

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

DAIANE CRISTINE MARTINS RONCHI

**SIMILARIDADES MORFOLÓGICAS ENTRE PLACENTAS DE GESTANTES
INFECTADAS POR ZIKA VÍRUS E HIV**

CURITIBA

2020

DAIANE CRISTINE MARTINS RONCHI

**SIMILARIDADES MORFOLÓGICAS ENTRE PLACENTAS DE GESTANTES
INFECTADAS POR ZIKA VÍRUS E HIV**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Escola de Medicina, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lucia de Noronha

CURITIBA

2020

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Sônia Maria Magalhães da Silva - CRB-9/1191

R769s
2020 Ronchi, Daiane Cristine Martins
Similaridades morfológicas entre placentas de gestantes infectadas por Zika vírus e HIV / Daiane Cristine Martins Ronchi ; orientador, Lucia de Noronha. – 2020.
43 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2020.
Bibliografia: f. 39-42

1. Zika vírus. 2. HIV (Vírus). 3. Placenta. 4. Transmissão vertical de doença infecciosa. 5. Saúde pública. I. Noronha, Lucia de. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD. 20. ed. – 610



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos 22 dias do mês de maio de 2020 às 13:30, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese “SIMILARIDADES MORFOLÓGICAS ENTRE PLACENTAS DE GESTANTES INFECTADAS POR ZIKA VÍRUS E HIV” apresentado por Daiane Cristine Martins Ronchi para obtenção do título de Doutor; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profa. Dra. Lúcia de Noronha - Presidente	
Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior (PUCPR)	
Prof. Dr. Roberto Hirochi Herai (PUCPR)	
Prof. Dr. Cleber Machado de Souza (UFPR)	
Prof. Sérgio Ossamu Ioshii (UFPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profa. Dra. Lúcia de Noronha	Conceito: APROVADA
Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior	Conceito: APROVADA
Prof. Dr. Roberto Hirochi Herai	Conceito: APROVADA
Prof. Dr. Cleber Machado de Souza	Conceito: APROVADA
Prof. Sérgio Ossamu Ioshii	Conceito: APROVADA

Parecer Final: **APROVADA**

Observações da Banca Examinadora:

Profa. Dra. Lúcia de Noronha
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

Dedico esse trabalho ao meu marido, Raphael
e aos meus filhos, Enzo e Olívia.
Vocês são meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Gratidão à Deus por ser calmaria nos momentos de tormenta, por me mostrar o caminho e não me deixar esquecer que todo sonho é possível.

À minha família, meu amor, marido e parceiro de vida Raphael, meu menino Enzo e minha pequenininha Olívia. Vocês são meu porto seguro, meu colo, meu apoio e minha alegria. Gratidão por entender minhas ausências, meus momentos ruins e compartilhar das alegrias. Eu não conseguiria se não fosse por vocês. Eu os amo tanto!

Aos meus pais, Pio e Cleusa, minha sogra Salete, minhas irmãs Liana e Josy, pelo amor, pelas palavras, por cuidarem de mim, pelo apoio, por me darem possibilidade de estudar e por segurarem as pontas com meus filhos quando precisei me ausentar.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Lucia de Noronha, além de ser uma orientadora excepcional, é um ser humano como poucos: empática, divertida e disposta. Minha gratidão pela paciência, por tantos ensinamentos, por me conduzir a levar o processo com leveza e, sobretudo, por me aceitar e acreditar em mim. Você é um exemplo!

À Mineia e Patrícia, minhas parceiras de lutas, escritas, apresentações, madrugadas, choros e muitas risadas. Vocês foram essenciais!

À equipe do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR e todos os pesquisadores envolvidos pela acolhida, por cada etapa realizada para que essa pesquisa acontecesse e por cuidarem com tanto carinho da Olívia nas reuniões.

À PUCPR por sempre me abrir as portas, por me permitir estudar em uma instituição de excelência. À Paula, secretária (e anjo) do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pelo carinho, esforço, auxílio e paciência. À CAPES/CNPQ pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização desse sonho.

Ao meu coordenador, Prof. Roberto Cepeda, por me permitir, compreender, incentivar e auxiliar a conciliar meu trabalho e o doutorado. Aos meus colegas de trabalho e meus alunos da Universidade Positivo por segurarem as pontas e entenderem quando precisei me ausentar.

Aos amigos que estão comigo em todos os momentos, pelas conversas, consolo, lágrimas, risos e todo amor.

A vocês toda a minha gratidão! Obrigada!

"Quem acredita sempre alcança."

(Renato Russo)

RESUMO

Introdução: O vírus zika (ZIKV) causou preocupação global devido à inesperada epidemia de infecção no Brasil, associada à microcefalia congênita e outras intercorrências gestacionais.

Objetivo: Analisar as alterações morfológicas e morfométricas de placentas de gestantes infectadas com ZIKV, em comparação com placentas de gestantes infectadas com HIV e com placentas de gestantes saudáveis sem alterações (grupo controle negativo).

Método: Este estudo descreve a análise morfométrica de placentas infectadas com ZIKV (ZIKV; n = 23), em comparação com o grupo controle negativo (N-controle; n = 23) e o grupo infectado com HIV (HIV; n = 23). Também analisou a relação entre as alterações morfométricas com as alterações patológicas na microscopia convencional, o tempo de infecção na gestante e a presença da Síndrome do Zika Congênito (CZS).

Resultados: Observou-se aumento significativo da área ($p = 0,020$) e do perímetro ($p = 0,031$), bem como um número maior de nós ($p = 0,002$), brotos ($p < 0,001$) e células de Hofbauer CD163+ ($p < 0,001$) no grupo ZIKV quando comparado ao grupo N-controle. As placentas com alterações patológicas na microscopia convencional apresentaram maior diâmetro ($p = 0,022$), perímetro ($p = 0,021$) e número de nós ($p = 0,010$), brotos ($p < 0,001$) e células de Hofbauer CD163+ ($p < 0,001$) quando comparadas à placenta sem alterações. Também foi observado aumento significativo do diâmetro ($p = 0,010$), área ($p = 0,010$) e perímetro ($p = 0,003$) das vilosidades, maior número de nós ($p = 0,005$), brotos ($p < 0,001$) e células de Hofbauer CD163+ ($p < 0,001$) no grupo que teve CZS. O grupo HIV teve uma área maior ($p < 0,001$), perímetro ($p < 0,001$), contagem de nós ($p = 0,049$), brotos ($p = 0,011$) e células de Hofbauer CD163+ ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo N-controle, demonstrando que as anormalidades morfométricas encontradas no grupo ZIKV e HIV são muito semelhantes.

