



Continuação do Parecer: 4.992.746

Vale ressaltar que: "A emenda é exclusiva de seu Centro Coordenador, então as alterações realizadas em seu projeto, em virtude da emenda, NÃO serão replicadas nos Centros Participantes vinculados e nos Comitês de Ética das Instituições Coparticipantes, quando da sua aprovação."

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo da pesquisa:

"Avaliar a relação entre adiposidade, fatores metabólicos, inflamatórios e imunológicos e expressão gênica de mulheres na gestação com adiposidade dos conceptos na vida fetal, neonatal e com 1 ano de idade."

Objetivo do subprojeto:

"O presente subprojeto visa avaliar a expressão gênica e proteica de fatores inflamatórios, reguladores e antivirais em amostras de placentas de gestantes com obesidade, sobrepeso e eutróficas."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"Riscos:

DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS: Todas essas medidas serão realizadas em cada trimestre da gestação, e por esta razão, estes procedimentos poderão trazer algum desconforto a criança e a senhora, pois será necessário contar com a sua presença e do seu (sua) filho (a) por 5 vezes até que complete um ano de vida. As medições e manuseios da criança serão realizados em sua presença por profissionais devidamente treinados para minimizar eventuais riscos.

Benefícios:

BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS PARA O SUJEITO DA PESQUISA E/OU COLETIVIDADE: Ao final do estudo poderá haver benefício para a senhora e seu (sua) filho (a) como acompanhamento do crescimento do seu (sua) filho (a) desde a fase fetal até 1 ano de vida. Além disso serão realizados no pré-natal exames que usualmente não estão disponíveis na rede pública de saúde. Esta pesquisa poderá guiar as intervenções preventivas e consequente melhoria das condições de

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 01.246-904
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3061-7779 **Fax:** (11)3061-7779 **E-mail:** coep@fsp.usp.br

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP



Continuação do Parecer: 4.992.746

saúde materno-infantil."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Desenho do estudo: coorte prospectivo (observacional)

Patrocinador: FAPESP

País de origem: Brasil (Araraquara, SP)

Número de participantes: 6.000 (2.000 recém-nascidos; 2.000 gestantes/fetos; 2.000 crianças com 1 ano)

Armazenamento de amostras: sim

Previsão de encerramento do estudo: Agosto/2021 (relatório científico)

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

Recomendações:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda apresentada não implica em óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ressalta-se que cabe ao pesquisador responsável encaminhar os relatórios parciais (de 6 em 6 meses) e final da pesquisa, por meio da Plataforma Brasil, via notificação do tipo "relatório" para que sejam devidamente analisados pelo CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1824316_E3.pdf	10/09/2021 18:25:21		Aceito
Outros	Adendo_projeto_10092021.pdf	10/09/2021 18:10:43	PATRICIA HELEN DE CARVALHO	Aceito

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 01.246-904

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3061-7779

Fax: (11)3061-7779

E-mail: coep@fsp.usp.br

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP



Continuação do Parecer: 4.992.746

Outros	Adendo_10052020.pdf	10/05/2020 17:15:46	PATRICIA HELEN DE CARVALHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_10052020.pdf	10/05/2020 17:15:22	PATRICIA HELEN DE CARVALHO RONDÓ	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	03/05/2019 12:33:14	PATRICIA HELEN DE CARVALHO	Aceito
Outros	carta_anuencia.pdf	09/11/2016 12:38:32	PATRICIA HELEN DE CARVALHO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	05/09/2016 17:51:20	PATRICIA HELEN DE CARVALHO RONDÓ	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 23 de Setembro de 2021

Assinado por:

Kelly Polido Kaneshiro Olympio
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 01.246-904

