

**HUGO LEITE DE FARIAS BRITO**

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DO INFILTRADO  
INFLAMATÓRIO EM VILOSITE DE ETIOLOGIA  
DESCONHECIDA, VILOSITES CAUSADAS POR PARASITAS  
E INTERVILOSITE FÚNGICA. ESTUDO COMPARATIVO COM  
ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA.**

**CAMPINAS**

**2005**

**HUGO LEITE DE FARIAS BRITO**

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DO INFILTRADO  
INFLAMATÓRIO EM VILOSITE DE ETIOLOGIA  
DESCONHECIDA, VILOSITES CAUSADAS POR PARASITAS  
E INTERVILOSITE FÚNGICA. ESTUDO COMPARATIVO COM  
ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA.**

*Tese de Doutorado apresentada à  
Pós-Graduação da Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção  
do título de Doutor em Ciências  
Médicas, área de concentração em  
Anatomia Patológica.*

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Albina Messias de Almeida Milani Altemani

**CAMPINAS**

**2005**

## **DEDICATÓRIA**

*Ao meu filho Heitor, benção de Deus, razão maior dos meus sonhos;*

*À minha esposa Érika, companheira de todos os momentos, fonte inesgotável de força e amor;*

*Dedico este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Albina Messias de Almeida Milani Altemani pelo convite para participar deste projeto, pela confiança depositada em mim, pelo aprendizado em pesquisa mais uma vez vivenciado de forma exemplar e adquirido como marca indelével, pelo despertar do interesse em patologia placentária, pelo apreço e amizade sempre presentes.

À Priscila Bianchi Juliano pelo valioso auxílio na parte metodológica do trabalho, em particular na realização das reações imunoistoquímicas, que foi essencial no desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

À Maria do Carmo Machado da Silva, secretária da Sub-comissão de Pós-Graduação do Departamento de Anatomia Patológica da FCM - UNICAMP, pelo constante amparo e solicitude nos trâmites necessários para o cumprimento deste trabalho no prazo estabelecido e conforme as normas da instituição.

Ao Adilson Abílio Piazza, do setor de audiovisual do Departamento de Anatomia Patológica da FCM - UNICAMP, pela ajuda na documentação fotográfica dos casos estudados.

À Comissão de Pesquisa e Estatística da FCM - UNICAMP pela realização da estatística descritiva e dos gráficos descritivos de todas as variáveis analisadas.

Ao Prof. Dr. Luciano de Souza Queiroz pela revisão do resumo do trabalho em inglês (Abstract).

Ao Prof. Dr. Marcello Franco pela obtenção de parte das referências bibliográficas pertinentes à Paracoccidioidomicose.

Ao meu pai, José Correia de Farias Brito, pela avaliação crítica e sugestões e, sobretudo, pelo exemplo de médico e professor dedicado integralmente à causa universitária, que muito influenciou na decisão de complementar a minha formação acadêmica com a materialização deste trabalho.

À minha mãe Vetúria, pelo estímulo a busca de novos ideais e pelo carinho e alento nos momentos difíceis.

A todos os meus familiares pela colaboração permanente e irrestrita, que foi fundamental na elaboração do texto e na finalização do trabalho.

Aos amigos do Laboratório Salomão & Zoppi pelo contínuo apoio e incentivo.

# SUMÁRIO

**Resumo**

**Abstract**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Aspectos gerais.....	2
1.2. Vilosite por <i>Toxoplasma gondii</i> .....	6
1.3 Vilosite por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	8
1.4 Vilosite de etiologia desconhecida.....	11
1.5 Infecção placentária por <i>P. brasiliensis</i> .....	20
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
5.1 Aspectos gerais.....	53
5.2 Vilosite infecciosa.....	56
5.3 Intervilosite por <i>P. brasiliensis</i> .....	57
5.4 Origem do infiltrado inflamatório na vilosite.....	59
5.5 Vilosite de etiologia desconhecida.....	61
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1 –</b>	Achados histológicos nas placentas com vilosite por <i>T. cruzi</i> e <i>T. gondii</i> .....	43
<b>Tabela 2 –</b>	Achados histológicos nas placentas com VED.....	43
<b>Tabela 3 –</b>	Distribuição dos casos de vilosite chagásica e por <i>T gondii</i> conforme a porcentagem de células positivas para os anticorpos UCHL1, CD45RO/OPD4, CD8, NK, L26, HAM 56, MAC387, M1 e proteína S-100.....	44
<b>Tabela 4 –</b>	Distribuição dos casos de vilosite de etiologia desconhecida conforme a porcentagem de células positivas para os anticorpos UCHL1, CD45RO/OPD4, CD8, NK, L26, HAM 56, MAC387, M1 e proteína S-100.....	44
<b>Tabela 5 –</b>	Distribuição das percentagens médias de células positivas para os anticorpos UCHL 1, OPD4, CD8 e HAM 56 nos casos de vilosite por chagas, toxoplasmose e VED.....	45
<b>Tabela 6 –</b>	Estatística descritiva para o anticorpo UCHL 1.....	45
<b>Tabela 7 –</b>	Estatística descritiva para o anticorpo CD8.....	45
<b>Tabela 8 –</b>	Estatística descritiva para o anticorpo OPD4 .....	46
<b>Tabela 9 –</b>	Estatística descritiva para OPD4/CD8 .....	46
<b>Tabela 10 –</b>	Estatística descritiva para o anticorpo NK.....	46
<b>Tabela 11 –</b>	Estatística descritiva para o anticorpo L26.....	47
<b>Tabela 12 –</b>	Estatística descritiva para o anticorpo HAM 56.....	47
<b>Tabela 13 –</b>	Estatística descritiva para o anticorpo MAC 387.....	47
<b>Tabela 14 –</b>	Estatística descritiva para o anticorpo M1.....	48
<b>Tabela 15 –</b>	Distribuição das percentagens médias de células positivas para os anticorpos UCHL 1, OPD4, CD8, NK, L26, HAM 56, MAC 387 e M1 nos casos de vilosite por chagas, toxoplasmose e VED.....	48
<b>Tabela 16 –</b>	Distribuição das percentagens de células positivas para os anticorpos UCHL 1, CD4, CD8 , NK, L26, HAM 56, MAC 387 e M1 nos casos de intervilosite por <i>P. brasiliensis</i> .....	48

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> –	Vilosite de etiologia desconhecida (HE).....	37
<b>Figura 2</b> –	Vilosite por <i>T. cruzi</i> com parasitas no estroma vilositário (HE).....	37
<b>Figura 3</b> –	Vilosite por <i>T. gondii</i> (HE).....	38
<b>Figura 4</b> –	Intervilosite por <i>P. brasiliensis</i> (Grocott).....	38
<b>Figura 5</b> –	Anticorpo UCHL 1 (vilosite por <i>T. cruzi</i> ).....	39
<b>Figura 6</b> –	Anticorpo CD4 (vilosite de etiologia desconhecida).....	39
<b>Figura 7</b> –	Anticorpo CD8 (vilosite de etiologia desconhecida).....	40
<b>Figura 8</b> –	Anticorpo HAM56 (vilosite por <i>T. cruzi</i> ).....	40
<b>Figura 9</b> –	Anticorpo MAC 387 (vilosite de etiologia desconhecida).....	41
<b>Figura 10</b> –	Anticorpo MAC 387 (vilosite por <i>T. gondii</i> ).....	41
<b>Figura 11</b> –	Anticorpo para células NK (vilosite por <i>T. cruzi</i> ).....	42
<b>Figura 12</b> –	Anticorpo CD15 (intervilosite por <i>P. brasiliensis</i> ).....	42
<b>Figura 13</b> -	Gráfico descritivo para os anticorpos UCHL1, OPD4, CD8 e OPD4/CD8 nos casos de vilosite granulomatosa .....	49
<b>Figura 14</b> –	Gráfico descritivo para os anticorpos HAM 56 e MAC 387 nos casos de vilosite granulomatosa. ....	49
<b>Figura 15</b> -	Gráfico descritivo para os anticorpos NK e M1 nos casos de vilosite granulomatosa. ....	50
<b>Figura 16</b> -	Gráfico descritivo para os anticorpos UCHL1, OPD4, CD8 e OPD4/CD8 nos casos de vilosite não-granulomatosa .....	50
<b>Figura 17</b> –	Gráfico descritivo para os anticorpos HAM 56 e MAC 387 nos casos de vilosite não-granulomatosa.....	51
<b>Figura 18</b> -	Gráfico descritivo para os anticorpos NK e M1 nos casos de vilosite não-granulomatosa.....	51

## RESUMO

A inflamação da vilosidade placentária, ou vilosite, pode ser causada por diversos agentes infecciosos, porém na maioria dos casos a etiologia é desconhecida. As vilosites estão associadas a aborto, malformações fetais, prematuridade e retardo do crescimento intra-uterino, que é a principal manifestação clínica nos casos de etiologia desconhecida. Estes casos têm sido explicados como o resultado de uma reação imune materna contra o tecido placentário ou causados por algum agente infeccioso não identificado e sem manifestação clínica materno-fetal. Não é possível distinguir, ao exame histológico, a vilosite de etiologia desconhecida (VED) de uma vilosite infecciosa, se nesta última não for identificado microorganismos no tecido ou sinais histológicos de infecção, tais como inclusões virais. O aspecto histológico é semelhante em ambos os grupos e na maioria dos casos a reação inflamatória está constituída por linfócitos e histiócitos. A presença de padrões imunofenotípicos específicos nos diferentes tipos de vilosite poderia auxiliar tanto no diagnóstico como na compreensão da patogênese dessas lesões placentárias. Foi estudada a composição do infiltrado inflamatório em 23 placentas com vilosite (oito por *T. cruzi*, cinco por *T. gondii* e oito de etiologia desconhecida), duas placentas com intervilosite pelo *Paracoccidioides brasiliensis* e 8 placentas controles sem inflamação, através da técnica imunoistoquímica avidina-biotina-peroxidase em cortes histológicos de material fixado em formalina e incluído em parafina. Os anticorpos pesquisados foram: UCHL1 (CD45RO), L26 (CD20), CD45RO/OPD4 (CD4), CD8, NK-like, M1 (CD15), Mac 387, HAM 56 (CD68) e proteína S-100. Em todos os casos e nos diferentes tipos de vilosite estudados a reação inflamatória estava predominantemente constituída por linfócitos T do subtipo CD8+ e histiócitos HAM 56+. Também foram identificados, em menor quantidade, linfócitos T CD4+, macrófagos MAC 387+, granulócitos, células S-100 + e escassas células NK. Os linfócitos B estavam ausentes ou eram menos do que 2% das células inflamatórias em todos os casos. Nas placentas com intervilosite por *P. brasiliensis* o infiltrado era composto por macrófagos Mac 387 + e granulócitos M1+. O estudo da composição do infiltrado inflamatório, por imunoistoquímica, não permite diferenciar VED de vilosite infecciosa. A presença de um mesmo perfil de células inflamatórias em ambos os grupos (infeccioso e VED) favorece a hipótese de que a VED seja causada por algum agente infeccioso não identificado, possivelmente viral. Também é possível que diferentes agentes etiológicos causem inflamação vilositária através do mesmo mecanismo patogênico, o qual envolve uma reação imune celular mediada por linfócitos T CD8+ e histiócitos.

## ABSTRACT

Villitis is characterized by an inflammatory infiltrate within the villous stroma and can be caused by a large number of infectious agents, although most are of unknown etiology. Villitis, not rarely, is associated with intrauterine fetal death, abortion, malformations and fetal growth retardation. The latter has been the major clinical association of villitis of unknown etiology (VUE). Two hypotheses has been advocated to explain this lesion: a maternal immune attack against fetal tissue or an unidentified infection. Histology alone cannot distinguish VUE from an infectious villitis, unless microorganisms or viral inclusions are found in tissue. Both lesions are characterized by chronic inflammatory cells, mainly lymphocytes and macrophages, in the placental villous stroma. Granulomas and trophoblast damage, very typical of some infectious villitis, can also be a feature of VUE. Therefore, immunohistochemical phenotyping of the inflammatory cells could be of diagnostic value in villitis. There are few immunomorphological studies about the inflammatory cells in infectious villitis as well as in VUE. We studied the inflammatory cells by immunohistochemistry in 23 placentas with villitis (8 cases of *Trypanosoma cruzi* villitis, 5 cases of *Toxoplasma gondii* villitis and 8 cases of VUE). Two cases of *P. brasiliensis* intervillitis and 8 control placentas without inflammation were also analysed. Paraffin sections of all placentas were submitted for immunohistochemistry analysis according the avidin-biotin-peroxidase technique. Antibody panel consisted of UCHL1 (CD45RO), L26 (CD20), CD45RO/OPD4, CD8, NK-like, M1 (CD15), Mac387, HAM 56 (CD68) and S-100 protein. In all cases of villitis (infectious and of unknown etiology) the inflammatory infiltrate consisted mainly of HAM 56+ macrophages and T lymphocytes. Among T cells, CD8+ cells outnumbered CD4+ cells in all placentas. B lymphocytes were absent or very rare (<2%). A small number of Mac 387+ monocytes, NK cells and S-100+ cells were also detected. *Paracoccidioidomycosis* intervillitis consisted of Mac387+ histiocytes and M1+ granulocytes. Our findings showed that immunohistochemical study of the inflammatory cells cannot distinguish VUE from infectious villitis. The same cellular composition of the inflammatory infiltrate in the two studied groups (VUE and infectious villitis) favors the hypothesis that VUE could result from an infectious cause. In addition, this finding raises the possibility that different etiologic factors acts through a common pathway to cause villitis which is an inflammatory lesion mediated by CD8+ T lymphocytes and macrophages.

## ***1. INTRODUÇÃO***

---

---

## **1.1 Aspectos gerais**

A inflamação da placenta, embora extensivamente estudada há vários anos, é uma doença que ainda suscita grande interesse devido a importância clínica deste fenômeno, a diversidade de agentes causais envolvidos e a complexidade dos mecanismos patogênicos propostos.

A inflamação das membranas fetais (corioamnionite) e cordão umbilical (funisite) é a forma mais freqüente de placentite e resulta de infecção ascendente transcervical, usualmente de etiologia bacteriana, traduzida na histologia por reação inflamatória aguda supurativa (RUSSEL, 1995; FOX, 1997; GERSELL & KRAUS, 2000).

A presença de infiltrado inflamatório no estroma da vilosidade placentária caracteriza a vilosite, que é o padrão de inflamação observado nos casos de infecção placentária por via hematogênica (RUSSEL, 1995; FOX, 1997; GERSELL & KRAUS, 2000). Os vírus são considerados os agentes etiológicos mais freqüentes das vilosites infecciosas, que também podem ser causadas por bactérias, parasitas, protozoários e fungos (RUSSEL, 1995; FOX, 1997; GERSELL & KRAUS, 2000).

Entretanto, grande parte das vilosites é de etiologia desconhecida, pois não são evidenciados microorganismos na placenta e não há sinais maternos de infecção (ALTSHULER & RUSSEL, 1975; KNOX & FOX, 1984; RUSSEL, 1995; GERSELL & KRAUS, 2000). Nestes casos tem sido proposto que a vilosite poderia ser causada por um agente não detectado por métodos

---

diagnósticos usuais ou resultar da agressão imunológica materna contra os tecidos placentários (LABARRERE, ALTHABE, TELENTA, 1982; LABARRERE et al, 1986; LABARRERE, McINTYRE, FAULK, 1990; FOX, 1997).

Clinicamente, as vilosites podem estar associadas a aborto, natimorto, baixo peso ao nascimento, prematuridade e infecções sistêmicas no recém-nascido com conseqüências graves tais como retardo mental, cegueira, surdez e inúmeras malformações congênitas. Segundo Russel (1995), uma vez que todo tecido coriônico é fetal, a presença de vilosite focal ou difusa pode ser considerada como uma evidência de possível infecção no feto ou recém-nascido, independente da detecção de algum microorganismo por meio de cultura.

Alguns casos podem ser assintomáticos e a morbi-mortalidade, nos casos infecciosos, parece depender do microorganismo, da intensidade da infecção e do estágio da gravidez em que esta ocorreu (FOX, 1997; GERSELL & KRAUS, 2000).

A relação da intensidade da vilosite com a gravidade da infecção é nítida em algumas vilosites de etiologia conhecida, tal como na causada pelo *Trypanosoma cruzi*, onde a vilosite é intensa, granulomatosa e rica em parasitas nos natimortos, porém, mais leve, não granulomatosa e os parasitas raros nos nativos (BITTENCOURT, 1988; ALTEMANI, BITTENCOURT, LANA, 2000). Entretanto, em outras vilosites de causa infecciosa, a intensidade do comprometimento fetal parece estar mais relacionada ao efeito direto da infecção no feto ou na mãe do que com a intensidade da lesão placentária (FOX, 1997).

---

A presença de vilosite crônica difusa pode representar um fator de risco para o desenvolvimento de lesão cerebral no recém-nascido. Redline & O'riordan (2000), relatam uma maior frequência de vilosite crônica difusa, além de outras lesões, em placentas a termo de recém-nascidos com déficit neurológico grave ou paralisia cerebral, sem evidências de infecção ou malformações congênitas.

A frequência de vilosite varia, em diferentes países, de 6 a 68% das placentas estudadas (ALTSHULER & RUSSEL, 1975; RUSSEL, 1980; LABARRERE et al, 1982). No Brasil, Altemani et al (1982) relatam uma frequência de 24% em 132 placentas selecionadas ao acaso de uma população que incluiu recém-nascidos de peso normal, recém-nascidos de baixo peso e natimortos. Redline & Abramowsky (1985), salientam que esta diferença na incidência de vilosite depende de três fatores: quantidade de material submetido a estudo histológico, critérios utilizados para o diagnóstico de vilosite e o tipo de população de onde foram obtidas as placentas. Altemani, Gonzatti & Metzger (2003), demonstraram que o processamento de pelo menos 6 blocos de parafina por placenta examinada proporciona uma probabilidade de 85% para detectar 95% de todos os casos de vilosite. Assim, o estudo de 6 blocos de tecido placentário seria suficiente para identificar a maioria dos casos de vilosite.

A presença de reação inflamatória intrínseca ao parênquima vilositário é a expressão histopatológica da vilosite, que pode ser subdividida de acordo com a natureza deste infiltrado (aguda ou crônica), a distribuição das lesões (focal, difusa, basal) e o grau de acometimento (leve, moderado, intenso)

---

(RUSSEL, 1995; GERSELL & KRAUS, 2000). A classificação proposta por Altshuler & Russel (1975), está fundamentada na evolução da vilosite desde um estágio inicial inflamatório até um estágio final fibrótico. De acordo com estes autores, a vilosite pode ser classificada em:

- Vilosite proliferativa: presença de infiltrado inflamatório crônico no estroma viloso, sem necrose. Os infiltrados predominantemente histiocíticos podem constituir uma variante granulomatosa.
- Vilosite necrosante: além do infiltrado inflamatório há necrose vilosa. Quando presente no contexto de uma vilosite proliferativa é considerada o estágio agudo desta lesão.
- Vilosite reparativa: presença de tecido de granulação e fibrose, indicando que o processo inflamatório está numa fase reparativa.
- Fibrose estromal: as vilosidades são fibróticas, com pouca ou nenhuma evidência de processo inflamatório ativo.