Conclusões: Há aumento no tamanho das vilosidades e alterações na maturidade após a infecção pelo ZIKV durante a gravidez, e as mesmas alterações parecem ser descritas para placentas infectadas pelo HIV. Essas alterações podem ajudar a entender o aspecto da infecção pelo ZIKV relacionado a lesões na placenta e deficiências congênitas nos conceptos.

Palavras-chave: Zika vírus, HIV, transmissão vertical, placenta, análise morfométrica.

ABSTRACT

Background: Zika virus (ZIKV) caused global concern due to the unexpected epidemic of infection in Brazil, associated with congenital microcephaly and other gestational intercurrents.

Objective: To analyze the morphological and morphometric changes of placentas of pregnant women infected with ZIKV, in comparison with placentas of pregnant women infected with HIV and with placentas of healthy pregnant women without changes (negative control group).

Method: This report describes the morphometric analysis of ZIKV-infected placentas (ZIKV; n = 23), compared to the control non-infected group (N-control; n = 23) and HIV-infected group (HIV; n = 23). It also has analyzed the relationship between the morphometric changes with the pathological alterations on conventional microscopy, time of pregnant infection, and presence of the Congenital Zika Syndrome (CZS).

Results: There was a significant increase in area ($p = 0.020$) and perimeter ($p = 0.031$), as well as a larger number of nodes ($p = 0.002$), shoots ($p < 0.001$) and Hofbauer CD163 + cells ($p < 0.001$) in the ZIKV group when compared to the N-control group. Placentas with pathological changes in conventional microscopy showed a larger diameter ($p = 0.022$), perimeter ($p = 0.021$) and number of nodes ($p = 0.010$), shoots ($p < 0.001$) and Hofbauer CD163 + cells ($p < 0.001$) when compared to the placenta without changes. There was also a significant increase in diameter ($p = 0.010$), area ($p = 0.010$) and perimeter ($p = 0.003$) of the villi, greater number of nodes ($p = 0.005$), shoots ($p < 0.001$) and Hofbauer cells CD163 + ($p < 0.001$) in the group that had CZS. The HIV group had a larger area ($p < 0.001$), perimeter ($p < 0.001$), node count ($p = 0.049$), shoots ($p = 0.011$) and Hofbauer CD163 + cells ($p < 0.001$) when compared to the N group -control, demonstrating that the morphometric abnormalities found in the ZIKV and HIV group are very similar.

Conclusion: There is an increase in villus size and maturity alterations after ZIKV infection during pregnancy, and the same alterations seem to be described for HIV-infected placentas. These alterations may help to understand the aspect of ZIKV infection related to placental damage and congenital disabilities in the fetuses.

Keywords: Zika virus, HIV, vertical transmission, placenta, morphometric analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Arquitetura vilositária.....	16
Figura 2 - Placenta de gestante HIV positivo.....	19
Figura 3 - Desenho da amostra do grupo ZIKV.....	22
Figura 4 - <i>Scanner Axion Scan.Z1</i>	24
Figura 5 - <i>Software Image-Pro Plus® 4</i>	25
Figure 6 – Análise morfométrica de amostras placentárias de mulheres infectadas com ZIKV durante a gravidez em comparação ao grupo N-controle.....	30
Figure 7 - Diferenças na transmissão vertical entre ZIKV e HIV. Além disso, demonstra as diferenças morfométricas entre o grupo N-controle e o ZIKV e entre o grupo N-controle e o HIV, respectivamente.....	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - <i>Baseline</i> do grupo ZIKV.....	28
TABELA 2 - Mediana e valor de p dos dados morfométricos no primeiro, segundo e terceiro trimestre de gestação, presença de alterações patológicas da placenta e CZS.....	29
TABELA 3 - Mediana e valor de p dos dados morfométricos entre o grupo N-controle, o grupo HIV e o grupo ZIKV.....	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ZIKV	Zika vírus
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
CZS	Síndrome do Zika Congênito
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
IFN1	Proteína Interferon de tipo I humana
RNA	Ácido ribonucleico
SESA	Secretaria de Saúde do Paraná
LPE-PUCPR	Laboratório de Patologia Experimental - Pontifícia Universidade Católica
IHQ	Imuno-histoquímica
CHC-UFPR	Complexo Hospital de Clínicas - Universidade Federal do Paraná
TORCH	Toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus e herpes simples
HE	Hematoxilina-eosina
MPF	Campo de médio aumento
PAS	Ácido periódico de Schiff
µm/µm ²	Micrômetros/Micrômetros quadrados

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	ZIKA VÍRUS.....	13
1.1.1	Histórico	13
1.1.2	Epidemiologia	13
1.1.3	Estrutura, transmissão e sintomatologia	14
1.2	PLACENTA.....	15
1.3	ZIKV E PLACENTA	17
1.4	HIV E PLACENTA	18
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	20
3	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVO GERAL.....	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1	AMOSTRA.....	22
4.2	ANÁLISE MORFOMÉTRICA	24
4.2.1	Perímetro, diâmetro e área da vilosidade	25
4.2.2	Número de nós e brotos sinciciais e contagem do número de vilosidades por campo	26
4.3	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	26
4.3.1	Número de vilosidades por campo e de células de Hofbauer CD163+	26
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5	RESULTADOS	28
6	DISCUSSÃO	34
6.1	ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS.....	34
6.2	TRIMESTRE DE INFECÇÃO POR ZIKV	35
6.3	ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS.....	35
6.4	SÍNDROME DO ZIKA CONGÊNITO	36
6.5	PLACENTAS INFECTADAS COM HIV E ZIKV	36
7	CONCLUSÕES	38
7.1	CONCLUSÃO GERAL.....	38
7.2	CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	38
	REFERÊNCIAS	39
8	APÊNDICE - ARTIGO SUBMETIDO NO AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY (AJOG)	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 ZIKA VÍRUS

1.1.1 Histórico

O Zika Vírus (ZIKV) foi identificado no sangue de macacos *Rhesus* na Floresta de Zika, Uganda, em 1947, e o primeiro relato de manifestações clínicas ocorreu incidentalmente em uma epidemia de icterícia em Afikpo, Nigéria, em 1954 (DICK, 1952; NORONHA *et al.*, 2016; DICK, 1952).