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3061-7779

Fax: (11)3061-7779

E-mail: coep@fsp.usp.br



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
Departamento de Nutrição

São Paulo, 17 de junho de 2021

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins concordar com acesso ao material biológico e dados dos questionários do Estudo "RELAÇÃO ENTRE ADIPOSIDADE MATERNA E ADIPOSIDADE DO CONCEPTO NOS PERÍODOS FETAL E NEONATAL E NO PRIMEIRO ANO DE VIDA: ESTUDO COORTE PROSPECTIVO" (Auxílio a Pesquisa Temático FAPESP, processo 2015/03333-6, número de registro na plataforma Brasil CAAE: 59787216.2.0000.5421) para a realização de parte do projeto de doutorado de Anna Cláudia Calvielli Castelo Branco, sob orientação da Profa. Dra. Maria Notomi Sato do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo, Junto ao Programa de Pós-graduação ICBIV. Importante enfatizar que no projeto temático da FAPESP já havia sido previsto avaliação de expressão gênica, sendo que parte dos genes a serem investigados estão sendo avaliados por aluna de doutorado sob minha supervisão, em colaboração com a FMRPUSP.

São Paulo, 17 de junho de 2021

Profa. Dra. Patrícia Helen de Carvalho Rondó
Coordenadora do Estudo Temático Coorte Araraquara
Contato: phcrondo@usp.br

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Exposição Vertical ao Zika Vírus e suas conseqüências no neurodesenvolvimento da criança

Pesquisador: maria elisabeth lopes moreira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 52675616.0.0000.5269

Instituição Proponente: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

Patrocinador Principal: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.397.153

Apresentação do Projeto:

O recente aumento de casos de microcefalia congênitas observado no Brasil é motivo de grande preocupação. Uma vez que o aumento se deu alguns meses após a introdução do ZIKA vírus (ZIKV) no país, associado com relatos de parturientes com doenças febris e exantemática durante a gestação, a hipótese da relação entre a infecção por ZIKV e a microcefalia tornou se plausível. No entanto, estudos sobre a fisiopatologia da

infecção materna por ZIKV, suas conseqüências para o feto e o desenvolvimento de encefalopatias graves ainda são necessários. É preciso conhecer a história natural da transmissão vertical e sua associação com alterações do neurodesenvolvimento fetal, através da identificação de biomarcadores de risco, mecanismos de resposta inflamatórias, evolução viral e desenvolvimento de testes sorológicos para identificação de infecção pelo

Zikavírus. O *Aedes aegypti* é responsável pela transmissão de diversos tipos de vírus de interesse para a saúde humana. Atualmente é responsável pela transmissão dos vírus da Dengue (DENV), Chikungunya (CHKV) e Zika (ZIKAV) em proporções epidêmicas.

Este projeto realizará um estudo longitudinal da gestação até o final do terceiro ano de vida no qual a exposição principal será a infecção por Zika vírus. Os desfechos do estudo serão: microcefalia e outras anomalias congênitas neurológicas, alterações oftalmológicas, auditivas e do

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS**



Continuação do Parecer: 1.397.153

Benefícios:

Os benefícios estão ligados ao acompanhamento da gravidez e do desenvolvimento do recém-nascido no IFF, com exames que em geral não seriam realizados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante principalmente no momento em que o país enfrenta uma epidemia pelo Zika vírus e o crescimento alarmante no número de recém nascidos com microcefalia. O projeto vai estudar a história natural da doença através do seguimento de gestantes e de seus bebês até o terceiro ano de vida.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Deve ser anexado uma nova versão do TCLE utilizando um texto de fácil compreensão para o participante. Para a conformidade do TCLE com a 466/12 deve ser acrescentado o item sobre garantia de ressarcimento, garantia de indenização e garantia de sigilo.

Recomendações:

Aprovar e aguardar a inclusão da nova versão do TCLE de acordo com as considerações do relator. A nova versão assinada e carimbada pelo CEP é que deve ser utilizada.

Anexar a carta de registro do projeto no Departamento de Pesquisa.