Entretanto, como salientado por Fox (1997), esta subdivisão é artificial e dependente da intensidade e do estágio em que o processo inflamatório encontra-se no momento do parto. Comumente observam-se diversas matizes de inflamação e reparo em uma mesma placenta (FOX, 1997; GERSELL & KRAUS, 2000).

Na maioria dos casos a vilosite é um processo focal e o infiltrado inflamatório está constituído por linfócitos e histiócitos (ALTEMANI, 1992). Algumas particularidades podem ser descritas: na vilosite por bactérias piogênicas ou *Listeria monocytogenes* o infiltrado é purulento, na Sífilis é comum

---

a riqueza em plasmócitos, nas vilosites parasitárias por *Trypanosoma cruzi* ou *Toxoplasma gondii* pode haver reação inflamatória granulomatosa e na infecção por *Citomegalovirus* (CMV) podemos observar desde uma vilosite aguda necrosante, com inclusões virais características, até fibrose estromal completa (BITTENCOURT, 1988; ALTEMANI, 1992; FOX, 1997; ALTEMANI et al, 2000).

Além do infiltrado inflamatório, outras alterações podem ser encontradas associadas a vilosite, tais como: edema e imaturidade vilosa, vasculite com necrose endotelial em vasos vilositários, vilosidades avasculares devido a trombose oclusiva de artérias fetais com vasculite, trombos intervilosos provavelmente secundários a rotura de vasos vilositários fetais, infiltrado inflamatório crônico na decídua da placa basal e necrose do trofoblasto (RUSSEL, 1980; KNOX & FOX, 1984; FOX, 1997).

## **1.2 Vilosite por *Toxoplasma gondii***

A vilosite por *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) foi observada em 3% das placentas examinadas por Altemani et al (1982) e correspondeu a 12,5% dos casos de vilosite, sendo a segunda em freqüência, superada apenas pelas vilosites de causa desconhecida, neste estudo. O risco e a gravidade da infecção fetal estão relacionados ao período gestacional em que ocorreu a infecção materna aguda. Quando adquirida nos primeiros trimestres da gestação pode ocasionar, no feto, lesões graves no sistema nervoso central, coriorretinite e cegueira (VIGGIANO & XIMENES, 1986; RUSSEL, 1995; GERSELL & KRAUS, 2000).

---

As placentas infectadas por *T. gondii* podem ser de aspecto macroscópico normal ou volumosas, pálidas e edematosas, imitando o padrão observado na sífilis congênita e eritroblastose fetal (VIGGIANO & XIMENES, 1986; RUSSEL, 1995).

O exame histológico pode acentuar ainda mais a semelhança com os casos de eritroblastose fetal devido a presença, na toxoplasmose, de imaturidade vilositária, vilosidades hidrópicas e eritrócitos nucleados em vasos vilositários. O processo inflamatório caracteriza-se geralmente por uma vilosite focal, com predomínio de linfócitos e histiócitos. É possível observar também necrose vilositária, deciduíte linfocítica crônica nas membranas fetais e placa basal, além de funisite. Os parasitas usualmente são identificados nas formas encistadas, localizados no tecido conjuntivo do âmnio e cório. Podem ser vistos também no estroma viloso, células trofoblásticas, decídua e, raramente, cordão umbilical. Descreve-se como típica a ausência de resposta inflamatória aos parasitas encistados nas membranas fetais (VIGGIANO & XIMENES, 1986; RUSSEL, 1995; GERSELL & KRAUS, 2000).

A vilosite por *T. gondii*, em alguns casos, pode ser difusa e granulomatosa, com granulomas constituídos por células epitelióides, células gigantes multinucleadas e quantidade variável de pseudocistos parasitários (ALTEMANI et al, 1982). Nos casos estudados por Altemani et al (1982), o processo inflamatório mais intenso estava associado a natimortalidade e os parasitas localizavam-se predominantemente nas vilosidades.

---

### 1.3 Vilosite por *Trypanosoma cruzi*

A transmissão congênita da doença de Chagas com infecção placentária pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) está bem documentada como um importante fator de morbidade materno-fetal desde os estudos realizados por Lisbôa (1960) e Bittencourt (1963) que demonstraram o encontro simultâneo de parasitas na placenta e órgãos fetais.

A freqüência da doença de Chagas congênita é variável em diferentes regiões do Brasil. Altemani et al (1982) descrevem um caso de placentite chagásica em 132 placentas examinadas na Faculdade de Ciência Médicas da UNICAMP, em Campinas (São Paulo), ou seja, freqüência de 0,75%. Bittencourt (1963) relata a forma congênita desta doença com freqüência de 1,29% na maternidade Climério de Oliveira e 2,7% na maternidade Tsylla Balbino, ambas localizadas em Salvador (Bahia). Esta autora estima a incidência anual de um caso de doença de Chagas congênita para cada 1000 nascimentos ocorridos no estado da Bahia (BITTENCOURT, 1992), o que configura esta doença como um problema de saúde pública também no âmbito obstétrico e perinatal.

Os seguintes fatores parecem aumentar o risco de transmissão da doença ao feto: gestante jovem, doença em fase aguda, doença crônica com exacerbação da parasitemia e história prévia de aborto ou concepto infectado. A freqüência de infecção placentária é maior entre 22 e 26 semanas de gestação (BITTENCOURT, 1992).

---

A infecção congênita pelo *T.cruzi* pode causar crescimento intra-uterino retardado, prematuridade, natimortos e abortos, estes últimos freqüentemente com avançado estado de maceração, dificultando o encontro dos parasitas e o diagnóstico da doença. São descritas várias alterações patológicas no feto e recém-nascido: meningoencefalite, miocardite, miosite, pneumonite e inflamação do trato digestivo e da pele. A presença de megaesôfago e megacólon, lesões características da fase crônica da doença, também podem ser observadas precocemente na forma congênita. Alguns casos são assintomáticos e a criança infectada pode permanecer sem manifestações clínicas da doença (BITTENCOURT & BARBOSA, 1972; BITTENCOURT, 1976; BITTENCOURT, 1992).

O *T. cruzi* atinge a placenta em sua forma flagelada (tripomastigota) que tem a capacidade de infectar e transpor o epitélio trofoblástico, alcançando o estroma vilositário. Neste, os parasitas assumem a forma amastigota e são fagocitados por células de Hofbauer onde se multiplicam e formam ninhos ou pseudo-cistos. A ruptura destes ninhos suscita uma reação inflamatória e libera formas tripomastigotas que podem infectar outras células vilositárias ou cair na circulação fetal causando infecção congênita (ALTEMANI et al, 2000). Depreende-se, portanto, deste ciclo parasitário, que a presença de vilosite e infecção fetal por *T. cruzi* são eventos patológicos estreitamente relacionados. Bittencourt & Barbosa (1972) ao estudarem 215 fetos macerados detectaram infecção por *T. cruzi* em 11 casos e todos apresentavam placentite chagásica concomitante.

---

O exame macroscópico de placentas chagásicas demonstra cotilédones volumosos e esbranquiçados, com superfície de corte pálida e consistência friável, semelhante ao observado na sífilis (BITTENCOURT, 1963).

O exame histopatológico pode revelar uma vilosite focal e esparsa ou difusa, com comprometimento de todas as vilosidades e troncos vilositários. As vilosidades exibem edema, proliferação de células de Hofbauer, infiltração linfocitária e focos de necrose, por vezes com destacamento do epitélio trofoblástico. Nos pontos de necrose do trofoblasto os vilos podem ser circundados por fibrina e infiltrado inflamatório linfomononuclear. Nota-se também reação inflamatória granulomatosa, com células epitelióides e células gigantes multinucleadas no espaço interviloso, ao redor de vilosidades lesadas. Outras alterações descritas são infiltração linfocitária na parede de vasos dos troncos vilositários e trombose vascular (BITTENCOURT, 1963; BITTENCOURT, 1976; VIGGIANO & XIMENES, 1986).

Os parasitas podem ser vistos no interior de histiócitos, livres ou agrupados em ninhos no estroma vilositário, troncos vilosos, membranas extra-placentárias, cordão umbilical e decídua. Nos raros casos em que o parasita foi identificado apenas no epitélio trofoblástico, não houve transmissão da infecção ao feto. Admite-se que o epitélio trofoblástico tem capacidade fagocítica, funcionando como uma barreira protetora do feto contra agentes infecciosos (VIGGIANO & XIMENES, 1986; BITTENCOURT, 1992).

A intensidade do parasitismo e da reação inflamatória na placenta parece ter relação com a gravidade do comprometimento fetal. Altemani et al (2000)

---

estudaram oito placentas com vilosite chagásica, sendo quatro de natimortos e quatro de crianças nascidas vivas. No grupo dos natimortos a vilosite era difusa e intensa, com freqüente necrose do trofoblasto, numerosos parasitas e reação granulomatosa intervilosa. No grupo dos nascidos vivos, ao contrário, a vilosite era focal, com escassos parasitas e necrose do trofoblasto rara ou ausente.

Neste mesmo estudo, Altemani et al (2000) também caracterizaram o infiltrado inflamatório vilositário por meio da técnica da imunohistoquímica. Em todos os casos de vilosite chagásica analisados, o infiltrado estava constituído predominantemente por macrófagos positivos para o CD68, linfócitos T e escassas células NK. Os linfócitos B eram muito raros ou ausentes. Os linfócitos T do subtipo CD8 eram mais freqüentes do que o subtipo CD4. Ao contrário de outros órgãos, na placenta, os macrófagos CD68 + eram mais numerosos do que os linfócitos T na reação inflamatória ao *T. cruzi*.

#### **1.4 Vilosite de etiologia desconhecida (VED)**

A caracterização deste tipo de vilosite depende, como está evidente no próprio nome que a define, da exclusão de qualquer agente etiológico identificado no tecido placentário, assim como ausência de sinais de infecção materna e fetal.

A freqüência de VED varia de 6 a até 68% das placentas examinadas em vários trabalhos de diferentes países (ALTSHULER & RUSSEL, 1975; RUSSEL, 1980; ALTEMANI, 1982; LABARRERE et al, 1982). As possíveis razões para esta

---

variação nas freqüências de VED são as mesmas já previamente comentadas e referidas por Redline & Abramowsky (1985) e Altemani et al (2003). Em que pese uma nítida discrepância nas freqüências observadas, parece consenso o fato da VED ser o tipo mais freqüente de vilosite (ALTSHULER & RUSSEL, 1975; RUSSEL, 1980; ALTEMANI, 1982; LABARRERE et al, 1982; RUSSEL, 1995).

Altshuler & Russel (1975), no clássico estudo de revisão sobre vilosites, descrevem 63 casos de VED. A vilosite era focal em 45 casos, difusa em 12 casos e predominantemente basal em 6 casos (vilosite linfoplasmacítica basal). Os casos focais exibiam uma reação inflamatória linfocitária, com distribuição aleatória na trama vilositária e indistinguível da vilosite causada pela rubéola. São descritos também lesão do trofoblasto com deposição de fibrina, áreas de necrose tecidual e alterações vasculares nos vasos fetais, tais como endovasculite e trombose. Os autores relatam uma significativa associação deste tipo de vilosite com retardo do crescimento intra-uterino, manifestado clinicamente pelo encontro de crianças pequenas para a idade gestacional em 38% dos casos. Entretanto, não houve correlação entre a intensidade da VED e a presença de alteração neonatal.

Russel (1980), sedimenta os conceitos de VED ao descrever os aspectos clínicos e morfológicos de 575 casos desta lesão que foram detectados a partir de uma amostra de 7505 placentas. Na maioria dos casos o aspecto macroscópico das placentas não diferia do normal e ao exame microscópico o processo inflamatório era leve e focal, distribuído ao acaso no parênquima placentário. Alguns casos exibiam uma distribuição preferencialmente basal ou

---

parabasal, como descrito previamente por Altshuler & Russel (1975). O infiltrado inflamatório, na casuística de Russel (1980), embora predominantemente linfocitário, estava constituído também por plasmócitos, neutrófilos e células gigantes multinucleadas. O processo inflamatório podia ser restrito ao vilos, porém o mais comum era afetar vilos contíguos, com rotura do trofoblasto e deposição de fibrina entre os mesmos. Foram vistos ainda trombos intervilosos e vasculite em troncos vilosos com obliteração vascular levando à formação de vilos acelulares e hialinos.

A VED, nos casos descritos por Russel (1980), além de estar associada com o retardo do crescimento intra-uterino, mostrava correlação positiva com a intensidade das lesões, ou seja, quanto mais grave a vilosite, maior o grau de comprometimento fetal.

No Brasil, Altemani et al (1982) descrevem uma freqüência de 18,9% de VED em 132 placentas examinadas, correspondendo a 78,2% dos casos de vilosite no grupo estudado. Posteriormente Altemani, Fassoni, Marba (1989), relatam uma freqüência de 41,8% de VED em 86 placentas examinadas. Altemani et al (2003) detectaram 13 casos de VED em 47 placentas que foram estudadas de forma prospectiva, ou seja, uma frequência de 19,4% de VED nos casos analisados.

Em relação ao primeiro trabalho (ALTEMANI et al, 1982), na maior parte dos casos a vilosite era focal e estava caracterizada por reação inflamatória crônica inespecífica, podendo exibir também inflamação aguda supurativa e reação granulomatosa. Outras alterações morfológicas associadas

---

foram deciduíte linfoplasmocitária e trombose da artéria fetal. O recém-nascido de baixo peso foi a alteração neonatal mais freqüentemente observada.

Assim como relatado por Russel (1980), a freqüência de recém-nascido de baixo peso estava diretamente relacionada com a intensidade do processo inflamatório, sendo observada em 8,3% das vilosites leves, 14,2 % das moderadas e 80% das intensas. Entretanto, como salientam os autores, a presença de hipertensão moderada ou grave e pré-eclâmpsia em 57% dos casos de VED estudados também poderia contribuir para a alta freqüência de recém-nascido de baixo peso observada neste grupo. Outra alteração materna observada foi a presença de aborto recorrente em 16% dos casos estudados.

A VED pode recorrer em novas gestações, freqüentemente reproduzindo o mesmo padrão de comprometimento inflamatório nas placentas subseqüentes (REDLINE & ABRAMOWSKY, 1985; RUSSEL, 1995).

Redline & Abramowsky (1985), notaram dois grupos distintos nos dez casos de VED recorrentes estudados. Em seis casos a vilosite era focal, freqüentemente basal, com plasmócitos na decídua. As pacientes eram de baixo nível sócio-econômico, com história de doença sexualmente transmissível. Nos quatro casos restantes a vilosite era difusa, com proeminente deposição de fibrina intervilosa, sem plasmócitos na decídua. As pacientes eram de alto nível sócio-econômico, mostravam tendência a obesidade e história de abortos prévios.

A causa e patogênese da VED é um assunto ainda não esclarecido, sendo aventadas duas hipóteses principais para explicar este fenômeno: a hipótese infecciosa e a hipótese imunológica (BENIRSCHKE & KAUFMAN, 1995).

---

Na primeira hipótese, a VED seria uma resposta inflamatória fetal contra algum agente infeccioso não detectado, possivelmente de natureza viral. Os autores que defendem esta idéia argumentam que o aspecto morfológico de certas vilosites virais, tal como a causada pela rubéola, assemelha-se ao observado na VED. O retardo no crescimento intra-uterino e outros efeitos da VED no concepto também poderiam ser explicados como decorrentes de uma ação viral (ALTSHULER & RUSSEL, 1975; RUSSEL, 1980; BENIRSCHKE & KAUFMAN, 1995; BENIRSCHKE et al, 1999).

Segundo Russel (1980), a distribuição de focos inflamatórios nos vilos basais e a associação com deciduíte, indicaria que a VED pode ser o resultado da disseminação de uma infecção endometrial ao parênquima placentário. O mesmo autor sugere que a VED, por sua variabilidade morfológica, deve ser a resposta a mais de um organismo ou estímulo antigênico.

Benirschke et al (1999), recomendam a busca sistemática e persistente de algum agente infeccioso em todos os casos de vilosite. Segundo estes autores, uma avaliação histológica minuciosa, associada ao uso de técnicas de biologia molecular e estudos sorológicos maternos eficazes, podem revelar algum microorganismo insuspeito nos casos de vilosite sem causa aparente.

A hipótese imunológica explica a VED como o resultado de uma agressão imune materna contra antígenos fetais, ou seja, um tipo de reação enxerto versus hospedeiro (LABARRERE et al, 1982, 1990; REDLINE & PATTERSON, 1993; ALTEMANI, 1992).

---

Esta hipótese foi inicialmente construída a partir dos seguintes fatos:

a) vários casos de VED associam-se com auto-imunidade materna; b) existe uma tendência a recorrência das lesões e associação com abortos recorrentes; c) não é possível, mesmo com o uso de diferentes técnicas, demonstrar agentes infecciosos ou sinais de infecção fetal e materna na maioria dos casos de vilosite. Os fetos, nos casos de VED, geralmente apresentam baixo nível de IgM no sangue do cordão umbilical (REDLINE & ABRAMOWSKY, 1985; ALTEMANI et al, 1989; REDLINE & PATTERSON, 1993).

O advento das técnicas de imunoistoquímica e biologia molecular possibilitou um maior conhecimento da natureza do infiltrado inflamatório na VED, reforçando a hipótese de uma patogênese imunológica com conceitos de biologia celular.

Labarrere et al (1990) estudaram as células inflamatórias, componentes da coagulação e marcadores endoteliais em 25 placentas com VED de gestações normais por meio de técnica imunoistoquímica em material a fresco e congelado. Estes autores demonstraram que o infiltrado na VED era constituído predominantemente por macrófagos com expressão de antígenos de histocompatibilidade (HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ) e linfócitos T auxiliares (CD4 positivos). Havia deposição de fator IX da coagulação e fibrina na membrana basal trofoblástica e perivascular, com perda de marcadores endoteliais em vasos fetais e aumento de plaquetas. Baseados nestes achados, Labarrere et al (1990), sugerem que linfócitos T auxiliares (Th1) ativam macrófagos que, por sua vez, ativam fatores da coagulação e alteram o endotélio vascular. Tais

---

eventos imunológicos resultam na alteração morfológica descrita como vilosite. Entretanto, o fator que inicia este mecanismo não é conhecido. A presença de histiócitos ativados (HLA +) nos focos de vilosite poderia representar tanto uma resposta a infecção ou uma reação imune alogênica. Outra possibilidade é que assumem apenas o papel de fagócitos e que foram atraídos ao local devido a necrose tecidual secundária ao dano endotelial.