Após décadas de confinamento na África e na Ásia, a primeira grande epidemia causada pelo ZIKV foi registrado na Polinésia Francesa em 2013, identificando aumento na incidência de microcefalia e outras anormalidades cerebrais congênitas durante o período de infecção ativa (CAO-LOMÉNAU *et al.*, 2014; SOLOMON *et al.*, 2016).

Em 2015, foi registrada uma séria epidemia de ZIKV em Camaçari - Bahia, Brasil, seguida de doença similar em outros cinco estados vizinhos levando o Ministério da Saúde a notificar um alerta de ZIKV em abril do mesmo ano. Ao final de 2015, o vírus havia se espalhado por 19 estados, principalmente do nordeste brasileiro, revelando correlação forte entre a infecção viral por ZIKV com malformações cerebrais congênitas, incluindo a microcefalia, conforme encontrado anteriormente na Polinésia Francesa (HUGHES *et al.*, 2016; OLIVEIRA MELO *et al.*, 2016).

A transmissão autóctone do ZIKV é tipicamente feita pelos mosquitos do gênero *Aedes*, comprovada em 2015 no estado do Paraná, após recebimento de espécimes de soros de fase aguda de pacientes que apresentaram uma “síndrome-*like*” na cidade de Natal, Rio Grande do Norte. Uma hipótese aceitável seria de que o vírus foi trazido para o Brasil durante a Copa do Mundo de 2014 (SOLOMON *et al.*, 2016; ZANLUCA *et al.*, 2015).

1.1.2 Epidemiologia

No Brasil início de 2015, vários casos de pacientes que apresentam sintomas de dengue chamaram a atenção de infectologistas na região Nordeste do Brasil.

Embora todos os pacientes viviam em uma área endêmica de dengue, o diagnóstico da dengue resultou negativo. Os resultados de RT-PCR de soros dos pacientes revelaram a infecção autóctone do ZIKV no país pela primeira vez (BORDIGNON *et al.*, 2008; ZANLUCA *et al.*, 2015). A partir deste período, o Brasil registrou aumento dos casos e o ZIKV se espalhou rapidamente para outros países da América do Sul e da América Central (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; PAHO/WHO, 2016).

A partir de outubro de 2015, observou-se uma incidência incomum de microcefalia em recém-nascidos de mulheres que descreviam sintomas compatíveis com ZIKV na região nordeste do país. Em janeiro de 2016, já eram mais de 3.500 casos suspeitos de microcefalia relacionada ao ZIKV, um aumento de mais de 20 vezes em comparação com a média histórica dos últimos cinco anos, o que indica uma possível associação entre a infecção pelo ZIKV na gravidez e malformações fetais (BHATNAGAR *et al.*, 2017). Além disso, 46 casos suspeitos de morte fetal/neonatal por microcefalia relacionada ao ZIKV foram notificados às autoridades de saúde brasileiras (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Entre 2015 e 2019 o MS foi notificado sobre 18.578 casos suspeitos de alterações no crescimento e desenvolvimento possivelmente relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, sendo que dentre os casos com investigação concluída, 3.496 (18,8%) foram confirmados (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

1.1.3 Estrutura, transmissão e sintomatologia

O ZIKV é um membro da família *Flaviridae*, pertencente da mesma família do vírus da dengue, Chikungunya, febre amarela, vírus oeste do Nilo e vírus da encefalite japonesa. Os flavivírus são vírus artrópodes de cadeia simples de RNA de sentido positivo, que causa infecções em humanos que variam desde febre baixa a hemorrágica e manifestações encefálicas (NEU *et al.*, 2015; NORONHA *et al.*, 2016).

A transmissão ocorre tipicamente mediada pelo seu vetor, o mosquito *Aedes Aegypti*, porém o ZIKV também pode ser transmitido por via placentária, sexualmente ou por transfusão, sendo detectado na urina, na saliva e no leite materno (AYRES, 2016; SOLOMON *et al.*, 2016). O período de incubação do vírus ocorre entre 3 e 12 dias e os sintomas podem durar de 2 a 7 dias, sendo que ainda não há tratamento específico ou vacina (HUGHES, 2016).

A prevenção da transmissão do vírus se dá, principalmente, pelo controle de criadouros do mosquito vetor e ações ativas na população de uso de roupas claras que cubram a maior parte do corpo, repelentes, redes protetoras e inseticidas que contém DEET, bem como uso de preservativos ou abolição da atividade sexual para prevenir transmissão sexual ou placentária (OEHLER *et al.*, 2014).

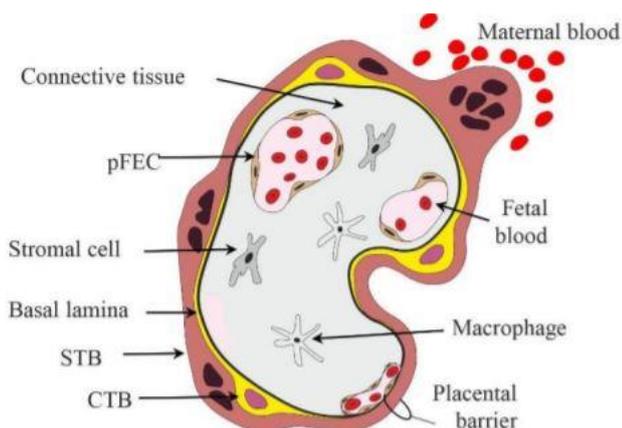
Indivíduos infectados com ZIKV apresentaram febre aguda, sintomaticamente similar à dengue, sendo caracterizada por cefaleia leve, febre, *rash* maculopapular, mialgia, dor articular e nas costas, bem como mal-estar geral. Estes sintomas, às vezes, são acompanhados de hiperemia conjuntiva, anorexia, tontura, diarreia e constipação (SOLOMON *et al.*, 2016; HUGHES *et al.*, 2016). Mortes por infecção aguda são raras, porém o ZIKV tem sido associado à síndrome de Guillain-Barré (SGB), podendo levar à paralisia e morte (OEHLER *et al.*, 2014).

1.2 PLACENTA

Os meios pelos quais os vírus podem ser transmitidos verticalmente são diversos e podem envolver a entrada no saco gestacional através da propagação hematogênica direta, invasão transcolunar ou paracelular trofoblástica, transporte dentro de células imunes ou por espermatozoides infectados, colonização uterina pré-gravidez, inoculação durante procedimentos invasivos durante a gravidez e/ou infecção transvaginal ascendente (LUO *et al.*, 2018).