Evitar exames invasivos em crianças assintomáticas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Observar a anexação de nova versão do TCLE e da carta de registro no Departamento de Pesquisa

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_BÁSICAS_DO_PROJETO_655029.pdf	22/01/2016 16:48:38		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	zikaprojeto.docx	22/01/2016 16:47:47	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	neonatologia.pdf	22/01/2016 16:44:50	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	pediatria.pdf	22/01/2016 16:44:28	maria elisabeth lopes moreira	Aceito

Endereço: RUI BARBOSA, 716
Bairro: FLAMENGO CEP: 22.250-020
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2554-1730 Fax: (21)2552-8491 E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS**



Continuação do Parecer: 1.397.153

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	22/01/2016 16:43:54	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	22/01/2016 16:43:15	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	obstetricia.pdf	22/01/2016 16:35:54	maria elisabeth lopes moreira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 28 de Janeiro de 2016

Assinado por:

Ana Maria Aranha Magalhães Costa
(Coordenador)

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

APPROVAL LETTER

To: Haas, David

Protocol #: 1011003384

Protocol Title: The Building Blocks of Pregnancy Biobank: A Biorepository of Specimens and Pregnancy Outcomes

Type of Submission: Amendment

Level of Review: Expedited

Approval Date: Tuesday, May 18th 2021

Expiration Date: no date provided

**If Expiration Date = "No date provided," this research does not require annual renewal; thus there is no expiration date.*

IRB-04 approved the above-referenced submission. Conduct of this study is subject to the IU HRPP Policies, as applicable.

Additional Notes:

Amendment A052

This research is approved under the following expedited categories:

- Category 2(b)
- Category 3
- Category 5
- Category 7

Documents approved with this submission:

Attachments

Data Collection Instrument	Participant Information.docx	Patient information
HIPAA Authorization Form	AUT Spanish 06 30 20.doc	Authorization - (spanish).06.30.2020
HIPAA Authorization Form	AUT Adult - English 4.15.2020.docx	Adult English 04.15.2020
HIPAA Authorization Form	AUT Spanish Minor 06 30 20.doc	Minors (spanish) 05.06.2015
HIPAA Authorization Form	AUT Minors English_8.28.2020.docx	Minors English 08.28.2020
Informed Consent Statement	BBPB ICF - v.10.7.2020.docx	ICS v10.7.2020

Informed Consent Statement	BBPB ICF - v.10.7.2020.pdf	ICS v10.7.2020 - final stamped
Informed Consent Statement	BBPB_spanish ICF v.8 10.26.2020.docx	BBPB Spanish Informed Consent
Informed Consent Statement	BBPB_spanish ICF v.8 10.26.2020.pdf	final stamped Spanish ICS v10.26.2020
Other	BBPB DV Spanish v.1.xlsx	Disbursement Voucher-Spanish
Other	BBPB COVID-19 Notifications Spanish v.1.docx	COVID-19 Test Results-Spanish
Other	1011003384 - Haas - 007 - OTH BBPB Patient Cards.doc	BBPB Patient Cards
Other	infant follow up questionnaire.docx	A013 Infant Follow-up Questionnaire
Other	1011003384 - Haas - 007 - Subject Information Sheet.docx	Subject Information Sheet
Other	BBPB Study Subject Disbursement Voucher v.1 6.23.2020.xlsx	Disbursement Voucher
Other	COVID-19 Test Notification Templates.docx	COVID-19 Testing Result Notification
Other	BBPB Gift Mail Letter English & Spanish v.1.docx	Compensation Letters (English & Spanish)
Other	Remote Procedure Letters v.2.docx	Remote Visit Letter and Directions
Protocol	BBPB PRO -6.23.2020.docx	BBPB protocol updated 6.23.2020
Recruitment Materials	BBPB Phone Script Spanish v.1.docx	Phone Script-Spanish
Recruitment Materials	OBGYN Side # 1 1.22.16.docx	recruitment flyer
Recruitment Materials	BBPB iConnect Website Text v.1.docx	iConnect Website Text
Recruitment Materials	BBPB More Information Email Template v.1.docx	Email Recruitment Template
Recruitment Materials	BBPB Phone Screening Script v.1.pdf	BBPB Phone Script
Recruitment Materials	1011003384 SIS v.2 EZ L&D.docx	Eskenazi L&D version 2 (English & Spanish)
Recruitment Materials	1011003384 SIS v.2 MH L&D.docx	Methodist Hospital L&D v.2 (English & Spanish)