Altemani (1992) alcançou resultados semelhantes a Labarrere et al (1990) ao estudar o infiltrado inflamatório em 17 placentas com VED por técnica de imunistoquímica em material fixado e embocado em parafina. Nos casos estudados por este autor havia um predomínio de macrófagos e linfócitos T nos focos de vilosite, com ausência de linfócitos B. A expressão de antígenos HLA-DR foi observada em 75% dos casos nas áreas de inflamação, em células com morfologia de macrófagos, linfócitos e monócitos. Os vilos com necrose completa do trofoblasto estavam circundados por fibrina, linfócitos T e monócitos. Em relação a este achado é digno de nota o fato da placenta ser um órgão fetal contendo antígenos HLA paternos e maternos. Contudo, o trofoblasto que reveste as vilosidades e está em contato direto com a circulação materna não expressa antígenos HLA clássicos dos tipos I e II, o que supostamente impede o seu reconhecimento por células imunes maternas. Segundo Altemani (1992), a destruição da membrana basal trofoblástica permitiria a exposição de células do estroma fetal, que expressam antígenos de histocompatibilidade, a circulação materna. Assim, linfócitos e histiócitos maternos imunocompetentes seriam atraídos a estes sítios de rotura do trofoblasto e as áreas de vilosite conteriam

---

tanto células fetais como maternas. Na opinião da autora, independente do mecanismo causativo da VED ser infeccioso ou não, desde que ocorra necrose do trofoblasto e lesão da membrana basal trofoblástica, uma reação imune pode advir e amplificar o processo inflamatório inicial. O mesmo raciocínio aplica-se aos casos de vilosite de etiologia infecciosa. Na vilosite chagásica, por exemplo, uma reação imune materna contra antígenos fetais e parasitários também poderia ocorrer nas áreas de necrose do trofoblasto e agravar a reação inflamatória vilositária inicial.

Redline & Patterson (1993) utilizando técnicas de hibridização cromossômica para e imunoistoquímica demonstraram de forma convincente que 50 a 75% do infiltrado inflamatório na VED estava constituído por células de origem materna, sendo em sua maioria linfócitos T. Contrapunha-se, portanto à idéia, quase axiomática até aquele momento, de que o infiltrado inflamatório, por situar-se no vilo, era exclusivamente fetal. Os autores propõem o seguinte modelo patogênico: alterações na barreira trofoblástica devido a fatores como necrose isquêmica ou expressão anômala de moléculas de adesão permitiriam a infiltração de células T maternas no estroma vilositário. O encontro dos linfócitos T maternos com antígenos fetais paternos transplantados induziria o fechamento das artérias fetais e o recrutamento de linfócitos fetais para ataque às células maternas. Dependendo da força e consistência desta interação imune ocorrerá a lesão reconhecida como VED.

Nakamura et al (1994) analisaram, por imunoistoquímica, o infiltrado inflamatório em seis placentas com vilosite crônica difusa sem etiologia

---

determinada. Os autores, tal como Labarrere et al (1990), também usaram cortes congelados de tecido sem fixador. O infiltrado inflamatório estava caracterizado por linfócitos T do subtipo CD4+. Em dois desses casos houve amplificação gênica do antígeno tardio do Citomegalovirus (CMV) pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Os autores acreditam que os linfócitos T CD4+ seriam capazes de ativar os macrófagos fetais e induzir uma reação imune contra o tecido vilositário, o que poderia resultar no retardo do crescimento intra-uterino característico da VED. Mais ainda, a infecção pelo CMV poderia atuar como um fator responsável pelo início dessa reação imune.

Kapur et al (2004) estudaram, por imunoistoquímica, o infiltrado inflamatório em casos de vilosite sífilítica e VED. Em ambos os grupos a reação inflamatória estava constituída predominantemente por linfócitos T, com predomínio do subtipo CD8 em relação ao subtipo CD4. Os linfócitos B eram raros. Os autores também verificaram, através da técnica de hibridização "*in situ*" fluorescente (FISH) para cromossomos sexuais, que a população de células inflamatórias intravilositária era predominantemente de origem materna nos dois grupos estudados. Os autores, perante tais resultados, levantam a possibilidade de que tanto a VED como a vilosite por sífilis possuem uma via imunopatogênica semelhante.

---

### 1.5 Infecção placentária por *Paracoccidioides brasiliensis*

Apesar da *Paracoccidioidomicose* ser uma doença endêmica em várias regiões do Brasil e América Latina, a infecção placentária por *P. brasiliensis* é um evento raro, com poucos casos descritos na literatura (MARQUES et al, 1983; BRAGA, KASTING, FRANKE, 1989; BLOTTA et al, 1993).

O *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico, que tem o solo como habitat natural e propaga-se ao homem por inalação. A infecção, portanto, tem localização inicial nos pulmões com disseminação sistêmica secundária por via sanguínea ou linfática. A enfermidade caracteriza-se por duas formas clínicas: a forma aguda ou subaguda (tipo juvenil) e a forma crônica (tipo adulto). A forma aguda ou juvenil afeta ambos os sexos com a mesma freqüência e compromete predominantemente o sistema retículoendotelial (linfonodos, fígado, baço e medula óssea). A forma crônica tem evolução insidiosa e comprometimento pulmonar, mucocutâneo, linfático e pulmonar ou mucocutâneo e pulmonar (FRANCO et al, 1989).

A forma crônica é muito mais freqüente em pacientes do sexo masculino, com uma taxa de 10,7 homens para cada mulher afetada pela doença (MARQUES et al, 1983). Estudos “*in vitro*” demonstraram que o *P. brasiliensis* apresenta receptores para hormônios esteróides e os estrógenos inibem a transformação da forma de micélio em levedura, um passo essencial no mecanismo de infecção (BLOTTA et al, 1993; CARVALHO & MONTENEGRO, 1999).

---

Nos poucos casos de *Paracoccidioidomicose* placentária estudados, os fungos foram identificados apenas no espaço interviloso, circundados por uma reação inflamatória histiocítica com células gigantes multinucleadas, neutrófilos e fibrina. Não havia sinais de vilosite ou células fúngicas no interior das vilosidades (BRAGA et al, 1989; BLOTTA et al, 1993).

A reação granulomatosa ao *P. brasiliensis*, de acordo com Blotta et al (1993), está constituída por macrófagos com ação exclusivamente fagocítica (positivos para o anticorpo MAC 387), sem evidências de histiócitos apresentadores de antígenos que são positivos para a proteína S-100. Outra alteração histológica observada é o espessamento da membrana basal trofoblástica, devido a deposição de colágeno IV e laminina, nas áreas de necrose sincicial. Admite-se que o espessamento da membrana basal atua como uma barreira e impede a penetração do fungo no estroma vilositário e subsequente infecção do feto.

Na infecção placentária por *P. brasiliensis*, de forma semelhante ao observado na coccidioidomicose, mesmo nos casos graves que evoluem com o óbito da gestante, não ocorre a transmissão da doença ao feto (McCAFFREE, ALTSHULER, BENIRSCHKE, 1978; BRAGA et al, 1989; BLOTTA et al, 1993). Entretanto, como sugerem Blotta et al (1993), a reação inflamatória deve afetar a relação materno-fetal ou o metabolismo fetal, causando retardo no desenvolvimento intra-uterino e prematuridade.

---

## ***2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO TRABALHO***

---

---

Os estudos que investigam a natureza do infiltrado inflamatório nas vilosites são raros, apesar da freqüência e importância clínica destas lesões. Estes trabalhos abordam principalmente a VED, a vilosite chagásica, a vilosite sífilítica e a vilosite pelo *Citomegalovirus* (LABARRERE et al, 1990; ALTEMANI, 1992; NAKAMURA et al, 1994; ALTEMANI et al, 2000, KAPUR et al, 2004).

Embora em alguns casos seja possível o diagnóstico preciso ou ao menos presuntivo de algum tipo específico de vilosite ao exame histológico (inclusões virais características na infecção pelo CMV, infiltrado rico em plasmócitos na sífilis, etc.), na maioria das vezes as características morfológicas são semelhantes nas diversas causas de inflamação vilositária.

O aspecto histológico da VED, por exemplo, é inespecífico e o diagnóstico desta lesão depende da exclusão de agentes infecciosos no tecido placentário e da ausência de sinais clínicos e sorológicos de infecção materno-fetal.

Desta forma, a presença de padrões imunofenotípicos do infiltrado inflamatório vilositário específicos para cada tipo de vilosite poderia auxiliar no diagnóstico dessas lesões.

A placentite por *Paracoccidioides brasiliensis*, por sua vez, oferece um modelo de estudo interessante, pois apesar do agente causar necrose do trofoblasto e reação histiocitária intervilosa, não há passagem do fungo para o estroma viloso ou para o feto (BLOTTA et al, 1993). Difere, portanto, dos agentes infecciosos parasitários que são identificados no estroma viloso, provocam vilosite com necrose do trofoblasto e causam infecção fetal.

---

Os objetivos do presente trabalho são:

- Realizar uma análise qualitativa e quantitativa do infiltrado inflamatório, com subtipagem dos linfócitos presentes, em vilosites de etiologia infecciosa e vilosites de etiologia desconhecida, utilizando-se anticorpos monoclonais e a técnica da imunistoquímica em seções de parafina.
- Realizar uma análise qualitativa e quantitativa do infiltrado inflamatório em casos de infecção placentária por *P. brasiliensis*, onde o agente etiológico não atravessou a barreira trofoblástica, utilizando-se da mesma técnica acima descrita.
- Verificar se o exame imunistoquímico do infiltrado inflamatório permite distinguir os diferentes tipos de vilosite, em especial diferenciar a VED de vilosites infecciosas.

Este estudo comparativo tem ainda como objetivo, tentar aumentar o conhecimento sobre a patogênese da vilosite placentária.

---

### ***3. MATERIAL E MÉTODOS***

---

---

Foram estudadas 23 placentas, com o diagnóstico de vilosite ou intervilosite e oito placentas controles sem alterações inflamatórias. O grupo de placentas com inflamação estava constituído por oito casos de vilosite por *T. cruzi*, cinco casos de vilosite por *T. gondii*, oito casos de VED e dois casos de intervilosite por *P. brasiliensis*. O grupo controle estava constituído por 8 placentas sem sinais de inflamação. Todos os casos foram selecionados de forma retrospectiva a partir dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da UNICAMP. Os dados referentes às placentas com vilosite chagásica foram utilizados em estudo anterior (ALTEMANI et al, 2000).

Os dados clínicos foram obtidos a partir de consulta aos prontuários das mães e recém-nascidos. Todas as placentas com VED e as placentas do grupo controle são de nativos sem evidências clínicas ou sorológicas de infecção materna ou do recém-nascido. As provas sorológicas maternas incluíram todos os agentes infecciosos usualmente pesquisados na rotina do acompanhamento médico pré-natal (grupo TORCH, sífilis, HIV e vírus da hepatite B).

As placentas foram fixadas em formalina a 10% e os fragmentos incluídos em parafina e corados por hematoxilina-eosina (HE). Nas placentas com VED e no grupo controle foram analisados 6 fragmentos coletados ao acaso das regiões paracentrais e todos incluíam a superfície fetal e materna. Vilosite foi diagnosticada no exame histológico, nas secções coradas por hematoxilina-eosina e caracterizada pela presença de infiltrado leucocitário no estroma da vilosidade corial.

---

Em todos os casos com vilosite de etiologia infecciosa (*T. cruzi*, *T. gondii*) os parasitas foram identificados nos cortes histológicos corados por HE e também por técnica de imunoistoquímica com anticorpos específicos. A quantidade de parasitas foi graduada em pequena (+), moderada (++) e intensa (+++).

Em todos os casos com vilosite, a intensidade da reação inflamatória, foi graduada em leve, moderada e intensa conforme a quantidade de vilosidades acometidas:

- **Leve:** um foco de inflamação vilosa por campo de menor aumento (4X); não mais do que três campos estavam afetados em toda a preparação e poucas vilosidades estavam envolvidas em cada foco de inflamação.
- **Moderada:** mais de um foco de inflamação vilosa por campo de menor aumento (4X).
- **Intensa:** a maioria das vilosidades estavam afetadas por campo de menor aumento (4X).

A presença ou não de reação granulomatosa e rotura do trofoblasto foi relatada em todos os casos. A rotura do trofoblasto foi diagnosticada quando havia ausência do trofoblasto que recobre a vilosidade corial em trecho de qualquer extensão. A rotura trofoblástica foi graduada semiquantitativamente em:

- + (pequena) = presente em 1 vilosidade por campo de maior aumento (40X).
  - ++ (moderada) = 2-3 vilosidades por campo de maior aumento (40X).
-

- +++ (intensa) = mais de 3 vilosidades por campo de maior aumento (40X).

Para o estudo imunoistoquímico foi escolhido um bloco representativo de cada caso e realizado através da técnica estreptavidina-biotina-peroxidase, segundo Hsu et al (1981), com modificações. De uma forma sucinta, o protocolo utilizado nas reações consistiu nas seguintes etapas:

- Desparafinização dos blocos com banhos sucessivos em xilol e álcool.
  - Bloqueio da peroxidase endógena em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (10ml) e metanol (90ml).
  - Digestão enzimática com tripsina (solução padrão).
  - Incubação das seções com anticorpos primários "overnight" a 37°C e com anticorpos secundários biotinilados por 1 hora a 27°C, seguido de lavagens com solução tampão PBS e complexo avidina-biotina-peroxidase por 40 minutos a 37°C.
  - Incubação com diaminobenzidina (DAB) diluída em solução com DAB (40 mg), tampão PBS (100 ml) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (40µl).
  - Após sucessivas lavagens em água corrente e destilada, contracoloração com Hematoxilina de Mayer por 30 a 60 segundos, seguido de novas lavagens em água amoniacal, água corrente e destilada, desidratação e montagem das lâminas.
-

Foram utilizados os seguintes anticorpos: UCHL 1 (CD45RO), L26 (CD20), CD 45RO/OPD4, CD8, Células NK-like, M1 (CD15), MAC387, HAM 56 e proteína S-100, todos monoclonais da Dakopatts S/A (Dinamarca), exceto a proteína S-100 que é policlonal. A especificação de cada anticorpo, de acordo com Isaacson & Norton (1989) e Chan (2000), está descrita abaixo:

ANTICORPO	DILUIÇÃO	PADRÃO DE COLORAÇÃO	POSITIVIDADE
<b>UCHL 1</b>	1:100	membrana celular	linfócitos T
<b>OPD4</b>	1:50	membrana celular	linfócitos T auxiliares (T "helper")
<b>anti-CD8</b>	1:50	membrana celular	linfócitos T supressores/citotóxicos
<b>L26 (CD20)</b>	1:100	membrana celular	linfócitos B (exceto plasmócitos)
<b>NK</b>	1:50	membrana celular	células NK; subpopulação de linfócitos T (NK-like).
<b>M1 (CD15)</b>	1:50	membrana celular ou golgi	granulócitos e macrófagos/monócitos
<b>MAC 387</b>	1:100	citoplasmático	macrófagos e células mielóides
<b>HAM 56</b>	1:50	citoplasmático granular	monócitos/macrófagos
<b>Proteína S-100</b>	1:1000	nuclear (predominante); citoplasmático (variável)	células de Langerhans; células dendríticas interdigitantes

De cada bloco selecionado realizaram-se cortes seriados que foram corados pelos diferentes anticorpos, ou seja, um anticorpo para cada corte de parafina.

Para análise das células positivas procedeu-se ao seguinte esquema: as células coradas pelos anticorpos UCHL1, L26, CD45RO/OPD4, CD8, NK, M1, HAM56 e MAC387 foram contadas em três campos diferentes com vilosidade e no maior aumento (40x). O número de células coradas foi expresso como porcentagem de todas as células inflamatória analisadas, sendo contadas, no

mínimo 100 células em cada corte. Os marcadores CD45RO/OPD4 e CD8 foram considerados apenas em relação às células com morfologia compatível com linfócitos. As células positivas para a proteína S-100 foram analisadas de forma semiquantitativa de acordo com a seguinte graduação: 0 para nenhuma célula reativa, + para raras células, ++ para moderada quantidade de células e +++ para freqüentes células positivas.

A análise estatística descritiva e gráfica dos dados foi realizada através dos seguintes programas computacionais: The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 8.02, SAS Institute Inc, 1999-20001, Cary, NC, USA; Microcal Origin, versão 5.0. Microcal Software Inc, 1991-1997, Northampton, MA, USA.

## ***4. RESULTADOS***

---

---

Os achados histológicos das placentas com vilosite por *T. cruzi* e por *T. gondii* estão descritos na tabela 1 e das placentas com VED na tabela 2. Todos os casos de vilosite chagásica, associados a natimortalidade apresentavam uma reação inflamatória intensa, com formação de granulomas, rotura do trofoblasto acentuada e grande quantidade de parasitas no tecido. Na VED, nenhum caso apresentou reação granulomatosa e a rotura do trofoblasto, quando presente, foi pequena (+) a moderada (++). O aspecto histológico de cada tipo de vilosite está ilustrado nas figuras 1,2 e 3.

Nos casos de placentite por *P. brasiliensis* a reação inflamatória estava restrita ao espaço interviloso e constituída, em um dos casos, por macrófagos, células gigantes multinucleadas e fibrina que circundavam os depósitos de células fúngicas. No outro caso estudado o infiltrado inflamatório estava constituído predominantemente por granulócitos neutrófilos. As leveduras, que coravam-se pela técnica da metenamina-prata (Grocott), também foram identificadas no interior de macrófagos. O aspecto morfológico dos fungos em um dos casos estudado pode ser observado na figura 4. Os vilos contíguos aos focos de inflamação intervilosa exibiam rotura do trofoblasto e espessamento da membrana basal trofoblástica, porém sem evidências de vilosite ou agentes infecciosos no estroma vilositário. Clinicamente, um dos casos evoluiu com prolapso do cordão umbilical e óbito fetal e o outro com parto prematuro, sem sofrimento do concepto. Tanto o natimorto como o nativo, não apresentaram evidências clínico-patológicas de infecção fúngica.

---

A distribuição dos casos de vilosite chagásica, vilosite toxoplasmótica e VED, de acordo com a percentagem de células positivas para os marcadores estudados, está demonstrada nas tabelas 3 e 4. As médias das percentagens para os marcadores UCHL1, CD4, CD8, L26, HAM 56, MAC 387 e M1 nos casos de VED, vilosite chagásica e vilosite toxoplasmótica estão demonstradas na tabela 5. A análise estatística descritiva dos índices de positividade para cada marcador nos casos de VED e vilosite infecciosa está demonstrada nas tabelas 6 a 14. Nesta análise os casos de vilosite chagásica e toxoplasmótica foram separados em grupos com reação granulomatosa e sem reação granulomatosa. As percentagens médias desta análise estão destacadas na tabela 15. As percentagens para os mesmos marcadores nos casos de intervilosite por *P. brasiliensis* podem ser vistas na tabela 16.

### **Linfócitos T**

Em relação ao marcador UCHL1 (Figura 5), na VED a percentagem de células positivas variou de 22,6 a 59,3% com média de 38,48%. Na vilosite chagásica variou de 17,3 a 71,8% com média de 32% e na vilosite toxoplasmótica variou de 23,1 a 67% com média de 43,1%. Nos casos de vilosite infecciosa, além de constituir o infiltrado inflamatório viloso, os linfócitos T foram observados aderidos aos locais de necrose do trofoblasto e no espaço interviloso adjacente ao vilo inflamado. Na VED a maioria dos linfócitos T estava localizada no estroma vilositário, com escassas células no espaço interviloso próximo às áreas de ruptura trofoblástica. No grupo controle sem vilosite, os linfócitos T estavam restritos ao espaço interviloso.