A placenta é constituída por populações de células de trofoblasto primário indiferenciado e de sinciotrofoblasto diferenciado, que atuam como uma barreira entre a mãe e o feto (LUO *et al.*, 2018; SHERIDAN *et al.*, 2017; CAO *et al.*; 2017). Assim, cada vilo placentário é revestido por trofoblastos, que envolvem o suprimento sanguíneo fetal e os macrófagos placentários, as células Hofbauer (FIGURA 1).

Desta forma, a placenta possui mecanismos de defesa físicos e imunológicos que apresentam eficácia distinta em cada período da gestação, pois a síntese proteica placentária se altera durante a gestação, de forma que as células do trofoblasto a termo são refratárias à infecção por ZIKV (LUO *et al.*, 2018; SHERIDAN *et al.*, 2017; CAO *et al.*; 2017).



Fonte: Estela Bevilacqua - Laboratório de Estudos da Biologia do Trofoblasto - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

Figura 1 - Arquitetura vilositária representando: **Connective tissue* - tecido conectivo; **pFEC* - capilar fetal; **Stroma cell* - fibroblasto; **Basal lamina* - membrana basal; **STB* - sinciciotrofoblasto; **CTB* - citotrofoblasto; **Maternal blood* - sangue materno; **Fetal blood* - sangue fetal; **Macrophage* - macrófagos (células de Hofbauer); **Placental barrier* - barreira placentária.

A decídua basal, primeira zona de contato entre o útero e a placenta adjacente, desenvolve-se à medida que as células placentárias de citotrofoblasto invadem a parede uterina e remodelam os vasos sanguíneos (TABATA *et al.*, 2016). A decídua parietal oposta, segunda zona de contato entre o útero e as membranas fetais, constitui uma superfície consideravelmente maior, onde as zonas materna e fetal permanecem em contato desde a metade da gestação até o parto (TABATA *et al.*, 2016).

Os sinciciotrofoblastos mostraram-se resistentes à infecção por uma ampla gama de vírus (QUICKE *et al.*, 2016). Um estudo recente mostrou que os sinciciotrofoblastos também parecem ser resistentes à infecção por cepas histológicas filogeneticamente relacionadas ao ZIKV nos primeiros tempos após a infecção (QUICKE *et al.*, 2016).

Para a defesa ante a transmissão de patógenos por via vertical, se destacam a autofagia e os microRNAs específicos da placenta, além dos monócitos, os quais são um importante tipo de célula imune inata, alvo de muitos flavivírus, que exibem respostas inatas de citocinas sobre a infecção (CAO *et al.*, 2017; LUO *et al.*, 2018).

Os macrófagos de Hofbauer são programados para limitar a inflamação após a infecção por vírus, um mecanismo consistente com o ambiente tolerante à

imunodeficiência da placenta e que apoiaria uma maior infecção de macrófagos fetais em comparação com os maternos ((CAO *et al.*, 2017). Vários estudos confirmaram que estas células são alvos de infecção viral *in vivo* e *in vitro*, sendo as únicas células positivas para ZIKV (QUICKE *et al.*, 2016; SCHWARTZ, 2017).

As células do trofoblasto secretam a proteína Interferon de tipo I humana (IFN1), que regulam genes e protegem as demais células trofoblásticas e não trofoblásticas da infecção pelo ZIKV, atuando de forma parácrina e autócrina, além de estimular a imunidade adaptativa e promover inflamação (LUO *et al.*, 2018).

Entretanto, mesmo possuindo mecanismos de defesa a placenta pode ser infectada (SHERIDAN *et al.*, 2017; LUO *et al.*, 2018). O ácido ribonucleico (RNA) do ZIKV foi identificado no líquido amniótico de mães cujos fetos tinham anormalidades cerebrais detectadas pela ultrassonografia. Antígenos e RNA virais também foram identificados no tecido cerebral e nas placentas de crianças que nasceram com microcefalia e morreram logo após o nascimento, bem como nos tecidos de abortos espontâneos (SCHWARTZ, 2017).

1.3 ZIKV E PLACENTA

Recentemente, o ZIKV causou uma preocupação global devido à epidemia inesperada de infecção no Brasil, associada à malformações fetais, como: microcefalia congênita (perímetro cefálico < 3 percentil para idade gestacional e sexo), lisencefalia, hipoplasia cerebelar, hidrocefalia, polimicrogiria, desenvolvimento anormal do corpo caloso, alterações na migração neuronal e calcificações subcorticais que configuram síndrome do zika congênito (CZS) (NEU *et al.*, 2015; NORONHA *et al.*, 2016; AYRES, 2016; SOLOMON *et al.*, 2016; HUGHES *et al.*, 2016; BRASIL *et al.*, 2016; MELO *et al.*, 2016; SCHULER-FACCINI *et al.*, 2015).

Além disso, podem haver outras intercorrências gestacionais, incluindo abortos, sendo que ambos parecem ser mais comuns quando a infecção por ZIKV ocorre no primeiro trimestre de gestação; enquanto, em caso de infecção no terceiro trimestre, não foram descritos casos de neonatos com alterações morfológicas cerebrais, sugerindo que o desenvolvimento anormal do cérebro, na presença do ZIKV, ocorre na organogênese (PETERSEN *et al.*, 2016; BHATNAGAR *et al.*, 2017).

As vilosidades coriônicas são consideradas a pele da placenta, fazendo a interface primária entre os componentes do sangue materno com a circulação fetal

(SOUZA *et al.*, 2016). Sendo assim, achados de estudos demonstram que, possivelmente, a infecção direta e a replicação do ZIKV, pode provocar sequelas nos embriões e que, sua via de entrada, pode ser as células de Hofbauer (macrófago placentário) das vilosidades coriônicas (PETERSEN *et al.*, 2016).