8.2 Atividades acadêmicas desenvolvidas no período

8.2.1 Estágio de pesquisa no exterior

- 2022-2023 – Período de estágio no Laboratório do Dr. David Aronoff - School of Medicine, University of Indiana, Indianápolis, IN, EUA

8.2.2 Participação em Eventos

- São Paulo School of Advanced Science on Molecular Basis of Inflammatory Diseases. “Evaluation of inflammation via TLR4 activation during Zika virus infection in human placental villi” – Ribeirão Preto, Brasil – 2019.
- XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia. “Evaluation of inflammation via TLR4 activation during Zika virus infection in human placental villi” – Florianópolis, Brasil - 2019.
- Sexto Simpósio Internacional em Doenças Inflamatórias (Inflamma VI). “Influence of gestational obesity on Zika virus congenital infection” – Online – 2021.
- Keystone Symposia meeting Maternal-Fetal Newborn Immunity. “Influence of gestational obesity on Zika virus congenital infection” – Online – 2021.
- Summer Course in Immune Regulation of the Skin, University of Copenhagen. “Influence of gestational obesity on Zika virus congenital infection” – Hornbaek, Dinamarca – 2022.
- Keystone Symposia meeting on Infections in Pregnancy. “Influence of gestational obesity on Zika virus congenital infection” – Santa Fé, Novo México, EUA – 2023.

8.2.3 Organização de Eventos

- VII Curso de Férias em Imunologia – Instituto de Ciências Biomédicas/USP – 2019.
- I Workshop of Innate Immunity and Host Defense – Instituto de Ciências Biomédicas/USP – 2019.
- IX Encontro da Pós Graduação em Imunologia Curso de Férias em Imunologia – Instituto de Ciências Biomédicas/USP – 2020.
- Seminários Científicos do LIM56 – Faculdade de Medicina/USP – 2021/2022.

8.2.4 Revisão em Periódicos

- Journal of Clinical and Experimental Dermatology (2020)
- Scientific Reports (2021)
- BMC Immunology (2021)
- Frontiers in Immunology (2023)

8.2.5 Prêmios e Divulgação Científica

- Representação discente na CCP – Imunologia, na qualidade de titular (2019/2020);
- Representação discente na CCP – Imunologia, na qualidade de suplente (2020/2021);
- Co-fundadora da plataforma de divulgação científica “COVID Verificado” (2020)
- Participação na “Rede Nacional de Combate à Desinformação” – RNCD.org (2020)
- 1º lugar no prêmio “Otto Bier – melhor dissertação de mestrado” – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (2020)
- “1º Prêmio da Pós Graduação da Universidade de São Paulo – Vídeo no combate à COVID-19” (2020)
- “Global Health Travel Award to attend the Keystone Symposia – New Mexico, USA, Bill and Melinda Gates Foundation” (2023)

8.3 Produção científica no período

8.3.1 Artigos publicados em primeira autoria

www.nature.com/scientificreports

**SCIENTIFIC
REPORTS**

natureresearch

OPEN

Proinflammatory profile of neonatal monocytes induced by microbial ligands is downmodulated by histamine

Received: 7 January 2019
Accepted: 4 September 2019
Published online: 23 September 2019

Anna Cláudia Calvielli Castelo Branco^{1,2}, Nátalli Zanete Pereira¹, Fábio Seiti Yamada Yoshikawa¹, Luanda Mara da Silva Oliveira¹, Franciane Mouradian Emidio Teixeira^{1,2}, Luana de Mendonça Oliveira¹, Anna Julia Pietrobbon^{1,2}, Marina Passos Torrealba¹, Josenilson Feitosa de Lima¹, Alberto José da Silva Duarte¹ & Maria Notomi Sato^{1,2}