Em relação aos sub-tipos de linfócitos T houve um predomínio dos linfócitos T CD8+ (Figura 7) em relação aos CD4+ (Figura 6) em todos os casos de vilosite analisados. A positividade para o CD4 variou de 10,6 a 69,1%, com média de 30,15% na VED. Na vilosite chagásica variou de 7,6 a 37,3%, com média de 17,29% e na vilosite toxoplasmótica variou de 5,2 a 36,4% com média de 19,72%. A expressão do CD8 variou de 38,7 a 85,5%, com média de 71,25% na VED; 23,8 a 90,3% com média de 63,70% na vilosite chagásica e 45,9 a

---

68,1% com média de 55,82% na vilosite toxoplasmótica. Na maior parte dos casos de vilosite estudados a proporção de linfócitos T CD4+ foi menor do que 40% das células inflamatórias e os linfócitos T CD8+ representaram mais de 60% das células inflamatórias (Figuras 13 e 16). A relação CD4/CD8 variou de 0,13 a 0,67, com média de 0,36 na VED; 0,04 a 0,38, com média de 0,24 na vilosite chagásica e 0,05 a 0,56, com média de 0,26 na vilosite toxoplasmótica. Em nenhum caso a proporção de linfócitos T CD4+ foi maior que a de linfócitos T CD8+. A distribuição das células T CD4+ e CD8+ foi semelhante ao observado para o marcador UCHL 1, com predomínio no estroma viloso ou aderidas aos sítios de ruptura do trofoblasto. Nos casos de intervilosidade placentária por *P. brasiliensis* foram detectados raros linfócitos T CD8+ apenas nos focos inflamatórios que circundavam as células fúngicas. Não foram identificados linfócitos T CD4+ e os linfócitos T CD8+ constituíam menos de 1% das células inflamatórias. Nas placentas controle houve detecção de raros linfócitos T CD4+ e CD8+ no espaço interviloso.

### **Macrófagos e monócitos**

A porcentagem de células positivas para o marcador histiocítico HAM 56 (Figura 8), variou de 19,2 a 74%, com média de 48% na VED; 35,5 a 82,15%, com média de 62,63% na vilosite chagásica e 50,55 a 80,7%, com média de 64% na vilosite toxoplasmótica. As células positivas para esse anticorpo foram observadas no estroma das vilosidades e nas áreas de ruptura do trofoblasto. As células constituintes dos granulomas observados nas vilosites por *T. cruzi* e *T. gondii* também foram positivas para o HAM 56. Embora detectados em grande quantidade em todos os tipos de vilosite, na maioria dos casos com reação granulomatosa, o HAM 56 representou mais de 70% das células inflamatórias (Figura 14). Na maioria dos casos sem granulomas, o HAM 56 representou menos de 70% das células inflamatórias. Ainda assim, observamos uma proporção entre 40 e 65% das células inflamatórias constituídas por macrófagos HAM 56+ na maior parte dos casos de vilosite não-granulomatosa (Figura 17).

---

Apenas um caso de placentite por *P. brasiliensis* demonstrou positividade para o HAM 56 em cerca de 10% das células inflamatórias.

A positividade para o MAC 387 (Figuras 9 e 10) variou de 0 a 13,9% nos casos de VED (média de 3,47%), 0 a 30,3% na vilosite chagásica (média de 15,9%) e 0 a 41,6% na vilosite toxoplasmótica (média de 18,28%). Os monócitos positivos para o MAC 387 representavam no máximo 42% das células inflamatórias em todos os tipos de vilosite e foram mais prevalentes nos casos que apresentavam rotura do trofoblasto. Estas células estavam aderidas às áreas com perda do trofoblasto ou abaixo deste. As células mononucleares que constituíam granulomas frouxos no espaço interviloso também foram positivas para o MAC 387. Em relação à placentite por *P. brasiliensis*, 90% das células inflamatórias que circundavam as leveduras no espaço interviloso foram positivas para o MAC 387 em um dos casos. No outro caso, apenas 10% das células inflamatórias expressavam o MAC 387 (Tabela 16).

No grupo controle o marcador HAM 56 corou os macrófagos do estroma vilositário (células de Hofbauer), enquanto o marcador MAC 387 apenas foi positivo nos monócitos das circulações fetal e materna. As células de Hofbauer, que são macrófagos fetais, não expressaram positividade para o MAC 387.

### **Linfócitos B**

O marcador de linfócitos B (L26/CD20), foi negativo no infiltrado inflamatório em todos os casos de VED, em 5 casos de vilosite chagásica e em 4 casos de vilosite toxoplasmótica. Nos poucos casos em que houve positividade para este anticorpo, a percentagem máxima de células positivas foi de 1,7% na vilosite chagásica e 1,0% na vilosite toxoplasmótica. As placentas controles não apresentaram células positivas para o L26.

### **Células NK**

A positividade para o anticorpo que detecta células NK (Figura 11) variou de menos de 1 a 25,1% das células inflamatórias na VED; menos de 1 a

---

13,5% na vilosite chagásica e menos de 1 a 23,7% na vilosite toxoplasmótica. As células NK predominavam no estroma da vilosidade e raramente também foram identificadas nas áreas de rotura do trofoblasto. Nas placentas controles, observamos escassas células NK no espaço interviloso.

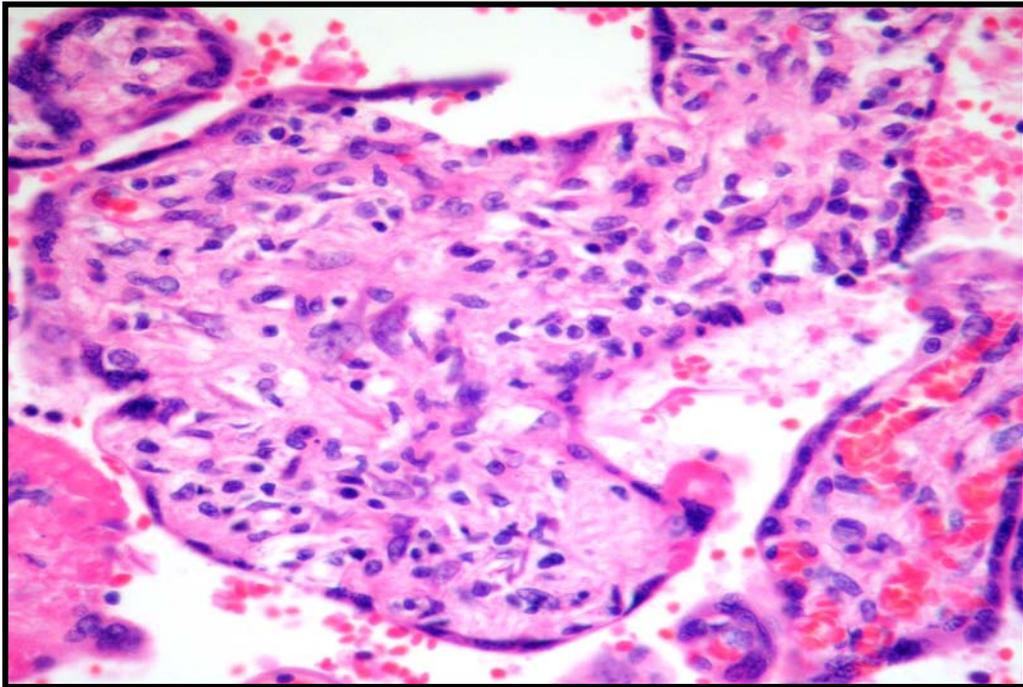
### **Granulócitos**

O marcador M1 (CD15) foi positivo em apenas um caso de VED e representou 1,7% das células inflamatórias. Na vilosite chagásica a presença de células positivas para este marcador variou de 0 a 33,6% (média de 10,6%) e na vilosite toxoplasmótica variou de 1 a 35,4% (média de 11,7%). Os granulócitos foram observados nas áreas de rotura trofoblástica, nos focos de necrose vilositária ou constituindo diminutos agregados abaixo do trofoblasto. Na infecção por *P. brasiliensis* os granulócitos CD15+ constituíam respectivamente 90% (Figura 12) e 5% das células inflamatórias do espaço interviloso nos dois casos estudados. Nos casos controles granulócitos CD15+ estavam presentes nas circulações materna e fetal.

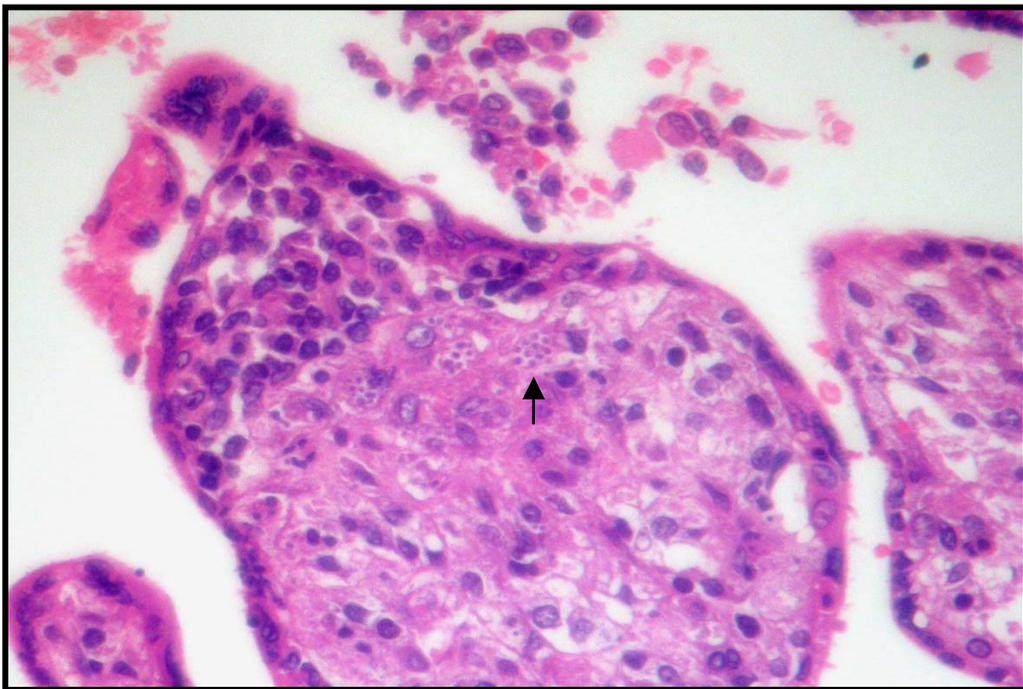
### **Células S-100 positivas**

Na VED, raras células positivas para a proteína S-100 estavam presentes em cinco casos. Em todos os casos de vilosite infecciosa foram detectadas desde raras a freqüentes células positivas para a proteína S-100 em algumas vilosidades inflamadas. As maiores freqüências destas células foram observadas nos casos de vilosite chagásica com formação de granulomas. Nas placentas controles, células positivas para a proteína S-100 eram vistas no estroma de algumas poucas vilosidades e também co-expressavam o marcador HAM56.

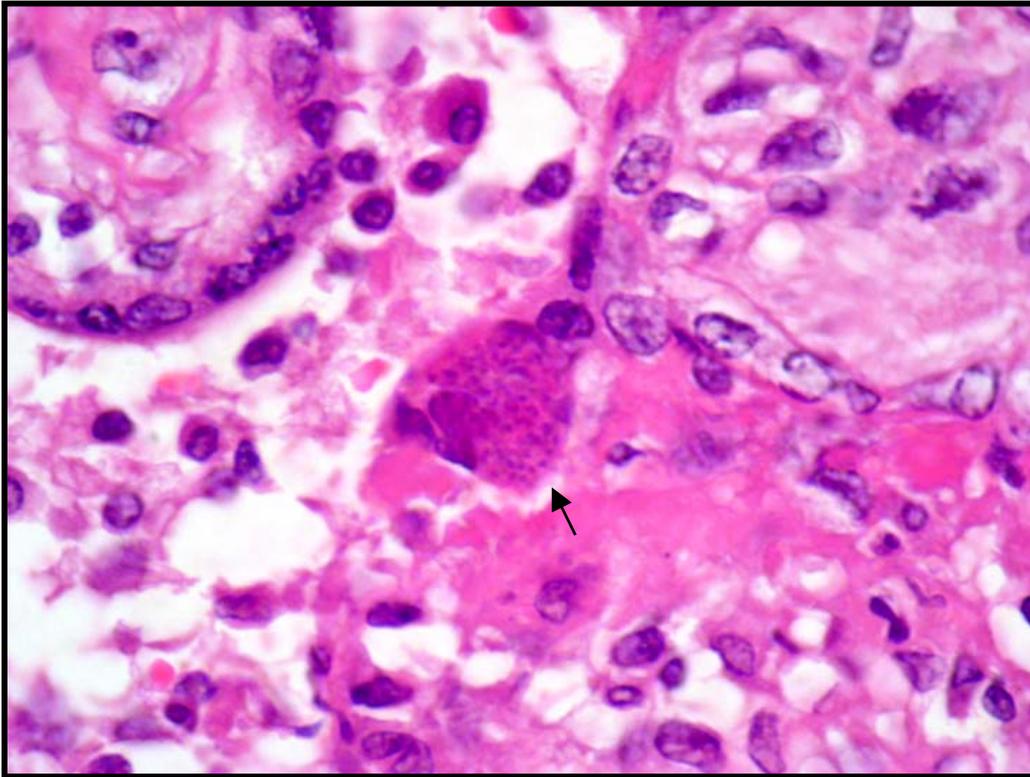
---



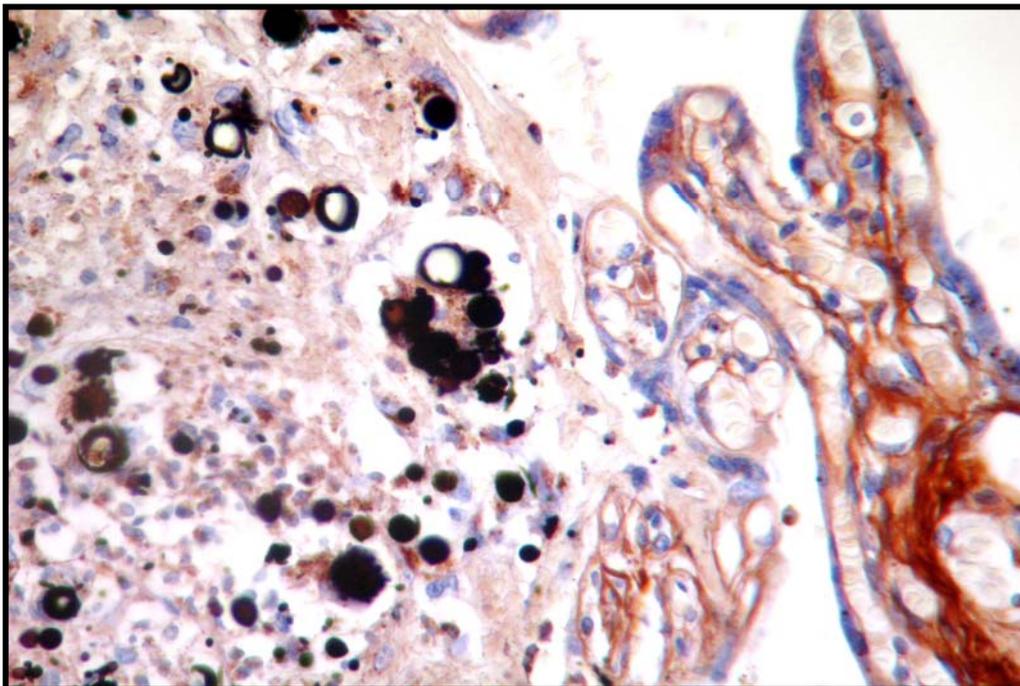
**Figura 1** – Vilosite de etiologia desconhecida (HE).



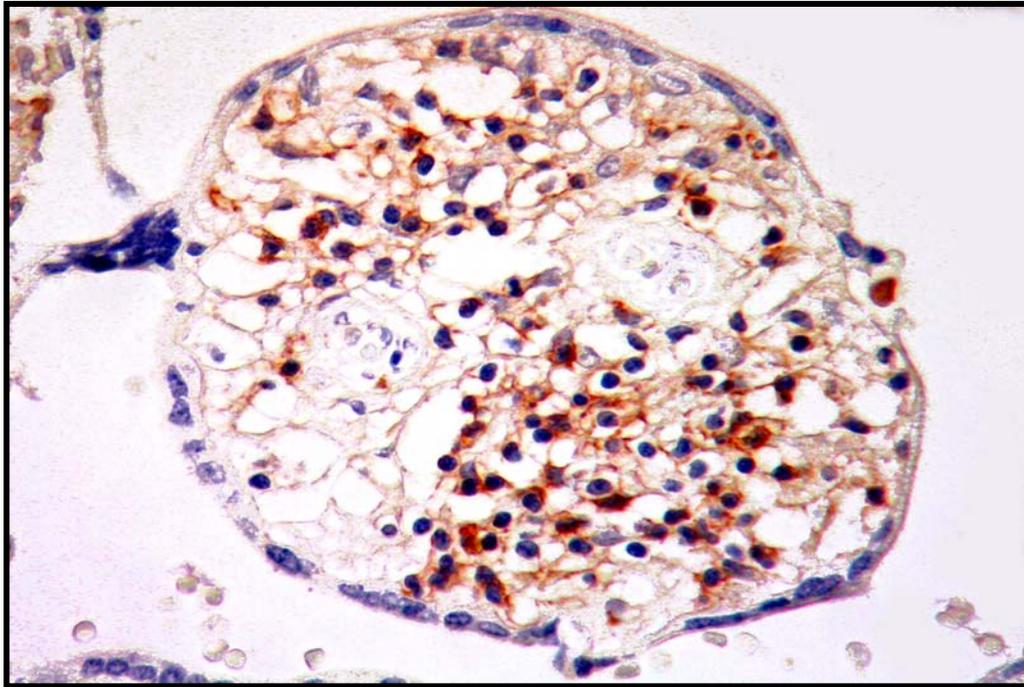
**Figura 2** – Vilosite por *T. cruzi* com pseudocistos parasitários no estroma vilositário (HE).