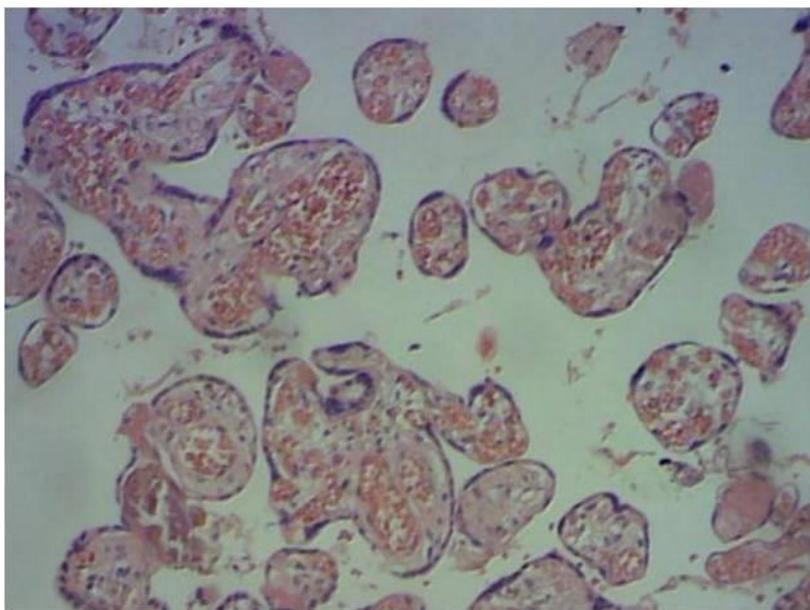
A placenta infectada com ZIKV apresenta alterações de maturação vilositária e indícios de processo inflamatório, os quais poderiam cursar com danos às vilosidades coriônicas tais como calcificação, necrose, esclerose da geleia de Wharton, espessamento da membrana basal citotrofoblástica, deposição de fibrina, hiperplasia de células de Hofbauer, alterações vasculares, truncamento das colunas do trofoblasto invasivo e conseqüente alterações no tamanho e maturidade das vilosidades (BHATNAGAR *et al.*, 2012; TABATA *et al.*, 2016; RABELO *et al.*, 2017; ZARE MEHRIARDI, SHOBEIRIAN, 2017).

1.4 HIV E PLACENTA

Na análise de placentas de gestantes HIV positivo, foram observadas alterações no diâmetro e no perímetro das vilosidades, que sugeriam alterações em sua maturação e podendo ter sido causadas pela própria infecção viral e / ou até uso de drogas antirretrovirais; ou seja, a placenta tende a apresentar vilosidades menores em relação a placentas de gestantes soronegativas (BAURAKIADES *et al.*, 2011) (FIGURA 2).

Estas placentas apresentaram reações positivas em algumas células citotrofoblásticas e células Hofbauer e, quando placentas humanas infectadas com o HIV *in utero* ou *in vitro* foram analisadas por PCR, o vírus HIV-1 foi encontrado distribuído principalmente em sincício trofoblastos e células Hofbauer (BAURAKIADES *et al.*, 2011; SHEIKH *et al.*, 2000).

Em alguns estudos foram detectadas sequências de HIV-1 em vilosidades coriônicas e trofoblastos em todas as placentas analisadas, indicando que as sequências do vírus estão sempre presentes nas placentas dessas mulheres, mesmo na ausência de alterações morfológicas e expressão imuno-histoquímica característica do HIV (MATTERN *et al.*, 1992; MENU *et al.*, 1999).



Fonte: BAURAKIADES *et al.*, 2011.

Figura 2 - Placenta de mulher de 23 anos, HIV positivo, sem sinais de vilite e com dismaturidade vilosa. Não houve transmissão vertical do HIV. O conceito nasceu a termo, sem malformações congênitas e com APGAR 9/10.

Embora o HIV não seja um flavivírus, quando infecta a placenta é possível observar alterações similares com as de placentas infectadas com ZIKV. Em vista disso, o principal alvo do HIV são os linfócitos T CD4, mas outras células portadoras de receptores CD4 e quimiocina também são infectadas, incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas, onde estão incluídas as células Hofbauer (MAARTENS *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2017).

Sendo assim, tanto o HIV como o ZIKV parecem ter alterações histopatológicas placentárias muito semelhantes, e ambos podem infectar as células Hofbauer, causando lesões na interface primária entre o sangue materno e a circulação fetal.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A placenta infectada com ZIKV apresenta alterações de maturação vilositária e indícios de processo inflamatório, os quais poderiam cursar com danos às vilosidades coriônicas tais como calcificação, necrose, esclerose da geleia de Wharton, espessamento da membrana basal citotrofoblática, deposição de fibrina, hiperplasia de células de Hofbauer, alterações vasculares, truncamento das colunas do trofoblasto invasivo e, conseqüentemente, alterações no tamanho e maturidade das vilosidades (BHATNAGAR *et al.*, 2012; TABATA *et al.*, 2016; RABELO *et al.*, 2017; ZARE MEHRIARDI, SHOBEIRIAN, 2017).

Assim como o ZIKV, o HIV também tem sido associado ao aborto, natimortos, parto prematuro e outras intercorrências gestacionais, mas não à síndrome congênita. No entanto, os efeitos do HIV nas placentas permanecem pouco compreendidos.

Algumas das alterações descritas incluem corioamnionite e deciduíte, aumento do número de nós e brotos sinciciais, distúrbios estromais como deposição de fibrina e fibrose, anormalidades na maturação e infarto das vilosidades. Outros autores descreveram placentas infectadas pelo HIV sem alterações patológicas na microscopia convencional. Por outro lado, as técnicas morfométricas geralmente mostram alterações no diâmetro e perímetro das vilosidades, sugerindo alterações na maturação (BAURAKIADES *et al.*, 2011; LÓPES *et al.*, 2013; OBIMBO *et al.*, 2019).

Assim, o presente estudo teve como objetivo analisar as alterações morfológicas e morfométricas nas placentas infectadas pelo ZIKV e comparar essas alterações às encontradas nas placentas infectadas pelo HIV, considerando a idade gestacional, a presença de CZS e as alterações patológicas na microscopia convencional como variáveis. Além disso, este estudo também compara os dois grupos (grupo ZIKV e placenta infectada pelo HIV) com um grupo controle de placenta não infectada.

A hipótese deste estudo se refere ao fato de que a presença do ZIKV na vilosidade placentária poderia ser o evento causador de anormalidades de tamanho e maturação das mesmas sem ser acompanhada de vilite aguda ou crônica como outras infecções crônicas intrauterinas (TORCH). Além disso, estas alterações poderiam ser muito semelhantes à outras infecções virais que não cursam com vilite como o HIV.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as alterações morfológicas e morfométricas de placentas de gestantes infectadas com ZIKV, em comparação com placentas de gestantes infectadas com HIV e com placentas de gestantes saudáveis sem alterações (grupo controle negativo).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar a relação entre as alterações morfológicas e morfométricas com as alterações patológicas na microscopia convencional;
2. Analisar a relação entre as alterações morfológicas e morfométricas com o tempo de infecção na gestante;
3. Analisar a relação entre as alterações morfológicas e morfométricas com a presença da CZS no recém-nascido.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Experimentação Humana e pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), sob o número CAAE: 42481115.7.0000.5248.