 **frontiers**
in Cellular and Infection Microbiology

OPINION
published: 23 September 2020
doi: 10.3389/fcimb.2020.550571



The Possible Dual Role of the ACE2 Receptor in Asthma and Coronavirus (SARS-CoV2) Infection










Anna Cláudia Calvielli Castelo Branco^{1,2}, Maria Notomi Sato² and Ricardo Wesley Alberca^{2*}

¹ Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ² Laboratory of Dermatology and Immunodeficiencies, LIM-56, Department of Dermatology, School of Medicine and Institute of Tropical Medicine of São Paulo, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Keywords: SARS-CoV2, asthma, COVID 19, ACE2, inflammation

Article

Obesity Induces an Impaired Placental Antiviral Immune Response in Pregnant Women Infected with Zika Virus

Anna Cláudia Calvielli Castelo Branco ^{1,2,†} , Emily Araujo De Oliveira ^{1,2,†}, Nátalli Zanete Pereira ^{1,3}, Ricardo Wesley Alberca ^{1,3} , Amaro Nunes Duarte-Neto ⁴ , Luiz Fernando Ferraz Da Silva ⁴ , Fernanda Guedes Luiz ⁵, Naiura Vieira Pereira ³, Mirian Nacagami Sotto ^{3,4} , Naiara Naiana Dejani ⁶, Patrícia Helen Carvalho Rondó ⁷ , Elyzabeth Avvad-Portari ⁸, Zilton Farias Meira De Vasconcelos ⁸ , Alberto José da Silva Duarte ^{1,4}, Tamiris Azamor ^{9,†,‡}  and Maria Notomi Sato ^{1,3,*†,‡} 

8.3.2 Artigos publicados em co-autoria

1. ALBERCA, RICARDO WESLEY ; RAMOS, YASMIM ÁLEFE LEUZZI ; PEREIRA, NÁTALLI ZANETE ; BESERRA, DANIELLE ROSA ; **BRANCO, ANNA CLÁUDIA CALVIELLI CASTELO** ; LEÃO ORFALI, RAQUEL ; AOKI, VALERIA ; DUARTE, ALBERTO JOSE DA SILVA ; SATO, MARIA NOTOMI . Long-term effects of COVID-19 in diabetic and non-diabetic patients. FRONTIERS IN PUBLIC HEALTH, v. 10, p. 1, 2022.

2. BESERRA, DANIELLE ROSA ; ALBERCA, RICARDO WESLEY ; **BRANCO, ANNA CLAUDIA CALVIELLI CASTELO** ; DE MENDONÇA OLIVEIRA, LUANA ; DE SOUZA ANDRADE, MILENA MARY ; GOZZI-SILVA, SARAH CRISTINA ; TEIXEIRA, FRANCIANE MOURADIAN EMIDIO ; YENDO, TATIANA MINA ; DA SILVA DUARTE, ALBERTO JOSÉ ; SATO, MARIA NOTOMI . Upregulation of PD-1 Expression and High sPD-L1 Levels Associated with COVID-19 Severity. JOURNAL OF IMMUNOLOGY RESEARCH, v. 2022, p. 1-9, 2022.

3. SALMERON, AMANDA COSTA AYRES ; BEZERRA, WALLACE PITANGA ; DE SOUZA, RAFAELA LÚCIA LOPES ; PEREIRA, LUANDERSON CARDOSO ; DO NASCIMENTO, LÍCIA MARIA ; **BRANCO, ANNA CLÁUDIA CALVIELLI CASTELO** ; SIMAS, LUIZA EMILIA CAVALCANTI ; DE ALMEIDA, VALÉRIA AZEVEDO ; DE SOUZA PALMEIRA, PEDRO HENRIQUE ; BEZERRA, CHRISTIANE MEDEIROS ; GUEDES, PAULO MARCOS MATTÁ ; SATO, MARIA NOTOMI ; DE FARIAS SALES, VALÉRIA SORAYA ; DE OLIVEIRA FREITAS JÚNIOR, REGINALDO ANTÔNIO ; DE SOUZA LIMA KEESEN, TATJANA ; NASCIMENTO, MANUELA SALES LIMA . Immunological imbalance in microcephalic children with congenital Zika virus syndrome. MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, v. 1, p. 1, 2022.