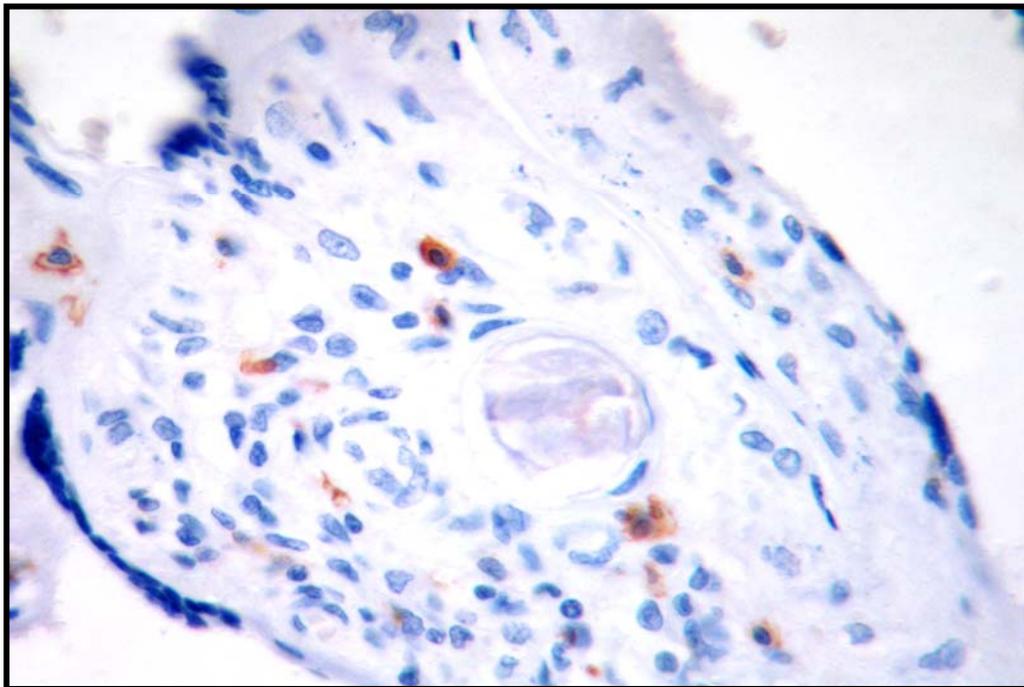
**Figura 3** – Vilosite por *T. gondii* com pseudocisto parasitário na vilosidade coriônica (HE).



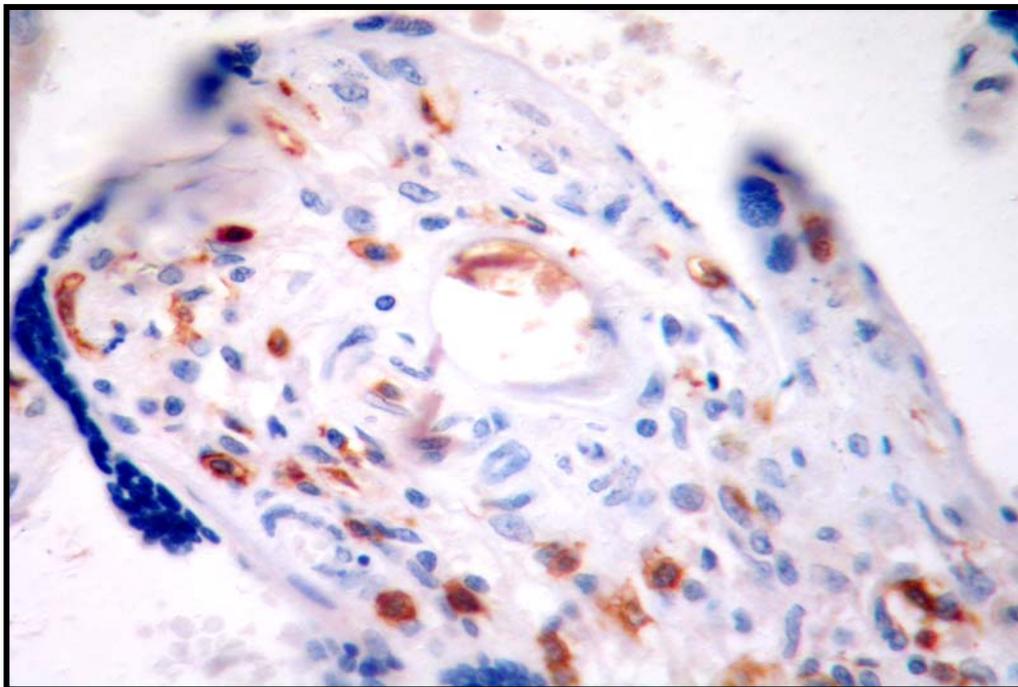
**Figura 4** – Intervilosite por *P. brasiliensis* (Grocott).



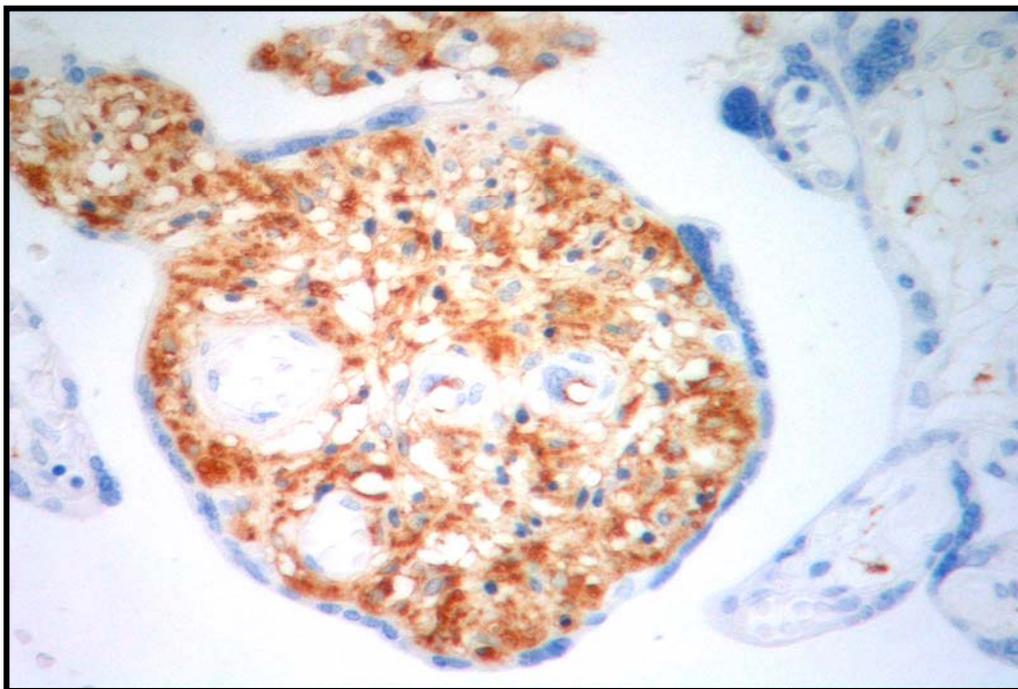
**Figura 5** – Anticorpo UCHL 1 (vilosite por *T. cruzi*).



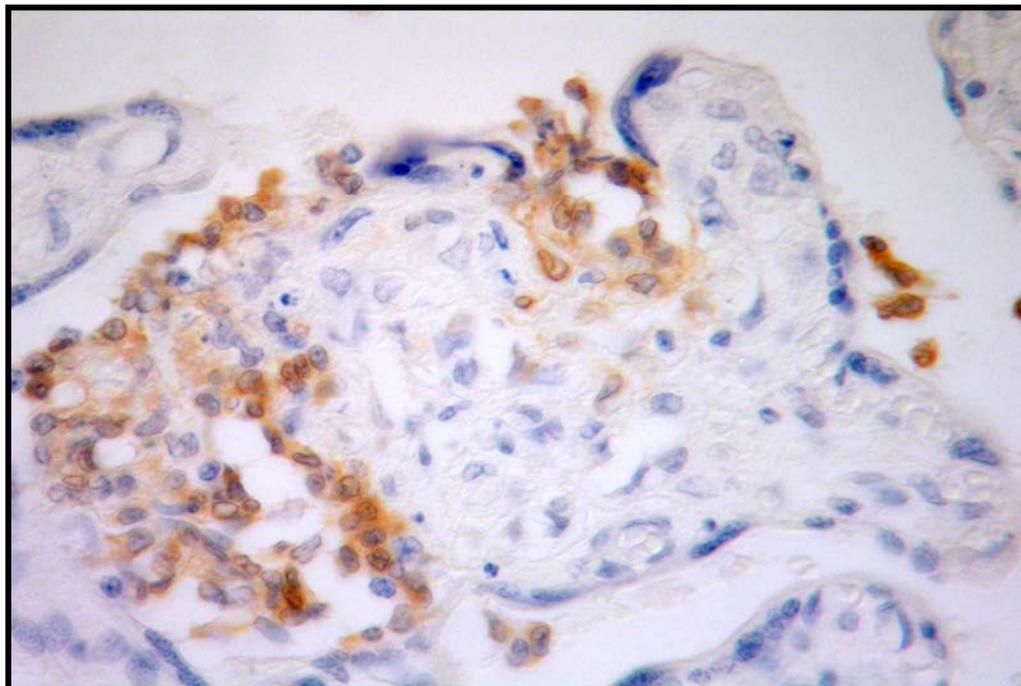
**Figura 6** – Anticorpo OPD4 (vilosite de etiologia desconhecida). Presença de escassos linfócitos positivos para este marcador no estroma vilositário.



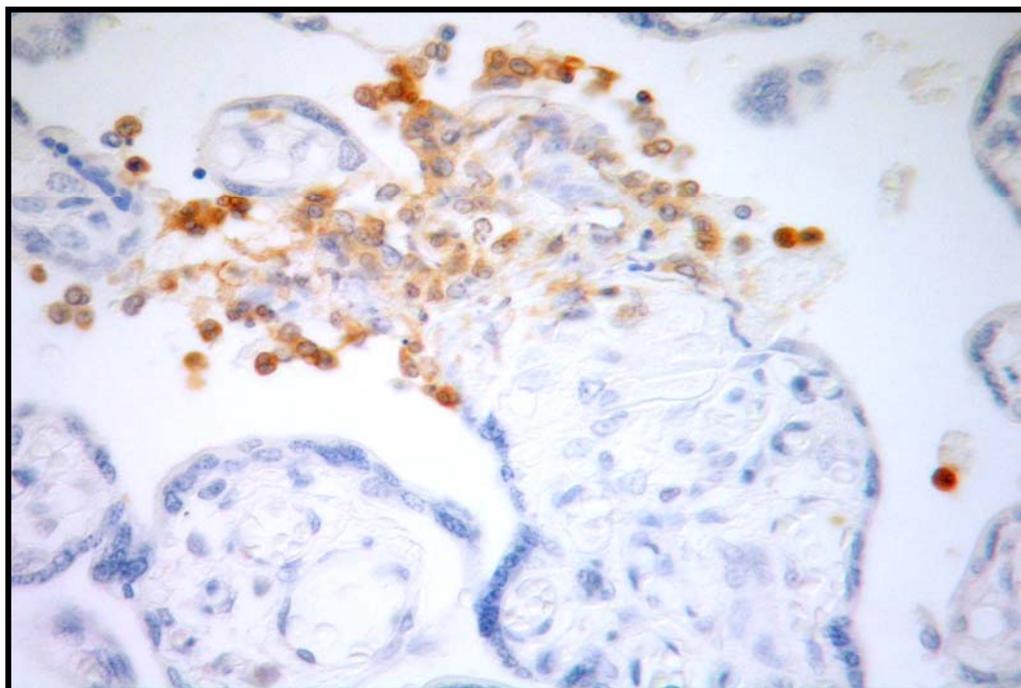
**Figura 7** – Anticorpo CD8 (vilosite de etiologia desconhecida). Notar a maior expressão deste marcador no infiltrado linfocitário vilositário em relação ao OPD4 (mesmo campo da figura anterior).



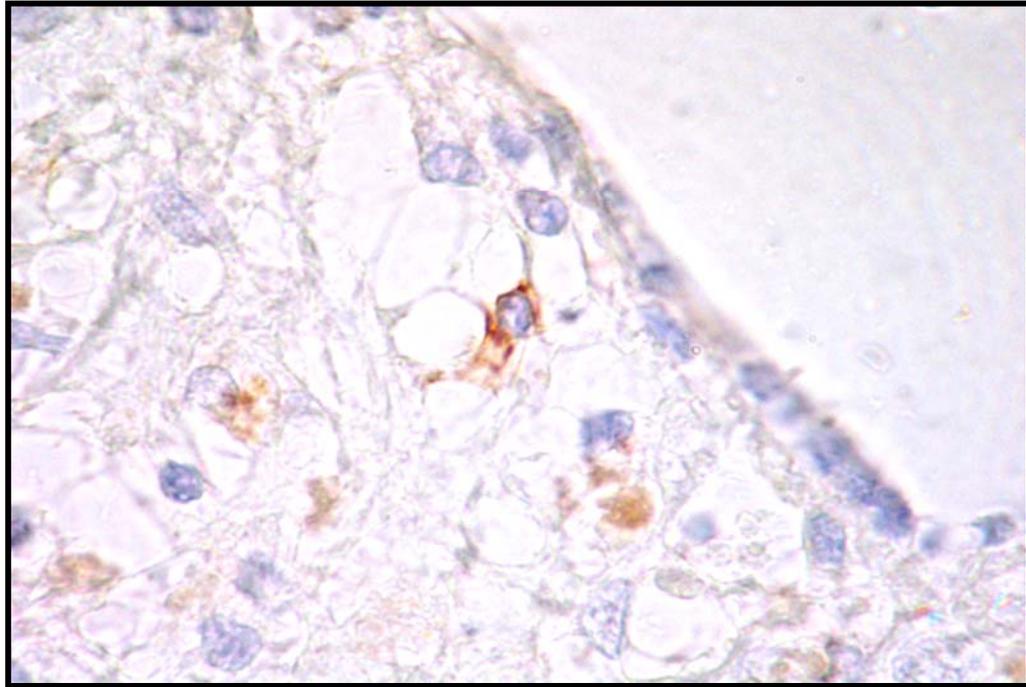
**Figura 8** – Anticorpo HAM 56 (vilosite por *T.cruzi*). O infiltrado inflamatório vilositário exhibe frequentes macrófagos positivos para o HAM56. Notar a positividade em células de Hofbauer na vilosidade adjacente sem inflamação.



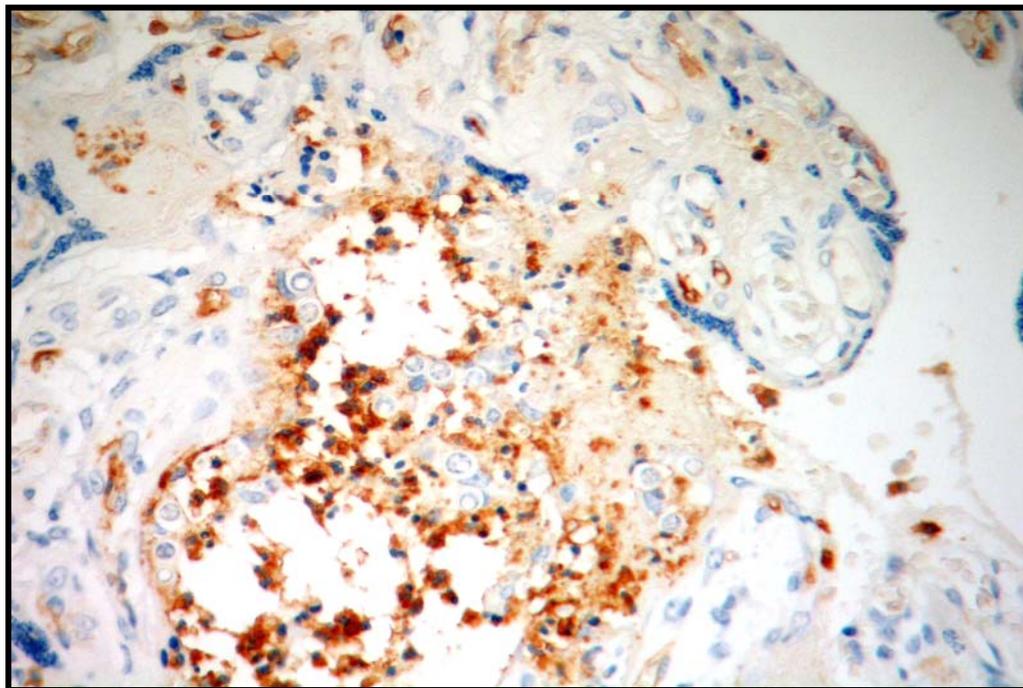
**Figura 9** – Anticorpo MAC 387 (vilosite de etiologia desconhecida). As células positivas estão aderidas às áreas de rotura do trofoblasto.



**Figura 10** – Anticorpo MAC 387 (vilosite por *T. gondii*). A positividade é observada em células aderidas aos focos de rotura do trofoblasto e no espaço intervilloso adjacente. Não há expressão nos macrófagos do estroma vilositário (células de Hofbauer).



**Figura 11** – Anticorpo para células NK (vilosite por *T. cruzi*),



**Figura 12** – Anticorpo CD15 (intervilosite por *P. brasiliensis*). Os granulócitos CD15+ estão localizados no espaço intervilososo envolvendo células fúngicas.