O grupo de placentas de gestantes infectada pelo ZIKV (grupo ZIKV) foi selecionado em uma população de 331 gestantes que apresentaram sintomas compatíveis com a infecção pelo ZIKV, assistidos pelas unidades de saúde pública do Estado do Paraná entre 2015 e 2016. Trinta e nove mulheres tiveram a infecção pelo ZIKV confirmada por RT-PCR. Dos casos positivos, dois tiveram abortos espontâneos e os 37 restantes foram monitorados durante a gravidez até o parto que ocorreu entre 34 e 38 semanas gestacionais (FIGURA 3).

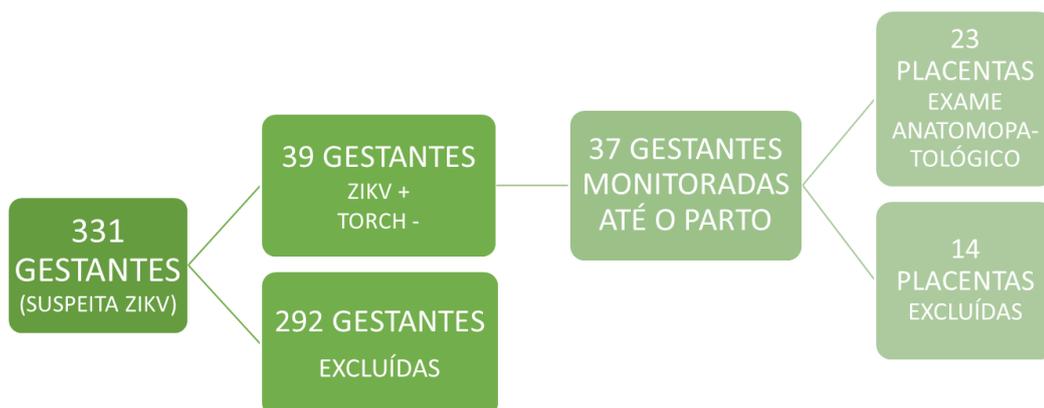


Figura 3 - Desenho da amostra do grupo ZIKV, representando o acompanhamento das gestantes com suspeita de infecção por ZIKV e o número de placentas que foram para exame anatomopatológico.

A condição clínica dos recém-nascidos foi avaliada e eles ainda são acompanhados pela Secretaria de Saúde do Paraná (SESA). Das 37 gestantes restantes, 23 tiveram amostras de placenta enviadas para análise anatomopatológica. Fragmentos do tecido placentário foram coletados imediatamente após o parto, congelados e enviados para análise molecular para confirmar o ZIKV no RT-PCR (FIGURA 3) (NORONHA *et al.*, 2018).

As variáveis clínico-patológicas consideradas neste estudo foram: idade gestacional, presença de CZS e alterações patológicas na microscopia convencional por um patologista pediátrico.

As placentas das 23 gestantes positivas para ZIKV incluídas neste estudo foram fixadas em formalina e embedidas em parafina (*Formalin Fixed Paraffin Embedded* - FFPE) e analisadas no Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (LPE-PUCPR). Todas as placentas foram submetidas à análise imuno-histoquímica (IHQ) para verificar presença de infecção por ZIKV e 10 delas foram positivas, sendo que a infecção por ZIKV nas gestantes ocorreu no primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional. As placentas incluídas neste estudo têm pelo menos dois testes positivos para infecção por ZIKV, como RT-PCR positivo no sangue e na placenta, ou RT-PCR positivo no sangue e na urina ou até imuno-histoquímico positivo na placenta (NORONHA *et al.*, 2018).

O grupo controle negativo das placentas não infectadas (grupo N-controle) foi selecionado em uma população de gestantes que deram à luz no Complexo de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR), que tiveram pré-natal sem comorbidades. Elas deram à luz recém-nascidos considerados saudáveis, entre 34 e 38 semanas gestacionais, de 2004 a 2005, quando o ZIKV não estava circulando no Brasil. Todas as mulheres grávidas foram testadas para infecções intrauterinas congênitas (TORCH) com resultados negativos. As placentas não apresentaram alterações anatomopatológicas (n = 23). As gestantes e os recém-nascidos foram acompanhados até a alta hospitalar. As placentas desse grupo foram FFPE e analisadas no LPE-PUCPR (BAURAKIADES *et al.*, 2011).

O grupo das placentas de gestantes infectadas pelo HIV (grupo HIV) consistia em placentas HIV-positivas de gestantes que deram à luz no CHC-UFPR, que não tiveram outras comorbidades. As gestantes deram à luz recém-nascidos considerados saudáveis, entre 34 semanas e 38 semanas de gestação em 2004 e 2005, quando o ZIKV ainda não circulava no Brasil. Essas mulheres foram submetidas a exames laboratoriais para infecções intrauterinas congênitas (TORCH) com resultados negativos (n = 23). Os recém-nascidos foram acompanhados até que sua condição de infecção pelo HIV fosse definida como negativa. As placentas deste grupo foram FFPE e analisadas no LPE-PUCPR (BAURAKIADES *et al.*, 2011).

4.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Cortes histológicos de todas as placentas foram corados com Hematoxilina-eosina (HE) para avaliar o perímetro, diâmetro e área das vilosidades, número de brotos, nós sinciciais e número de vilosidades por campo. As seções de HE foram fotografadas com uma ampliação de 200 vezes (MPF - campo de médio aumento) usando o *scanner Axion Scan.Z1* (FIGURA 4), gerando em torno de 5.000 imagens.