4. ALBERCA, RICARDO WESLEY ; LIMA, JÚLIA CATALDO ; OLIVEIRA, EMILY ARAUJO DE ; GOZZI-SILVA, SARAH CRISTINA ; RAMOS, YASMIM ÁLEFE LEUZZI ; ANDRADE, MILENA MARY DE SOUZA ; BESERRA, DANIELLE ROSA ; OLIVEIRA, LUANA DE MENDONÇA ; **BRANCO, ANNA CLÁUDIA CALVIELLI CASTELO** ; PIETROBON, ANNA JULIA ; PEREIRA, NÁTALLI ZANETE ; TEIXEIRA, FRANCIANE MOURADIAN EMIDIO ; FERNANDES, IARA GRIGOLETTO ; DUARTE, ALBERTO JOSÉ DA SILVA ; BENARD, GIL ; SATO, MARIA NOTOMI . COVID-19 Disease Course in Former Smokers, Smokers and COPD Patients. *Frontiers in Physiology*, v. 11, p. 1, 2021.

5. GOZZI-SILVA, SARAH CRISTINA ; BENARD, GIL ; ALBERCA, RICARDO WESLEY ; YENDO, TATIANA MINA ; TEIXEIRA, FRANCIANE MOURADIAN EMIDIO ; OLIVEIRA, LUANA DE MENDONÇA ; BESERRA, DANIELLE ROSA ; PIETROBON, ANNA JULIA ; OLIVEIRA, EMILY ARAUJO DE ; **BRANCO, ANNA CLÁUDIA CALVIELLI CASTELO** ; ANDRADE, MILENA MARY DE SOUZA ; FERNANDES, IARA GRIGOLETTO ; PEREIRA, NÁTALLI ZANETE ; RAMOS, YASMIM ÁLEFE LEUZZI ; LIMA, JULIA CATALDO ; PROVENCINI, BRUNA ; MANGINI, SANDRIGO ; DUARTE, ALBERTO JOSÉ DA SILVA ; SATO, MARIA NOTOMI . SARS-CoV-2 Infection and CMV Dissemination in Transplant Recipients as a Treatment for Chagas Cardiomyopathy: A Case Report. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 6, p. 22, 2021.

6. VIRGENS, ANANGÉLICA R. ; GOES, HELIANA F. O. ; CARVALHO, GABRIEL C. ; PIETROBON, ANNA JULIA ; **C. C. BRANCO, ANNA CLÁUDIA** ; RAMOS, YASMIM A. L. ; PEREIRA, NAIURA V. ; ORFALI, RAQUEL L. ; AOKI, VALÉRIA ; SILVA, LUIZ FERNANDO F. ; SOTTO, MIRIAN N. ; REIS, VITOR M.S. ; SATO, MARIA N. . Perivascular clusters of Th2 cells and M2 macrophages in allergic contact dermatitis to methylchloroisothiazolinone and methylisothiazolinone. *EXPERIMENTAL DERMATOLOGY*, v. 1, p. exd.14442, 2021.

7. YENDO, TATIANA MINA ; SATO, MARIA NOTOMI ; **BRANCO, ANNA CLÁUDIA CALVIELLI CASTELO** ; PIETROBON, ANNA JULIA ; TEIXEIRA, FRANCIANE MOURADIAN EMIDIO ; RAMOS, YASMIM ÁLEFE LEUZZI ; ALBERCA, RICARDO WESLEY ; VALÊNCIO, CESAR GIUDICE ; ARRUDA, VIVIAN NUNES ; ROMITI, RICARDO ; ARNONE, MARCELO ; HIRAYAMA, ANDRÉ LUIS DA SILVA ; DUARTE, ALBERTO JOSE DA SILVA ; AOKI, VALERIA ; ORFALI, RAQUEL LEAO . Impact of Inflammatory Immune Dysfunction in Psoriasis Patients at Risk for COVID-19. *Vaccines*, v. 9, p. 478, 2021.