**Tabela 1** – Achados histológicos nas placentas com vilosite por *T.cruzi* e *T.gondii*

Doença	Nº	RN	Intensidade da Vilosite	Reação Granulomatosa	Rotura do Trofoblasto	Quantidade de Parasitas
<b>Chagas</b>	1	NV	Moderada	Ausente	++	++
	2	NV	Leve	Ausente	0	+
	3	NV	Leve	Ausente	0	+
	4	NV	Leve	Ausente	+	+
	5	NM	Intensa	Presente	+++	+++
	6	NM	Intensa	Presente	+++	+++
	7	NM	Intensa	Presente	+++	++
	8	NM	Intensa	Presente	+++	+++
<b>Toxoplasmose</b>	9	NV	Leve	Ausente	0	+
	10	NV	Moderada	Ausente	+	+
	11	NV	Moderada	Ausente	++	+
	12	NM	Intensa	Presente	+++	+
	13	NM	Moderada	Presente	+++	+

Nº = Número    NV = Nativivo    NM = Natimorto  
 0 = Ausente    + = Pequena    ++ = Moderada    +++ = Intensa

**Tabela 2** – Achados histológicos nas placentas com VED

Nº	RN	INTENSIDADE DA VILOSITE	REAÇÃO GRANULOMATOSA	ROTURA DO TROFOBlasto
1	NV	Moderada	Ausente	+
2	NV	Intensa	Ausente	+
3	NV	Moderada	Ausente	0
4	NV	Intensa	Ausente	+
5	NV	Leve	Ausente	+
6	NV	Moderada	Ausente	+
7	NV	Moderada	Ausente	+
8	NV	Leve	Ausente	0

Nº = Número    NV = Nativivo    NM = Natimorto  
 0 = Ausente    + = Pequena    ++ = Moderada    +++ = Intensa

**Tabela 3** – Distribuição dos casos de vilosite por *T. cruzi* e por *T. gondii* conforme a porcentagem de células positivas para os anticorpos UCHL1, CD45RO/OPD4, CD8, NK, L26, HAM 56, MAC387, M1 e proteína S-100

Doença	Classif.	Nº	UCHL 1	OPD4	CD 8	OPD4/ CD8	NK	L 26	HAM 56	MAC 387	M 1	S 100
Chagas	NG	1	71,8%	37,3%	72,9%	0,33	10%	0	62,8%	31,8%	0	+
	NG	2	24,3%	7,6%	23,8%	0,38	1%	1,3%	63,3%	0	0	+
	NG	3	23,4%	33,3%	62,3%	0,36	1%	0	35,5%	0	0	+
	NG	4	35,1%	8,4%	90,3%	0,04	1%	0	47,1%	0	0	+
	G	5	45,5%	19,4%	82,8%	0,20	2,6%	1,7%	81,6%	23,2%	33,6%	+++
	G	6	17,3%	10,7%	24%	0,36	1%	0	82,1%	25%	6%	++
	G	7	-	8,4%	71,9%	0,18	13,5 %	0	77,9%	30,3%	25%	++
	G	8	38,6%	13,2%	81,6%	0,13	1%	1%	50,7%	16,9%	20,8%	+++
Toxoplasmose	NG	9	49,5%	36,4%	54,2%	0,45	1%	1%	57,5%	0	1%	+
	NG	10	67%	5,2%	45,9%	0,11	23,7%	0	50,5%	0	35,4%	+
	NG	11	23,1%	33,6%	48,9%	0,56	8,1%	0	66%	34,2%	1%	+
	G	12	33,3%	6,1%	62%	0,05	-	0	65,6%	15,6%	20,5%	+++
	G	13	42,6%	17,3%	68,1%	0,14	1%	0	80,7%	41,6%	1%	+

NG = não-granulomatoso. G = granulomatoso. - = não-avaliável

**Tabela 4** – Distribuição dos casos de vilosite de etiologia desconhecida conforme a porcentagem de células positivas para os anticorpos UCHL1, CD45RO/OPD4, CD8, NK, L26, HAM 56, MAC387, M1 e proteína S-100

Doença	Classif.	Nº	UCHL 1	OPD4	CD 8	OPD4/CD8	NK	L 26	HAM 56	MAC 387	M 1	S100
Vilosite Etiologia Desconhecida	NG	1	59,3%	29,6%	76,7%	0,42	1%	0	41%	1,6%	1,7%	0
	NG	2	30,6%	69,1%	85,5%	0,59	25,1%	0	69%	2,3%	0	+
	NG	3	32,1%	18,1%	81,5%	0,15	1%	0	19,2%	0	0	+
	NG	4	56,1%	39,1%	73,3%	0,39	16,5%	0	44%	13,9%	0	+
	NG	5	25,6%	15,8%	38,7%	0,36	1%	0	74%	8,4%	0	+
	NG	6	51,8%	22,0%	77,4%	0,13	1%	0	64,8%	1,6%	0	+
	NG	7	29,8%	36,9%	63,8%	0,67	21,4%	0	46,1%	0%	0	0
	NG	8	22,6%	10,6%	73,1%	0,20	1%	0	26,5%	0%	0	0

**Tabela 5** – Distribuição das percentagens médias de células positivas para os anticorpos UCHL 1, CD4, CD8 e HAM 56 nos casos de vilosite por chagas, toxoplasmose e VED

<b>Doença</b>	<b>UCHL 1</b>	<b>CD 4</b>	<b>CD 8</b>	<b>CD4/CD8</b>	<b>L26</b>	<b>HAM 56</b>	<b>MAC 387</b>	<b>M1</b>
<b>VED</b>	38 %	30 %	71 %	0,36	0	48%	3,47%	0,2%
<b>Chagas</b>	32 %	17 %	64 %	0,24	0,5%	63%	15,9%	10,6%
<b>Toxo</b>	43 %	20 %	56 %	0,26	0,2%	64%	18,28%	11,7%

**Tabela 6** – Estatística descritiva para o anticorpo UCHL 1

<b>Doença</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>D.P.</b>
<b>Chagas - G</b>	3	39%	17%	46%	<b>34%</b>	15%
<b>Chagas - NG</b>	4	30%	23%	72%	<b>39%</b>	23%
<b>Toxo - G</b>	2	38%	33%	43%	<b>38%</b>	7%
<b>Toxo - NG</b>	3	50%	23%	67%	<b>47%</b>	22%
<b>VED – NG</b>	8	31%	23%	59%	<b>38%</b>	15%

**Tabela 7** – Estatística descritiva para o anticorpo CD8

<b>Doença</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>D.P.</b>
<b>Chagas - G</b>	4	77%	24%	83%	<b>65%</b>	28%
<b>Chagas - NG</b>	4	68%	24%	90%	<b>62%</b>	28%
<b>Toxo - G</b>	2	65%	62%	68%	<b>65%</b>	4%
<b>Toxo - NG</b>	3	49%	46%	54%	<b>50%</b>	4%
<b>VED – NG</b>	8	75%	39%	86%	<b>71%</b>	15%

**Tabela 8** – Estatística descritiva para o anticorpo CD4

<b>Doença</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>D.P.</b>
<b>Chagas - G</b>	4	12%	8%	19%	<b>13%</b>	5%
<b>Chagas - NG</b>	4	21%	8%	37%	<b>22%</b>	16%
<b>Toxo - G</b>	2	12%	6%	17%	<b>12%</b>	8%
<b>Toxo - NG</b>	3	34%	5%	36%	<b>25%</b>	17%
<b>VED – NG</b>	8	26%	11%	69%	<b>30%</b>	19%

**Tabela 9** – Estatística descritiva para CD4/CD8

<b>Doença</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>D.P.</b>
<b>Chagas - G</b>	4	0,19	0,13	0,36	<b>0,22</b>	0,10
<b>Chagas - NG</b>	4	0,35	0,04	0,38	<b>0,28</b>	0,16
<b>Toxo - G</b>	2	0,10	0,05	0,14	<b>0,10</b>	0,06
<b>Toxo - NG</b>	3	0,45	0,11	0,56	<b>0,37</b>	0,23
<b>VED – NG</b>	8	0,38	0,13	0,67	<b>0,36</b>	0,20

**Tabela 10** – Estatística descritiva para o anticorpo NK

<b>Doença</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>D.P.</b>
<b>Chagas - G</b>	4	2%	1%	14%	<b>5%</b>	6%
<b>Chagas - NG</b>	4	1%	1%	10%	<b>3%</b>	5%
<b>Toxo - G</b>	1	1%	1%	15%	<b>1%</b>	.
<b>Toxo - NG</b>	3	8%	1%	24%	<b>11%</b>	12%
<b>VED – NG</b>	8	1%	1%	25%	<b>9%</b>	11%

Tabela 11 – Estatística descritiva para o anticorpo L26

Doença	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Média	D.P.
Chagas - G	4	1%	0.00	2%	<b>1%</b>	1%
Chagas - NG	4	0.00	0.00	1%	<b>0.00</b>	1%
Toxo - G	2	0.00	0.00	0.00	<b>0.00</b>	0.00
Toxo - NG	3	0.00	0.00	0.01	<b>0.00</b>	1%
VED – NG	8	0.00	0.00	0.00	<b>0.00</b>	0.00

Tabela 12 – Estatística descritiva para o anticorpo HAM 56

Doença	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Média	D.P.
Chagas - G	4	8%	51%	82%	<b>73%</b>	15%
Chagas - NG	4	55%	36%	63%	<b>52%</b>	13%
Toxo - G	2	73%	66%	81%	<b>73%</b>	11%
Toxo - NG	3	58%	51%	66%	<b>58%</b>	8%
VED – NG	8	45%	19%	74%	<b>48%</b>	20%

Tabela 13 – Estatística descritiva para o anticorpo MAC 387

Doença	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Média	D.P.
Chagas - G	4	24%	17%	30%	<b>24%</b>	6%
Chagas - NG	4	0.00	0.00	32%	<b>8%</b>	16%
Toxo - G	2	29%	16%	42%	<b>29%</b>	18%
Toxo - NG	3	0.00	0.00	34%	<b>11%</b>	20%
VED – NG	8	2%	0.00	14%	<b>3,5%</b>	55%

**Tabela 14** – Estatística descritiva para o anticorpo M1

Doença	N	Mediana	Mínimo	Máximo	Média	D.P.
Chagas - G	4	23%	6%	34%	<b>21%</b>	12%
Chagas - NG	4	0.00	0.00	0.00	<b>0.00</b>	0.00
Toxo - G	2	11%	1%	21%	<b>11%</b>	14%
Toxo - NG	3	1%	1%	35%	<b>12%</b>	20%
VED – NG	8	0.00	0.00	2%	<b>0.00</b>	1%

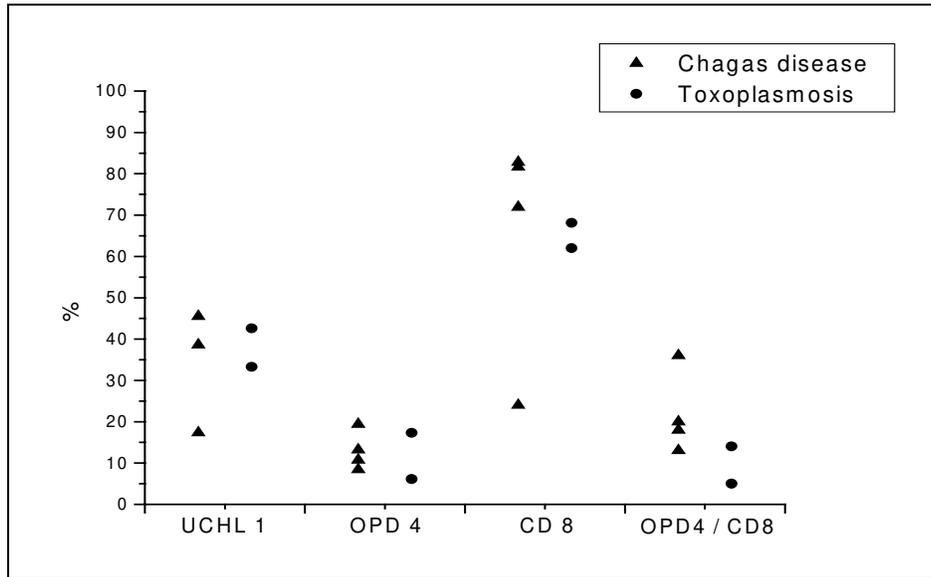
**Tabela 15** – Distribuição das percentagens médias de células positivas para os anticorpos UCHL 1, CD4, CD8, NK, L26, HAM 56, MAC 387 e M1 nos casos de vilosite por chagas, toxoplasmose e VED

Doença	UCHL 1	CD4	CD8	CD4/CD8	NK	L26	HAM 56	MAC 387	M1
Chagas - G	34%	13%	65%	0,22	5%	1%	73%	24%	21%
Chagas - NG	39%	22%	62%	0,28	3%	0	52%	8%	0
Toxo – G	38%	12%	65%	0,10	1%	0	73%	29%	11%
Toxo – NG	47%	25%	50%	0,37	11%	0	58%	11%	12%
VED – NG	38%	30%	71%	0,36	9%	0	48%	3,5%	0

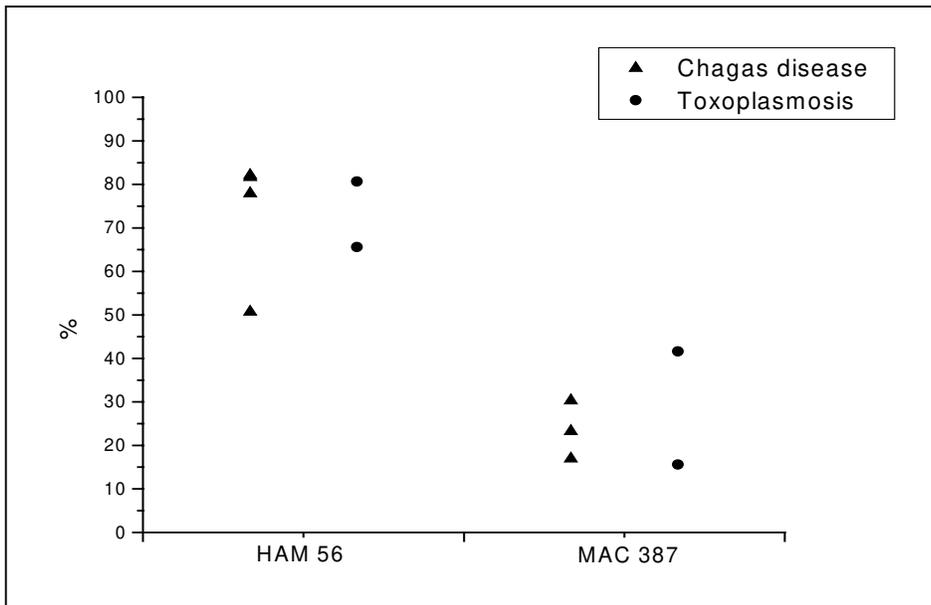
**Tabela 16** – Distribuição das percentagens de células positivas para os anticorpos UCHL 1, CD4, CD8, NK, L26, HAM 56, MAC 387 e M1 nos casos de intervilosite por *P. brasiliensis*

Casos	UCHL1	CD4	CD8	CD4/CD8	NK	L26	HAM56	MAC387	M1	S100
1	-	0	<1	-	-	-	10%	10%	90%	-
2	-	0	<1	-	-	-	-	90%	5%	-

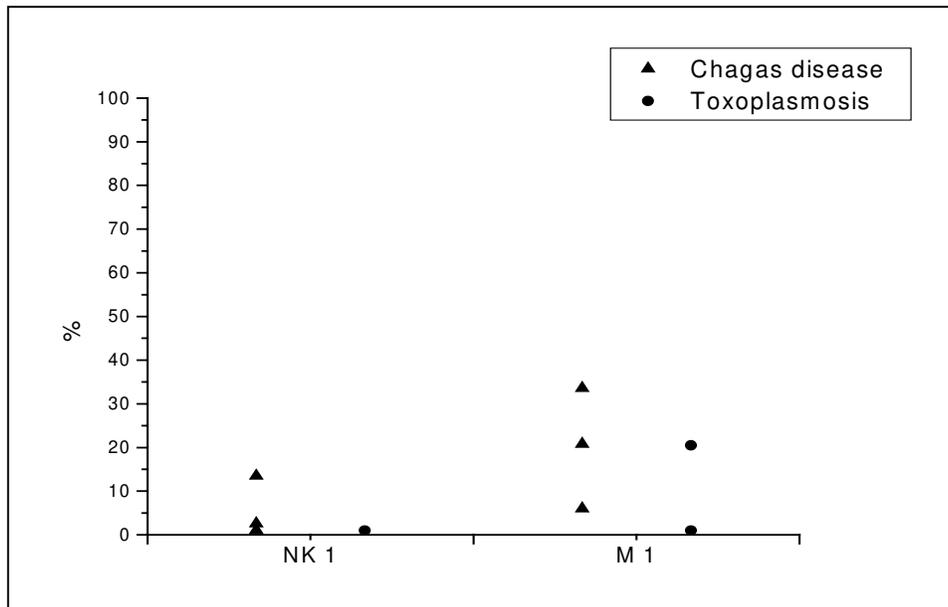
- = não-avaliável



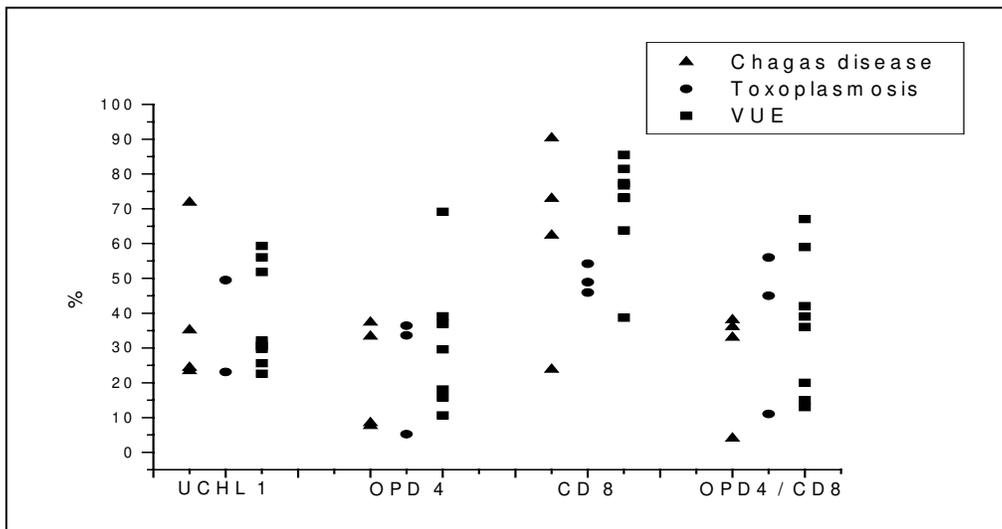
**Figura 13** - Gráfico descritivo para os anticorpos UCHL1, OPD4, CD8 e OPD4/CD8 nos casos de vilosite granulomatosa



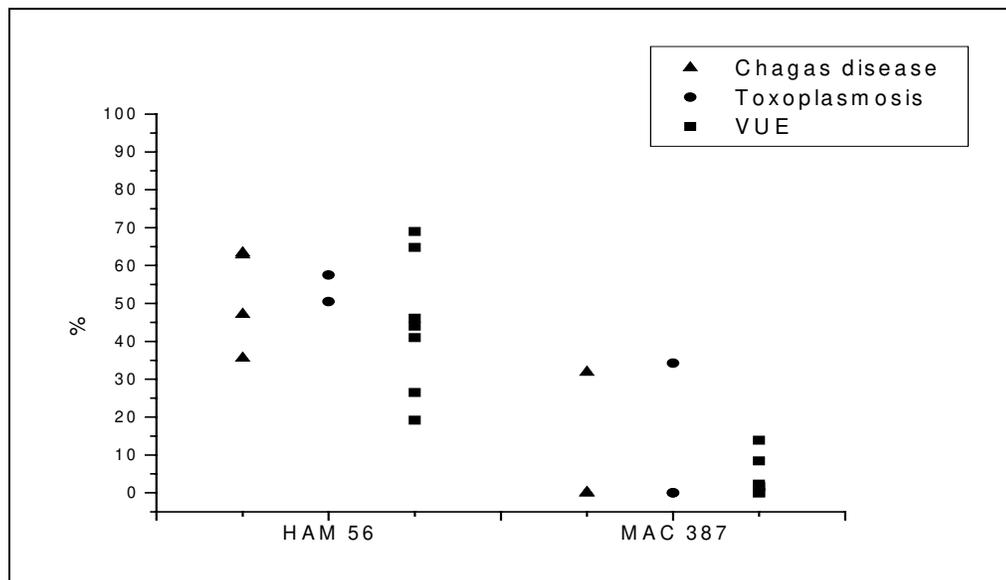
**Figura 14** – Gráfico descritivo para os anticorpos HAM 56 e MAC 387 nos casos de vilosite granulomatosa.