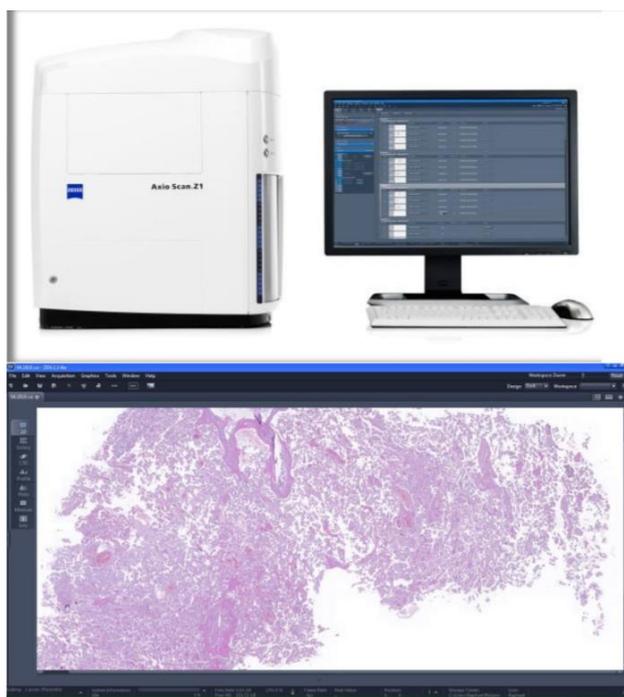


Figura 4 - *Scanner Axion Scan.Z1*: microscópio de varredura de lâmina automatizado que cria slides virtuais de alta qualidade e captura imagens fluorescentes com alto rendimento, organizados em um banco de dados baseado na web para visualização e compartilhamento dos dados (Manual Zeiss Microscopy).

Entre as imagens feitas, foram excluídas aquelas que não foram focalizadas ou com artefatos, além daquelas com tecido não-viloso (membranas, cordão, decídua). As imagens restantes selecionadas, cerca de 1.000, tinham 100% do campo ocupado por vilosidades placentárias e foram randomizadas para obter cerca de 100 imagens para cada caso dos três grupos de estudo.

4.2.1 Perímetro, diâmetro e área da vilosidade

As medidas do perímetro, do menor diâmetro e da área das vilosidades foram realizadas utilizando o *software Image-Pro Plus*® 4. Os desenhos foram feitos a mão livre em 100 vilosidades em imagens consecutivas (FIGURA 5), sendo que após medir essas 100 vilosidades, as demais imagens foram descartadas.

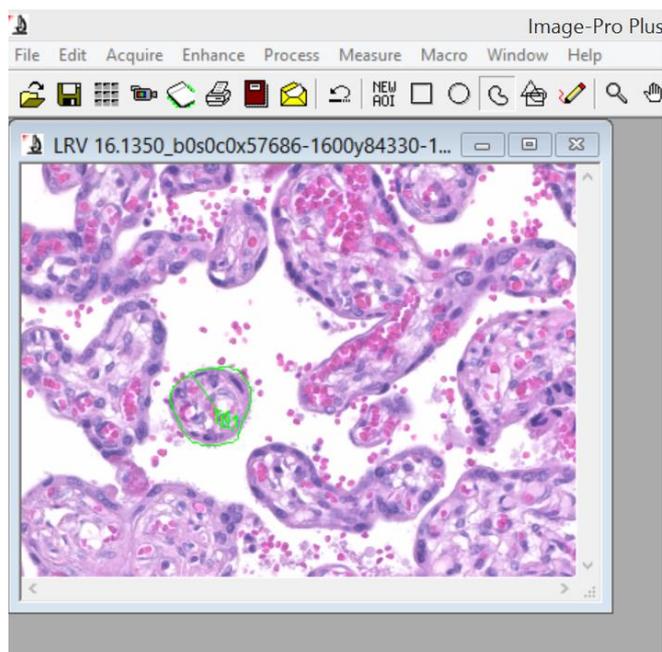


Figura 5 - *Software Image-Pro Plus*® 4: *software* de análise de imagens usado para contagem automatizada (Manual *Image-Pro Plus*® 4, *Media Cybernetics*, Silver Spring, EUA)

No final do contorno de cada vilosidade, o programa forneceu dados de perímetro, diâmetro (maior e menor), área e outras medições em micrômetros quadrados ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$). Os dados foram exportados diretamente para uma planilha do *Microsoft Excel*® e organizados por caso de cada uma das 23 placentas dos três grupos. Para a análise estatística, foram utilizados o menor diâmetro, perímetro e área (BAURAKIADES *et al.*, 2011).

4.2.2 Número de nós e brotos sinciciais e contagem do número de vilosidades por campo

Para avaliar os nós e brotos sinciciais, foram utilizadas as mesmas 100 imagens em HE, previamente escolhidas. Em seguida, foram utilizadas 30 imagens de cada uma das 23 placentas dos três grupos e submetidas à contagem simples dessas duas estruturas microscópicas (nós e brotos sinciciais), bem como à contagem do número de vilosidades por campo (NORONHA *et al.*, 2018).

4.3 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

As secções histológicas das placentas foram fixadas em lâminas de vidro com carga elétrica e subsequentemente desparafinadas com xilol aquecido (37°C), desidratadas com banhos sucessivos de álcool etílico absoluto e em solução com concentrações decrescentes e reidratadas com água.

Álcool metílico e peróxido de hidrogênio foram utilizados no primeiro bloqueio da peroxidase endógena e água destilada e peróxido de hidrogênio no segundo bloco. Foram incubados com anticorpo primário anti-CD163 (*Invitrogen*, Carlsbad, EUA) por uma hora e com anticorpo secundário associado ao polímero de dextrano (*Spring Bioscience*, Pleasanton, EUA) por 30 minutos.

Para o desenvolvimento, o complexo DAB/substrato (*DAB, DakoCytomation*) foi adicionado às lâminas, seguido de contracoloração com hematoxilina de Mayer, desidratados com banhos de álcool etílico em concentrações crescentes, clarificação com xilol e mistura com *Canada Balsam*. O protocolo desenvolvido e descrito acima já está padronizado no serviço do LPE-PUCPR (NORONHA *et al.*, 2018).

4.3.1 Número de vilosidades por campo e de células de Hofbauer CD163+

Para quantificar o número de vilosidades e as células de Hofbauer CD163+ foram analisados 30 campos de grande aumento (400x) e foi realizada contagem simples dessas estruturas microscópicas das 23 placentas de cada um dos três grupos do estudo.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram descritos por médias, desvios-padrão, medianas, valores mínimos e máximos. O teste t de *Student* para amostras independentes ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney, quando apropriado, foram utilizados para a comparação dos grupos. O teste de Shapiro-Wilk avaliou a condição de normalidade. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados no software *Stata/SE v.14.1, StataCorpLP, EUA*.

5 RESULTADOS

Este estudo descreve a análise de variáveis comparadas entre os grupos ZIKV, HIV e N-controle. O grupo ZIKV foi comparado pelo tempo de infecção (trimestre gestacional), presença de alterações patológicas nas placentas na microscopia convencional e presença de CZS (Tabela 1).