8. ALBERCA, RICARDO WESLEY ; RIGATO, PAULA ORDONHEZ ; RAMOS, YASMIM ÁLEFE LEUZZI ; TEIXEIRA, FRANCIANE MOURADIAN EMIDIO ; **BRANCO, ANNA CLÁUDIA CALVIELLI** ; FERNANDES, IARA

GRIGOLETTO ; PIETROBON, ANNA JULIA ; DUARTE, ALBERTO JOSE DA SILVA ; AOKI, VALERIA ; ORFALI, RAQUEL LEÃO ; SATO, MARIA NOTOMI . Clinical Characteristics and Survival Analysis in Frequent Alcohol Consumers With COVID-19. FRONTIERS IN NUTRITION, v. 8, p. 1, 2021.

9. BRAINER-LIMA, JOÃO P.M. ; LEITE, BRUNO H.S. ; DE ARAÚJO, CATARINA M.C.S. ; DHALIA, RAFAEL ; CÔELHO, DANILO F. ; TEIXEIRA, FRANCIANE M.E. ; **BRANCO, ANNA CLÁUDIA C.C.** ; SATO, MARIA N. ; MARQUES, ERNESTO T.A. ; LINS, ROBERTO D. ; VIANA, ISABELLE F.T. . Are Zika virus cross-reactive antibodies against aquaporin-4 associated to Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder?. JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, v. 360, p. 577697, 2021.

10. DE OLIVEIRA GOES, HELIANA FREITAS ; VIRGENS, ANANGELICA RODRIGUES ; DE CARVALHO, GABRIEL COSTA ; PIETROBON, ANNA JULIA ; **BRANCO, ANNA CLÁUDIA CALVIELLI CASTELO** ; DA SILVA OLIVEIRA, LUANDA MARA ; FERNANDES, IARA G. ; PEREIRA, NAIURA VIEIRA ; SOTTO, MÍRIAN NACAGAMI ; DOS REIS, VITOR MANOEL SILVA ; SATO, MARIA NOTOMI . Proinflammatory and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis caused by Methylchloroisothiazolinone and Methylisothiazolinone. EXPERIMENTAL DERMATOLOGY, v. 1, p. 1, 2020.

11. ALBERCA, RICARDO WESLEY ; OLIVEIRA, LUANA DE MENDONÇA ; **BRANCO, ANNA CLÁUDIA CALVIELLI CASTELO** ; PEREIRA, NÁTALLI ZANETE ; SATO, MARIA NOTOMI . Obesity as a risk factor for COVID-19: an overview. CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION, v. 1, p. 1-15, 2020.

12. MORAIS, K.L. ; MIYAMOTO, D. ; ORFALI, R.L. ; MARUTA, C.W. ; SANTI, C.G. ; SOTTO, M.N. ; SILVA, L.F.F. ; **BRANCO, A.C.C.C** ; Sato, M.N. ; AOKI, V. . Increased expression of IL-31RA and circulating CXCL8 and CCL2 in pemphigus herpetiformis suggests participation of the IL-31 family in the pathogenesis of the disease. JOURNAL OF THE EUROPEAN ACADEMY OF DERMATOLOGY AND VENEREOLOGY, v. 1, p. jdv.16730, 2020.

13. PEREIRA, NÁTALLI ZANETE ; **BRANCO, ANNA CLÁUDIA CALVIELLI CASTELO** ; MANFRERE, KELLY CRISTINA GOMES ; DE LIMA, JOSENILSON FEITOSA ; YOSHIKAWA, FABIO SEITI YAMADA ; MILANEZ, HELAINE MARIA BESTETI PIRES MAYER ; PEREIRA, NAIURA VIEIRA ; SOTTO, MIRIAM NACAGAMI ; DUARTE, ALBERTO JOSÉ DA SILVA ; SATO, MARIA NOTOMI . Increased Expression on Innate Immune Factors in Placentas From HIV-Infected Mothers Concurs With Dampened Systemic Immune Activation. Frontiers in Immunology, v. 11, p. 1, 2020.