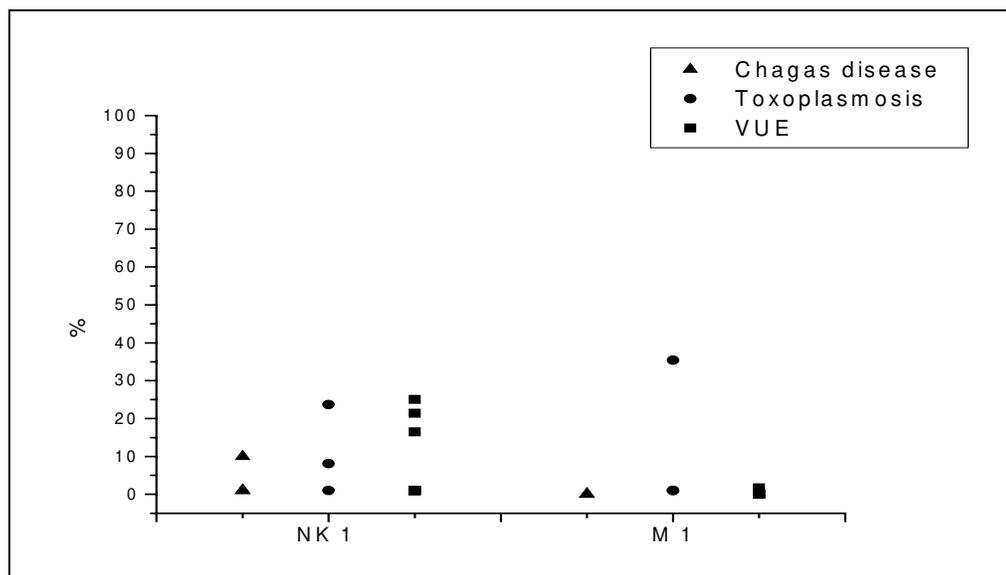
**Figura 15** - Gráfico descritivo para os anticorpos NK e M1 nos casos de vilosite granulomatosa.



**Figura 16** - Gráfico descritivo para os anticorpos UCHL1, OPD4, CD8 e OPD4/CD8 nos casos de vilosite não-granulomatosa



**Figura 17** – Gráfico descritivo para os anticorpos HAM 56 e MAC 387 nos casos de vilosite não-granulomatosa



**Figura 18** - Gráfico descritivo para os anticorpos NK e M1 nos casos de vilosite não-granulomatosa

## ***5. DISCUSSÃO***

---

---

## **5.1 Aspectos gerais**

A inflamação da vilosidade placentária, ou vilosite, que pode ser de causa infecciosa ou de etiologia desconhecida, é uma lesão comum, porém de patogênese ainda pouco conhecida. Na maioria dos casos a reação inflamatória é focal e constituída por células com morfologia de linfócitos e histiócitos (ALTSHULER & RUSSEL, 1975; KNOX & FOX, 1984; RUSSEL, 1990, 1997; GERSELL & KRAUS, 2000). Entretanto, não obstante os avanços nas técnicas de imunofenotipagem em tecidos, são raros os trabalhos dedicados ao estudo da composição do infiltrado inflamatório nas vilosites.

Na vilosite de etiologia desconhecida (VED), Labarrere et al (1990), ALTEMANI (1992), NAKAMURA et al (1994) e KAPUR et al (2004), demonstraram que histiócitos e linfócitos T são as principais células constituintes do infiltrado inflamatório e que uma população significativa destas células expressam antígenos de histocompatibilidade HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ. Os linfócitos B estão ausentes.

Há raros estudos que investigam os subtipos de linfócitos envolvidos na reação inflamatória da VED. Labarrere et al (1990) e Nakamura et al (1994), fazem uma análise qualitativa das células inflamatórias em cortes congelados e relatam que os linfócitos T são do subtipo CD4+ (linfócitos T auxiliares). Por outro lado, Kapur et al (2004) detectaram um predomínio de linfócitos do subtipo CD8+ (linfócitos T supressores/citotóxicos) nos casos de VED analisados.

---

Na vilosite chagásica apenas ALTEMANI et al (2000) analisaram o infiltrado inflamatório por meio da técnica de imunistoquímica em tecido fixado em formalina. Nos casos estudados o infiltrado estava constituído por histiócitos, linfócitos T e escassas células NK. Ao contrário do que foi observado por Labarrere et al (1990) e Nakamura et al (1994) na VED, na vilosite chagásica os linfócitos T CD8+ foram mais numerosos do que os linfócitos T CD4+ (ALTEMANI et al, 2000).

No presente trabalho, verificamos que em todos os casos e nos diferentes tipos de vilosite estudados (vilosite chagásica, vilosite toxoplasmótica e VED), o infiltrado inflamatório estava predominantemente constituído por histiócitos HAM 56 + e linfócitos T. Em relação aos subtipos de linfócitos T, em todos os casos houve um predomínio de linfócitos CD8+ em relação aos linfócitos CD4+. O predomínio de histiócitos e linfócitos T CD8+ foi observado não apenas nos diferentes tipos de vilosite mas também quando analisamos em conjunto os casos de vilosite infecciosa e quando dividimos estes casos em grupos de acordo com a presença ou não de reação granulomatosa.

Os linfócitos B não foram identificados ou estavam presentes em quantidade insignificante (<2%) no infiltrado inflamatório em todos os casos de vilosite analisados. A ausência ou inexpressiva participação dos linfócitos B nos diferentes casos de vilosite por nós estudados está de acordo com os resultados de Labarrere et al (1990), Altemani (1992), Nakamura et al (1994) e Kapur et al (2004), que analisaram placentas com VED. Na vilosite chagásica a detecção de linfócitos B no infiltrado também é insignificante (ALTEMANI et al, 2000).

---

Na maioria dos casos, o infiltrado exibia ainda uma pequena quantidade de células NK, histiócitos MAC 387+, granulócitos e células positivas para a proteína S-100.

A participação de células NK no infiltrado inflamatório vilositário, apesar de presente em todos os tipos de vilosite estudados, foi pouco expressiva na maioria dos casos. Estas células, que são abundantes na decídua, têm sido relacionadas como possíveis causadoras de lesão fetal e aborto (WEGMAN et al, 1993; JURISICOVA et al, 1996).

Todos os nossos casos de vilosite apresentaram uma proporção de células NK menor do que 30% do total de células inflamatórias no infiltrado. A natimortalidade, por sua vez, que foi observada em parte dos casos infecciosos, estava relacionada com maior grau de parasitemia, intensidade maior da inflamação com necrose do trofoblasto, formação de granulomas e, por conseguinte, maior quantidade de histiócitos HAM 56 no infiltrado.

As células positivas para a proteína S-100 foram escassas na maioria dos casos de VED e mais freqüentes nos casos de vilosite infecciosa com formação de granulomas. Embora esse marcador seja positivo nas células dendríticas interdigitantes (CHAN, 2000), as células identificadas nas vilosidades inflamadas não apresentavam morfologia de células dendríticas. Além disto, algumas células positivas para a proteína S-100 continham ninhos de parasitas (*T. cruzi*) e co-expressavam o marcador HAM-56. O mais provável é que sejam células de linhagem macrófagica/histiocítica, com possível dupla ação fagocítica e apresentadora de antígenos, contribuindo, portanto na gênese dos granulomas.

---

## 5.2 Vilosite infecciosa (*T. cruzi* e *T.gondii*)

No grupo infeccioso granulomatoso detectamos uma percentagem média maior de histiócitos HAM 56+ no infiltrado inflamatório (73,1%) em relação ao grupo de VED (48%), que não apresentava reação granulomatosa. É esperada esta maior quantidade de histiócitos nos casos de vilosite granulomatosa, uma vez que são as principais células constituintes dos granulomas (BRITO & FRANCO, 1994).

A análise comparativa entre os grupos mostrou ainda uma maior participação de monócitos MAC 387+ e granulócitos nas áreas de rotura trofoblástica dos casos de vilosite parasitária. Monócitos MAC 387+ agregavam-se nos locais de rotura do trofoblasto, em quantidades que variavam de 20 a 90% das células inflamatórias presentes nestas áreas. Como o anticorpo MAC 387 não detecta os macrófagos fetais (células de Hofbauer) e devido a localização exclusiva destas células MAC 387+ apenas nos sítios de necrose trofoblástica, o mais provável é que sejam monócitos advindos da circulação materna e atraídos para os sítios de inflamação vilositária. É possível que as áreas de necrose e fatores liberados pelos agentes parasitários tenham ação quimiotática para estas células. Embora não esteja descartada uma ação imune destas células, os monócitos MAC 387+ provavelmente desempenham uma ação fagocítica no intuito de remover os restos celulares necróticos do foco inflamatório (LABARRERE et al, 1990).

---

Em relação à população linfocitária, o predomínio de linfócitos T do subtipo CD8+ reproduz, na vilosite infecciosa parasitária, o mesmo padrão observado na miocardite chagásica crônica por HIGUCHI et al (1993, 1997).

Na infecção chagásica e toxoplasmótica, os linfócitos T CD8+ são descritos como as principais células efetoras responsáveis pelo controle da proliferação dos parasitas e causadoras de lesão tecidual (BRENER & GAZZINELLI, 1997; KHAN et al, 1999; MARTIN & TARLETON, 2001; RODRIGUES et al, 2003). De acordo com Martin & Tarleton (2001), os linfócitos T CD8+ desempenham um papel crucial no controle da infecção por *T.cruzi*, precipuamente por meio da produção de interferon gama.

Apesar de detectados em menor quantidade nas vilosidades inflamadas, supõe-se que os linfócitos T CD4+ também desempenham um papel importante na fase inicial da infecção chagásica e toxoplasmótica uma vez que são as células responsáveis pela diferenciação e ativação dos linfócitos T citotóxicos/supressores (MARTIN & TARLETON, 2001). De fato, a depleção de linfócitos T CD4+ na fase aguda da doença de Chagas experimental bloqueia a atividade citolítica dos linfócitos T CD8+ (BRENER & GAZZINELLI, 1997).

### **5.3 Intervilosite por *P. brasiliensis***

Na *Paracoccidioidomycose* placentária, como já previamente comentado, o agente infeccioso não consegue transpor a barreira placentária de forma que a reação inflamatória está restrita ao espaço interviloso (BRAGA et al, 1989; BLOTTA et al, 1993).

---

Assim, tal como descrito por Blotta et al (1993), também nos dois casos estudados neste trabalho, macrófagos MAC 387 constituíam 90% do infiltrado interviloso. Nenhum caso apresentou positividade para a proteína S-100. Este achado reforça a idéia de que os granulomas observados na infecção pelo *P. brasiliensis* contêm mais histiócitos com função fagocítica do que células apresentadoras de antígenos que são positivas para a proteína S-100 (FRANCO et al, 1989).

Em um dos casos, a reação inflamatória era intensamente neutrofílica, com 90% das células positivas para o marcador de granulócitos M1. Algumas destas células com morfologia de neutrófilos também eram positivas para o MAC 387. A presença de exsudato neutrofílico proeminente, em apenas um dos casos, pode representar infecção por cepas distintas de *P. brasiliensis* em cada placenta. Em estudos experimentais, a inoculação de cepas diferentes resultou em padrões morfológicos distintos de inflamação pelo *P. brasiliensis*, com freqüentes histiócitos envolvendo a cepa Pb 192 e o predomínio de neutrófilos e células fúngicas na infecção pela Pb 18 (ZACHARIAS et al, 1986). O predomínio de exsudato neutrofílico pode ainda representar uma fase aguda inicial na infecção pelo *P. brasiliensis* ou denotar a ausência de uma reação imune ao fungo, o que caracteriza o polo anérgico da doença (FRANCO et al, 1989).

Ao contrário do que é descrito por Brito & Franco (1994), não identificamos linfócitos T CD4+ na periferia dos granulomas. Nos casos estudados, os raros linfócitos T detectados eram do subtipo CD8+, foram observados apenas nos focos inflamatórios e constituíam menos de 1% das células inflamatórias.

---

A escassez de macrófagos positivos para o marcador HAM 56 nestes casos de placentite paracoccidioidomicótica contrasta com o padrão imunofenotípico observado na intervilosite causada pela malária onde os histiócitos são descritos como positivos para o CD68 (ORDI et al, 1998). Também na intervilosite histiocítica crônica, uma entidade de etiologia ainda não esclarecida, os histiócitos são predominantemente do tipo CD68+, com apenas 30 a 40% das células presentes no espaço interviloso positivas para o marcador MAC 387 (DOSS et al, 1995; BOYD & REDLINE, 2001).

#### **5.4 Origem do infiltrado inflamatório na vilosite**

Em relação a origem das células inflamatórias, não podemos, com a metodologia utilizada neste trabalho, determinar se as mesmas são fetais ou maternas nos casos de vilosite estudados. Na placentite por *P. brasiliensis*, onde o agente infeccioso não atravessou a barreira trofoblástica, certamente o infiltrado inflamatório presente no espaço interviloso deve ter origem materna. Contudo, mesmo nos casos de vilosite infecciosa, onde o agente atravessou a barreira trofoblástica, existe ainda a possibilidade da vilosidade conter uma população mista de células inflamatórias fetais e maternas sempre que houver lesão da membrana basal trofoblástica com exposição de antígenos fetais a circulação materna (ALTEMANI, 1992).

---

De fato, nos casos de vilosite infecciosa estudados, a análise morfológica dos focos de rotura do trofoblasto sugere que as células presentes nestes locais, incluindo os monócitos MAC 387, são oriundas do espaço interviloso.

A adesão de células maternas ao trofoblasto está documentada em trabalhos experimentais. XIAO et al (1997) e Garcia-Lloret, Winkler-Lowen, Guilbert (2000), mostraram que, em cultura de tecidos, monócitos do sangue periférico materno aderem ao sinciciotrofoblasto viloso via ICAM1/LFA-1 e podem induzir lesão focal pela liberação da citocina TNF-alfa.

De acordo com estes modelos, sempre que houver lesão da barreira trofoblástica, existe a possibilidade de adesão de leucócitos maternos a estes sítios e subsequente infiltração do estroma vilositário por estas células inflamatórias.

Os nossos achados, entretanto, não corroboram totalmente essa idéia de que a lesão na membrana trofoblástica é um mecanismo crucial no desenvolvimento de inflamação vilositária. Nos dois casos de vilosite por *P. brasiliensis*, por exemplo, embora houvesse perda do trofoblasto em várias vilosidades contíguas à inflamação intervilosa, em nenhum momento identificamos células inflamatórias aderidas a estes sítios ou no estroma vilositário. Aparentemente a ausência do agente infeccioso no interior da vilosidade restringiu a inflamação ao espaço interviloso.

Em relação aos trabalhos de Xiao et al (1997) e Garcia-Lloret et al (2000), os mesmos referem que a adesão dos monócitos maternos ao trofoblasto apenas ocorria na presença de níveis elevados de interferon-gama e TNF-alfa. Estas citocinas são potentes moléculas pró-inflamatórias e estão presentes na

---

resposta imune a agentes infecciosos parasitários e fúngicos (MOSMANN & SAD, 1996). Especulamos, portanto, que a localização das células inflamatórias em determinado sítio placentário (vilosidade ou espaço interviloso) depende mais da concentração de citocinas inflamatórias nestes locais do que da lesão trofoblástica, que deve ser, na maioria das vezes, um fenômeno secundário ao processo inflamatório inicial.

### **5.5 Vilosite de etiologia desconhecida (VED)**

A maior proporção de linfócitos T CD8+ nos casos de VED estudados no presente trabalho é semelhante ao observado por KAPUR et al (2004) em casos de VED e vilosite sífilítica e por Altemani et al (2000) na vilosite chagásica.

Os nossos achados, porém, não reproduzem totalmente os resultados alcançados por Labarrere et al (1990) nos casos de VED e Nakamura et al (1994) nos casos de VED e vilosite por CMV estudados, que detectaram apenas linfócitos T CD4+. Esta discrepância pode decorrer de diferenças técnicas (utilização de material congelado) e amostrais, embora não seja possível descartar a possibilidade de um padrão heterogêneo no infiltrado inflamatório da VED.

De qualquer forma, os nossos resultados, assim como os de Nakamura et al (1994) e Kapur et al (2004) atestam que não é possível, pelo estudo imunoistoquímico do infiltrado inflamatório, diferenciar uma vilosite de etiologia infecciosa da VED. Ambas podem apresentar a mesma composição de células inflamatórias e aspectos morfológicos idênticos.

---

Acreditamos que este padrão de resposta inflamatória semelhante nos dois grupos (vilosite infecciosa e vilosite de etiologia desconhecida) favorece a idéia de que a VED seja causada por algum agente infeccioso, possivelmente viral (ALTSHULER & RUSSEL, 1975; RUSSEL, 1980; BENIRSCHKE & KAUFMAN, 1995; BENIRSCHKE et al, 1999).

Altshuler & Russel (1975), em um dos relatos iniciais sobre esta entidade, mencionam que o aspecto histológico da VED é indistinguível da vilosite causada pela rubéola. Garcia et al (1985) descrevem como inespecíficas as alterações morfológicas observadas na placenta em casos de infecção congênita pelo vírus da rubéola.

Algumas infecções virais também podem ser assintomáticas na mãe e recém-nascido, não obstante a presença de alterações morfológicas nas placentas (GARCIA et al, 1991; NAKAMURA et al, 1994; QUERESHI et al, 1996).

Na vilosite causada pelo citomegalovirus (CMV), embora as inclusões virais sejam patognomônicas dessa doença, nem sempre são identificadas nos cortes histológicos (RUSSEL, 1997). Nakamura et al (1994) identificou inclusões em apenas um de quatro casos de vilosite com positividade para o CMV pela técnica de PCR. Dois destes casos eram assintomáticos e poderiam ser interpretados como VED, caso a pesquisa de DNA viral pela técnica do PCR não fosse realizada. Saetta, Agapitos, Davaris (1998), observaram alterações histológicas consistentes com infecção pelo CMV em apenas três casos de um total de sete casos positivos para o DNA viral pela técnica de PCR.

---

Qureshi & Jacques (1996) estudaram 19 placentas com história materna de varicela durante a gestação. Destes casos, três exibiam sinais histológicos de vilosite. Em um a vilosite era difusa e o recém-nascido apresentou sinais clínicos de infecção viral. Nos demais casos a vilosite era focal e os recém-nascidos não apresentaram sinais clínicos de varicela, de forma muito semelhante ao que é descrito na VED. Os autores sugerem, ainda, que uma vilosite crônica de etiologia desconhecida seria a causa mais provável das lesões placentárias nestes casos, apesar do diagnóstico inequívoco de infecção materna pelo vírus da varicela durante a gestação.

Benirschke et al (1999) relatam um caso de vilosite por varicela e comentam que o diagnóstico só foi possível devido à história clínica de infecção materno-fetal e confirmação da etiologia viral por imunohistoquímica e PCR.

A presença de um infiltrado inflamatório rico em linfócitos T do subtipo CD8+ também está de acordo com a hipótese de uma etiologia infecciosa para a VED pois essas células são importantes nas respostas imunes a infecções intracelulares por certos microorganismos tais como *Plasmodium sp*, *T. cruzi*, *T. gondii* e *Leishmania sp* (BRENER & GAZZINELLI, 1997; KHAN et al, 1999; MARTIN & TARLETON, 2001; RODRIGUES et al, 2003).

Os linfócitos T CD8+ desempenham ainda um papel crítico e fundamental na imunidade adquirida contra os vírus (YEWDELL & DEL VAL, 2004). Nas hepatites virais, por exemplo, linfócitos T CD8+ podem ser detectados por imunohistoquímica nos focos de agressão à placa limitante de hepatócitos e a resolução da hepatite viral C tem sido relacionada a uma potente ação de células T CD8+ na resposta imune contra esse vírus (SCHAFF, LOTZ, SCHULTE-HERMAN, 1996; LAUER et al, 2004).