14. TORREALBA, MARINA P. ; MANFRERE, KELLY C. G. ; YOSHIKAWA, FÁBIO S. Y. ; PEREIRA, NATALLI Z. ; **BRANCO, ANNA C. C. C.** ; TEIXEIRA,

FRANCIANE M. E. ; MIYASHIRO, DENIS R. ; MARTINS, JADE C. ; DUARTE, ALBERTO J. S. ; SANCHES, JOSÉ A. ; SATO, MARIA N. . IFN- γ reshapes monocyte responsiveness in Sezary syndrome. INTERNATIONAL JOURNAL OF DERMATOLOGY, v. 1, p. ijd.15251, 2020.

15. ALBERCA, RICARDO WESLEY ; ANDRADE, MILENA MARY DE SOUZA ; **BRANCO, ANNA CLÁUDIA CALVIELLI CASTELO** ; PIETROBON, ANNA JULIA ; PEREIRA, NÁTALLI ZANETE ; FERNANDES, IARA GRIGOLETTO ; OLIVEIRA, LUANA DE MENDONÇA ; TEIXEIRA, FRANCIANE MOURADIAN EMIDIO ; BESERRA, DANIELLE ROSA ; DE OLIVEIRA, EMILY ARAUJO ; GOZZI-SILVA, SARAH CRISTINA ; RAMOS, YASMIM ÁLEFE LEUZZI ; DE BRITO, CYRO ALVES ; ARNONE, MARCELO ; ORFALI, RAQUEL LEAO ; AOKI, VALERIA ; DUARTE, ALBERTO JOSE DA SILVA ; SATO, MARIA NOTOMI . Frequencies of CD33+CD11b+HLA-DR-CD14-CD66b+ and CD33+CD11b+HLA-DR-CD14+CD66b- Cells in Peripheral Blood as Severity Immune Biomarkers in COVID-19. FRONTIERS IN MEDICINE, v. 7, p. 1, 2020.

16. ALBERCA, RICARDO WESLEY ; YENDO, TATIANA MINA ; LEUZZI RAMOS, YASMIM ÁLEFE ; FERNANDES, IARA GRIGOLETTO ; OLIVEIRA, LUANA DE MENDONÇA ; TEIXEIRA, FRANCIANE MOURADIAN EMIDIO ; BESERRA, DANIELLE ROSA ; DE OLIVEIRA, EMILY ARAUJO ; GOZZI-SILVA, SARAH CRISTINA ; ANDRADE, MILENA MARY DE SOUZA ; **BRANCO, ANNA CLÁUDIA CALVIELLI CASTELO** ; PIETROBON, ANNA JULIA ; PEREIRA, NÁTALLI ZANETE ; DE BRITO, CYRO ALVES ; ORFALI, RAQUEL LEÃO ; AOKI, VALÉRIA ; DUARTE, ALBERTO JOSÉ DA SILVA ; BENARD, GIL ; SATO, MARIA NOTOMI . Case Report: COVID-19 and Chagas Disease in Two Coinfected Patients. AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, v. 1, p. 1, 2020.

17. YOSHIKAWA, FABIO SEITI YAMADA ; PIETROBON, ANNA JULIA ; **BRANCO, ANNA CLÁUDIA CALVIELLI CASTELO** ; PEREIRA, NÁTALLI ZANETE ; OLIVEIRA, LUANDA MARA DA SILVA ; MACHADO, CLARISSE MARTINS ; DUARTE, ALBERTO JOSÉ DA SILVA ; SATO, MARIA NOTOMI . Zika Virus Infects Newborn Monocytes Without Triggering a Substantial Cytokine Response. JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, v. 220, p. 23, 2019.