---

O predomínio de linfócitos T CD8+ no infiltrado de lesões infecciosas virais nem sempre é observado. Nakamura et al (1994) relatam que os linfócitos T eram do subtipo CD4+ nos casos de vilosite crônica analisados, entre os quais haviam dois casos de infecção pelo CMV.

A hipótese de que a VED resulta de uma agressão executada por leucócitos maternos contra antígenos fetais parece mais plausível quando sabemos que as células inflamatórias nesse tipo de lesão têm sido descritas como predominantemente de origem materna (REDLINE & PATTERSON, 1993; KAPUR et al 2004). Porém, na vilosite sífilítica, também descreve-se um predomínio de leucócitos maternos, incluindo granulócitos (KAPUR et al, 2004).

Convém lembrar que, se a VED resulta de uma agressão imune materna contra antígenos fetais, é necessário ter ocorrido previamente algum tipo de lesão na barreira trofoblástica, propiciando o contato desses antígenos com a circulação materna. De fato, Garcia-Lloret et al (2000), em estudos experimentais, sugerem que a lesão do trofoblasto por células maternas poderia ser o fator desencadeante da VED.

Entretanto, a lesão ao trofoblasto apenas ocorrerá desde que os mecanismos de defesa da placenta também estejam deficientes. Dentre estes mecanismos estão: a) a inibição da resposta imune celular Th1 em prol de uma resposta Th2 que favorece o mecanismo humoral e b) a expressão do antígeno de histocompatibilidade HLA-G no trofoblasto não-viloso. Esta molécula tem a capacidade de inibir a ação citolítica de células NK e linfócitos T citotóxicos contra as células trofoblásticas (JURISICOVA et al, 1996; ARCK, DIETL, CLARK 1999; CAROSELLA et al, 2000; ATHANASSAKIS & VASSILIADIS, 2002).

---

Sabe-se também, pelo que foi observado nos casos de infecção placentária por *P. brasiliensis* estudados, que nem sempre que ocorre lesão da barreira trofoblástica, há concomitante migração de células inflamatórias para o interior da vilosidade. Presumimos ser necessária uma concentração local de mediadores inflamatórios para que ocorra acúmulo e trânsito de leucócitos em direção à vilosidade. Nos casos de VED, podemos supor que uma ação viral intravilositária seja a causa responsável por esse hipotético aumento de citocinas e conseqüente reação inflamatória na vilosidade placentária.

Portanto, embora a nossa amostra não tenha contemplado casos de placentites virais, fundamentados nos resultados deste trabalho e nos argumentos acima discutidos, julgamos que a hipótese infecciosa é a mais provável explicação para a causa da VED na maioria dos casos. A ausência de detecção desse agente pode ser devido a problemas de amostragem na análise do tecido placentário, como relatado por Benirschke et al (1999) ou porque o agente infeccioso é assintomático e o quadro histológico da vilosite inespecífico, como descrito nas viroses placentárias (GARCIA et al, 1991,1995; NAKAMURA et al, 1994; QUERESHI et al, 1996).

Finalmente, deve-se considerar que alguns casos de VED realmente possam resultar de algum desequilíbrio no sistema imune materno durante a gestação, com ativação de uma resposta do tipo enxerto-versus-hospedeiro contra o tecido placentário. A associação da VED com doenças auto-imunes e a freqüente recorrência das lesões em alguns casos são sinais clínicos que corroboram essa possibilidade (REDLINE & ABRAMOWSKY, 1985; REDLINE & PATTERSON, 1993). Outro fato que depõe contra a possibilidade de uma

---

etiologia viral em todos os casos de VED é o encontro de níveis baixos de IgM no sangue do cordão umbilical em grande parte de placentas com sinais histológicos de VED (ALTEMANI et al, 1989).

Em conclusão, os resultados do presente trabalho, assim como os relatados por Labarrere et al (19990), Altemani (1992), Redline & Patterson (1993), Altemani et al (2000) e Kapur et al revelam que a inflamação do vilos placentário, tanto na VED como em vilosites de diferentes etiologias infecciosas, é um fenômeno predominantemente mediado por histiócitos e linfócitos T, com predomínio do subtipo CD8+ .

O encontro de uma composição de células inflamatórias semelhantes nos diversos tipos de vilosite sugere que diferentes fatores etiológicos, a partir de um determinado momento na história natural da doença, compartilham o mesmo mecanismo patogênico que resulta na inflamação da vilosidade. Se assim for verdade e de acordo com os resultados deste trabalho, os histiócitos ao lado de linfócitos T CD8+ e, em menor quantidade, linfócitos T CD4+, são as células efetoras predominantes neste processo, o que indica a participação de uma resposta imune celular do tipo Th1 (MOSMAN & SAD, 1996).

---

## **6. CONCLUSÕES**

---

---

- Todos os tipos de vilosite estudados apresentaram o mesmo padrão de composição do infiltrado inflamatório, com predomínio de histiócitos HAM 56+ e linfócitos T CD8+, o que sugere que a inflamação vilositária desenvolve-se através de mecanismos patogênicos semelhantes independente do agente etiológico inicial.
  - Não é possível distinguir a VED das vilosites infecciosas pela constituição do infiltrado inflamatório, o que corrobora para uma possível etiologia infecciosa da VED.
  - Nas vilosites, o infiltrado inflamatório nas áreas de rotura do trofoblasto difere daquele observado no estroma da vilosidade, devido a maior quantidade de monócitos MAC 387+, sugerindo que estas células são advindas do espaço interviloso e, portanto, de origem materna.
  - Nos casos de intervilosite por *P. brasiliensis*, mesmo com a presença de focos de rotura do trofoblasto, não há células inflamatórias no interior da vilosidade, o que sugere que a lesão da barreira trofoblástica não está obrigatoriamente associada à infiltração do estroma vilositário por leucócitos.
-

## ***7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

---

ALTEMANI, A.; FASSONI, A.; MARBA, S. Cord IgM levels in placentas with villitis of unknown etiology. **Journal of Perinatal Medicine**, **17**:465-468, 1989.

ALTEMANI, A.; GONZATTI, A.; METZE, K. - How many paraffin blocks are necessary to detect villitis? **Placenta**, **24(1)**: 116-117, 2003.

ALTEMANI, A. Immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate in villitis of unknown etiology: a qualitative and quantitative analysis. **Pathology Research and Practice**, **188**: 303-309, 1992.

ALTEMANI, A.; BITTENCOURT, A.L.; LANA, A.M. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chaga's disease: a qualitative and quantitative analysis. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, **62**:319-324, 2000.

ALTEMANI, A.; ANDRADE, L.L.A.; BRENELLI, M.A.; GRASSIOTO, O.R.; BACHA, A.M. Vilosite placentária: correlação anatomo-clínica. **Jornal de Pediatria**, **52**: 315-318, 1982.

ALTSHULER, G.; RUSSEL, P. The human placental vilitides: a review of chronic intrauterine infection. **Current Topics in Pathology**, **60**:.63-112, 1975.

ARCK, P.; DIETL, J.; CLARK, D. - From the decidual cell internet: trophoblast-recognizing T cells. **Biol Reprod**, **60**: 227-233, 1999.

ATHANASSAKIS, I.; VASSILIADIS, S. Interplay between T helper type 1 and type 2 cytokines and soluble major histocompatibility complex molecules: a paradigm in pregnancy. **Immunology**, **vol 107**: 281-287, 2002.

BENIRSCHKE, K.; COEN, R.; PATTERSON, B.; KEY, T. - Villitis of known origin: varicella and toxoplasma. **Placenta**, **20**: 395-399, 1999.

BENIRSCHKE, K.; KAUFMAN, P. - Villitis of unknown etiology. In: **Pathology of the human placenta**. Third edition. New York, Spriger-Verlag, 1995, p.596-601.

---

- BITTENCOURT, A.L.; BARBOSA, H.S. - A importância do estudo do feto macerado para o diagnóstico da forma congênita da doença de chagas. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 14(4):** 260-263, 1972.
- BITTENCOURT, A.L. - Congenital chaga's disease. **Am J Dis Child, 130:**97-103, 1976.
- BITTENCOURT, A.L. - Placentite chagásica e transmissão congênita da doença de Chagas. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 5(2):** 62-67, 1963.
- BITTENCOURT, A.L. - Possible risk factors for vertical transmission of chaga's disease. **Rev, Inst. Med. Trop.São Paulo, 34(5):** 403-408, 1992.
- BLOTTA, M.H.S.L; ALTEMANI, A.M.; AMARAL, E.; SILVA, L.J.; CAMARGO, Z.P. - Placental involvement in Paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycology, 31:** 249-257, 1993.
- BOYD, T.K.; REDLINE, R.W. - Chronic histiocytic intervillitis: a placental lesion associated with recurrent reproductive loss. **Hum Pathol., 31(11):** 1389-96, 2000.
- BRAGA, L.F.C.O.; KASTING, G.; FRANKE, H.J. - Placentite intervillosa paracoccidioidomicótica. **Rev. Bras. Ginecol.Obstet. 6:** 117-120, 1989.
- BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chaga's disease. **Int Arch Allergy Immunol, v.114:** 103-110, 1997.
- BRITO, T. DE; FRANCO, M. - Granulomatous inflammation. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 36(2):** 185-192, 1994.
- CAROSELLA, E.D.; PAUL, P.; MOREAU,P.; ROUAS-FREISS, N. - HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects. **Immunol. Today, 21(11):**532-533, 2000.
-

- CARVALHO, M.G.F.; MONTENEGRO, M.R. - Experimental paracoccidioidomycosis in hamsters (*Mesocricetus auratus*): gestational interactions. **Mycopathologia**, **145(2)**: 81-87, 1999.
- CHAN, J.K.C. - Tumors of the lymphoreticular system, including spleen and thymus. In: FLETCHER, C.D.M. ed. - **Diagnostic histopathology of tumors**. Vol 2, second edition, London, Churchill Livingstone, p.1099-1245, 2000.
- DOSS, B.J.; GREENE, M.F.; HILL, J.; HEFFNER, L.J.; BIEBER, F.R.; GENEST, D.R. - Massive chronic intervillitis associated with recurrent abortions. **Hum Pathol**, **26(11)**: 1245-51, 1995.
- FOX, H. - In: Infections and inflammatory lesions of the placenta. Major problems in pathology.v.7 **Pathology of the placenta**. Second edition. Saunders. London, 1997. p. 294-343.
- FRANCO, M.; MENDES, R.P.; MOSCARDI-BACCHI, M.; REZKALLAH-IWASSO, M.; MONTENEGRO, M.R. - Paracoccidioidomycosis. In: **Balliere's clinical tropical medicine and communicable diseases**, Vol 4:185-220, 1989
- GARCIA, A.G.; BASSO, N.G.; FONSECA, M.E.; ZUARDI, J.A.; OUTANNI, H.N. - Enterovirus associated placental morphology: a light, electron microscopic and immunohistologic study. **Placenta**, **12(5)**: 533-547, 1991.
- GARCIA, A.G.; MARQUES, R.L.; LOBATO, Y.Y.; FONSECA, M.E.; WIGG, M.D. - Placental pathology in congenital rubella. **Placenta**, **6(4)**: 281-95, 1985.
- GARCIA-LLORET, M.I.; WINKLER-LOWEN, B.; GUILBERT, L.J. Monocytes adhering by LFA-1 to placental syncytiotrophoblasts induce local apoptosis via release of TNF-. A model for hematogenous initiation of placental inflammations. **J Leukoc Biol**, vol **68**: 903-908, 2000.
- GERSELL, D.J.; KRAUS, F.T. – Diseases of the Placenta. In: **Blaustein's Pathology of the female genital tract**, 5<sup>th</sup> ed, New York, Springer-Verlag, 2000.
-

HIGUCHI, M.D.; RIES, M.M.; AIELLO, V.D.; BENVENUTI, L.A.; BELLOTTI, G.; PILEGI, F. - Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. **Am J Trop Med Hyg.**, **56(5)**: 485-489, 1997.

HIGUCHI, M.D.; GUTIERREZ, P.S.; AIELLO, V.D.; PALOMINO, S.; BOCCHI, E.; KALIL, J.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. - Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.**, **423(3)**: 157-60, 1993.

HSU, S.; RAINE, M.S.L.; FANGER, H. - A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am. J. Clin. Pathol.** **75**:734-738, 1981.

JURISICOVA, A.; CASPER, R.; MACLUSKY, N.J.; MILLS, G.B.; LIBRACH, C.L. - HLA-G expression during preimplantation human embryo development. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **93**:161-165, 1996.

KAPUR, P.; RAKHEJA, D.; GOMEZ, A.M.; SHEFFIELD, J.; SANCHEZ, P.; ROGERS, B.B. - Characterization of inflammation in syphilitic villitis and villitis of unknown etiology. **Pediatr Dev Pathol**, **7 (5)**: 453-458, 2004.

KHAN, I.A.; GREEN, W.R.; KASPER, L.H; GREEN, K.A.; SCHWARTZMAN, J.D. - Immune CD8(+) T cells prevent reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the immunocompromised host. **Infect Immun.**, **67(11)**: 5869-76, 1999.

KNOX, W.F.; FOX, H. Villitis of unknown aetiology: its incidence and significance in placentae from a british population. **Placenta**, **v.5**: 395-402, 1984.

LABARRERE, C.; ALTHABE, O.; TELENTA, M. - Chronic villitis of unknown aetiology in placentae of idiopathic small for gestational age infants. **Placenta**, **vol 3**:309-18, 1982.

---

LABARRERE, C.A.; McINTRE, J.A.; FAULK, W.P. Immunohistologic evidence that villitis in human normal term placenta is an immunologic lesion. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.162: 515-522, 1990.

LABARRERE, C; CATOGGIO, LJ; MULLEN, EG, ALTHABE, OH - Placental lesions in maternal autoimmune diseases. **Am J Reprod Immunol Microbiol.** 12:78-86, 1986.

LAUER, G.M.; BARNES, E.; LUCAS, M.; TIMM, J.; OUCHI, K.; KIM, A.Y.; DAY, C.L.; ROBBINS, G.K.; CASSON, D.R.; REISER, M.; DUSHEIKO, G.; ALLEN, T.M.; CHUNG, R.T.; WALKER, B.D.; KLENERMAN, P. - High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. **Gastroenterology**, 127(3): 924-36, 2004.

LISBÔA, A.C. - Sobre a forma congênita da doença de Chagas. Estudo anátomo-patológico de 6 casos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 2(6): 319-334, 1960.

MARQUES, S.A.; FRANCO, M.F.; MENDES, R.P; SILVA, N.C.A.; BACCILI,C.; CURCELLI, E.D.; FERACIN, C.M.; OLIVEIRA, C.S.; TAGLIARINI, J.V.; DILLON, N.L. - Aspectos epidemiológicos da paracoccidiodomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo - Brasil). **Rev. Inst. Med. Trop.**, 25(2): 87-92, 1983.

MARTIN, D.; TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunological Reviews**, vol201:304-317, 2001.

McCAFFRE, M.A.; ALTSHULER, G.; BENIRSCHKE, K. - Placental coccidiodomycosis without fetal disease. **Arch Pathol Lab Med** 102: 512-514, 1978.

MOSMANN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol today**, vol 17: 138-146, 1996.

NAKAMURA, Y.; SAKUMA, S.; KAWANO, K.; HASHIMOTO, T. - Detection of the human cytomegalovirus gene in placental chronic villitis by polimerase chain reaction. **Hum Pathol**, 25(8): 815-818, 1994.

---

NORTON, A.J.; ISAACSON, P.G. - Lymphoma phenotyping in formalin-fixed and paraffin wax-embedded tissues. Range of antibodies and staining patterns.

**Histopathology 14:** 437-446, 1989.

ORDI, J.; ISMAIL, M.R.; VENTURA, P.J.; KAHIGWA, E.; HIRT, R.; CARDESA, A.; ALONSO, P.L.; MENENDEZ, C. - Massive chronic intervillitis of the placenta associated with malaria infection. **Am J Surg Pathol, 22(8):**1006-11, 1998.

QURESHI, F.; JACQUES, S.M. - Maternal varicella during pregnancy: correlation of maternal history and fetal outcome with placental histopathology. **Hum Pathol, 27:**191-195, 1996.

REDLINE, R.W.; ABRAMOWSKY, C.R. - Clinical and pathologic aspects of recurrent placental villitis. **Hum Pathol 16:** 727-731, 1985.

REDLINE, R.W.; PATTERSON, P. Villitis of unknown etiology is associated with major infiltration of fetal tissue by maternal inflammatory cells. **American Journal of Pathology, v.143:** 473-79, 1993.

REDLINE, W.R.; O'RIORDAN, M.A. - Placental lesions associated with cerebral palsy and neurologic impairment following term birth. **Arch. Pathol. Lab. Med., 124:**1785-1791, 2000.

RODRIGUES, M.M.; BOSCARDIN, S.B.; VASCONCELOS, J.R.; HIYANE, M.I.; SALAY, G.; SOARES, I.S. - Importance of CD8 T cell mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines. **An Acad Bras Cienc., 75(4):** 443-68, 2003.

RUSSEL, P. - Infections of the placental villi (villitis). In: FOX.,H & WELLS,A. ed. - **Haynes and Taylor Obstetrical and Gynaecological Pathology**. Fourth edition. vol.2. New York, Churchill Livingstone, 1995, p.1541-1558.

RUSSEL, P. - Inflammatory lesions of the human placenta.III: the histopathology of villitis of unknown aetiology. **Placenta 1:** 227-244, 1980.

---

SAETTA, A.; AGAPITOS, E.; DAVARIS, P.S. - Determination of CMV placentitis. Diagnostic application of the polymerase chain reaction. **Virchows Arch.** **432(2):** 159-62, 1998.

SCHAFF, Z.; LOTZ, G.; SCHULTE-HERMAN, R. - Pathomorphological characteristics and pathogenesis of viral hepatitis. **Pathol Oncol Res**, **2(3):** 132-143, 1996.

VIGGIANO, M.G.C; XIMENES, Y.R. - Placentite nas parasitoses. In: GARCIA, A. & AZOUBEL, R., ed. - **A placenta humana. Morfologia e patologia fetal e perinatal.** Rio de Janeiro, Livraria Atheneu, 1986, p.165-174.

WEGMAN, TG; LIN, H; GUILBERT, L; MOSMANN, TR - Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? **Immunol.Today**, **15:** 353-356, 1993.

XIAO, J; GARCIA-LLORET; M, WINKLER-LOWEN; B, MILLER, R; SIMPSON, K; GUILBERT, LJ. ICAM-1-mediated adhesion of peripheral blood monocytes to the maternal surface of placental syncytiotrophoblasts: implications for placental villitis. **Am J Pathol** **150:** 1845-60, 1997.

YEWDELL, J.W.; DEL VAL, M. - Immunodominance in T CD8+ responses to viruses: cell biology, cellular immunology and mathematical models. **Immunity**, **21(2):** 149-53, 2004.

ZACHARIAS, D.; UEDA, A.; MOSCARDI-BACCHI, M.; FRANCO, M.; SAN-BLAS, G. - A comparative histopathological, immunological and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **J Med Vet Mycol**, **24(6):** 445-54, 1986.

---