TABELA 1 - *Baseline* do grupo ZIKV

Trimestre Gestacional	Características patológicas na microscopia convencional	Síndrome do Zika Congênito	Idade gestacional e desfecho
Primeiro trimestre (1-13 semanas)	Agenesia da artéria umbilical	Sim - microcefalia	Prematuro/Vivo (36s)
	Sem alterações patológicas	Não	A termo/Vivo
	Imaturidade vilositária	Sim - microcefalia	A termo/Óbito perinatal (20h)
	Sem alterações patológicas	Não	A termo/Vivo
Segundo trimestre (14-26 semanas)	Sem alterações patológicas	Não	A termo/Vivo
	Sem alterações patológicas	Não	A termo/Vivo
	Sem alterações patológicas	Não	A termo/Vivo
	Funisite aguda leve	Não	A termo/Vivo
	Sem alterações patológicas	Sim - Espinha bífida	A termo/Vivo
	Sem alterações patológicas	Não	A termo/Vivo
	Sem alterações patológicas	Não	A termo/Vivo
	Imaturidade vilositária	Não	A termo/Vivo
Terceiro trimestre (27-40 semanas)	Sem alterações patológicas	Não	A termo/Vivo
	Imaturidade vilositária	Não	A termo/Vivo
	Sem alterações patológicas	Não	A termo/Vivo
	Sem alterações patológicas	Não	A termo/Vivo
	Sem alterações patológicas	Não	A termo/Vivo
	Sem alterações patológicas	Não	A termo/Vivo
Trimestre desconhecido	Sem alterações patológicas	Sim - Hicrocefalia	Prematuro/Vivo (34s)
	Imaturidade vilositária	Sim(?)	A termo/Natimorto
	Imaturidade vilositária	Sim - Encefalocele	A termo/Óbito após 1 mês
	Imaturidade vilositária	Sim - microcefalia	A termo/Natimorto
	Sem alterações patológicas	Sim - Hicrocefalia	Prematuro/Vivo (34s)

Legenda: * caso não considerado para análise morfométrica devido à artefatos de fixação. (?) descrição de alteração congênita não disponível.

A análise da área ($p = 0,020$), do perímetro ($p = 0,031$) e do número de nós ($p = 0,002$), brotos ($p < 0,001$) e células de Hofbauer CD163+ ($p < 0,001$) no grupo ZIKV demonstrou imaturidade das vilosidades coriônicas, maior número de nós e brotos e hiperplasia das células de Hofbauer quando comparadas ao grupo N-controle ($p < 0,05$). No entanto, o diâmetro ($p > 0,05$) não mostrou diferença entre o grupo ZIKV quando comparado ao grupo N-controle (Tabela 2; Figura 6 e 7).

TABELA 2 - Mediana e valor de p dos dados morfométricos no primeiro, segundo e terceiro trimestre de gestação, presença de alterações patológicas da placenta e CZS.

VARIÁVEL	GRUPO ZIKV VS N-CONTROLE		TRIMESTRE GESTACIONAL DE INFECÇÃO			ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS DE PLACENTA NA MICROSCOPIA CONVENCIONAL		SÍNDROME DO ZIKA CONGÊNITO	
	ZIKV	N-CONTROLE	Primeiro	Segundo	Terceiro	Não	Sim	Não	Sim
Diâmetro (μm)	40,5 (57,7-29,1)	37,6 (43,4-30,4)	38,3 (46,3-29,1)	40,2 (45,3-32,1)	39,8 (44,6-29,1)	40,1 (50,6-29,1)	44,9 (57,7-36,6)	40,0 (45,3-29,1)	45,5 (57,7-36,6)
	NS		NS			0,0226		0,0109	
Área (μm^2)	2242 (4354-1229)	1867 (2496-1314)	1812,9 (3536,9-1228,8)	2119,4 (2927,2-1377,9)	2241,8 (2917,7-1527,3)	2165,1 (3671,2-1228,8)	2907,4 (4354,4-1673,3)	2119,4 (2927,2-1228,8)	2897,1 (4354,4-1673,3)
	0,020		NS			NS		0,0102	
Perímetro (μm)	189 (478-142)	174 (219-148)	174,2 (237,2-142,2)	182,1 (477,7-163,2)	186,2 (203,8-154,3)	181,2 (477,7-142,2)	208,9 (257,6-163,2)	180,3 (477,7-142,2)	214,0 (257,6-176,9)
	0,031		0,0292*			0,0212		0,0035	
Número de nós/vilosidade	9,9 (15,5-3,5)	6,9 (11,7-4,2)	9,9 (11,6-7,9)	11,1 (14,3-9,3)	8,6 (15,5-4,7)	9,8 (15,5-4,7)	10,2 (11,6-3,5)	10,1 (15,5-4,7)	9,8 (11,6-3,5)
	0,002		0,0062**			0,0101		0,0054	
Número de brotos/vilosidade	2,3 (3,3-1,4)	0,9 (1,9-0,3)	1,9 (3,2-1,6)	2,4 (3,1-1,4)	2,1 (2,6-1,8)	2,4 (3,2-1,6)	2,0 (3,3-1,4)	2,2 (3,2-1,4)	2,8 (3,3-1,7)
	<0,001		<0,0001***			<0,0001		<0,0001	
Número de células de Hofbauer CD163+/vilosidade	2,1 (4,4-1,3)	0,6 (1,0-0,1)	2,7 (3,3-2,0)	2,2 (2,3-1,7)	1,9 (2,3-1,7)	2,0 (2,4-1,3)	2,5 (4,4-1,7)	2,0 (2,4-1,3)	2,8 (4,4-1,4)
	<0,001		<0,0001****			<0,0001		<0,0001	

Legenda: NS - valor de p não significativo. * Valor de p refere-se ao segundo trimestre vs. grupo N-controle. ** Valor de p refere-se ao segundo trimestre vs. grupo N-controle. *** O valor de p refere-se à seguinte comparação: terceiro trimestre vs. grupo N-controle; primeiro vs. terceiro trimestre; segundo trimestre vs. o terceiro trimestre. **** O valor de p refere-se à seguinte comparação: terceiro trimestre vs. grupo N-controle; primeiro vs. o segundo trimestre; primeiro vs. o terceiro trimestre. Teste t de *Student* para amostras independentes (diâmetro, área e brotos) ou teste não paramétrico de Mann-Whitney (perímetro, nós e células de Hofbauer CD163+/vilosidades); valor de $p < 0,05$.

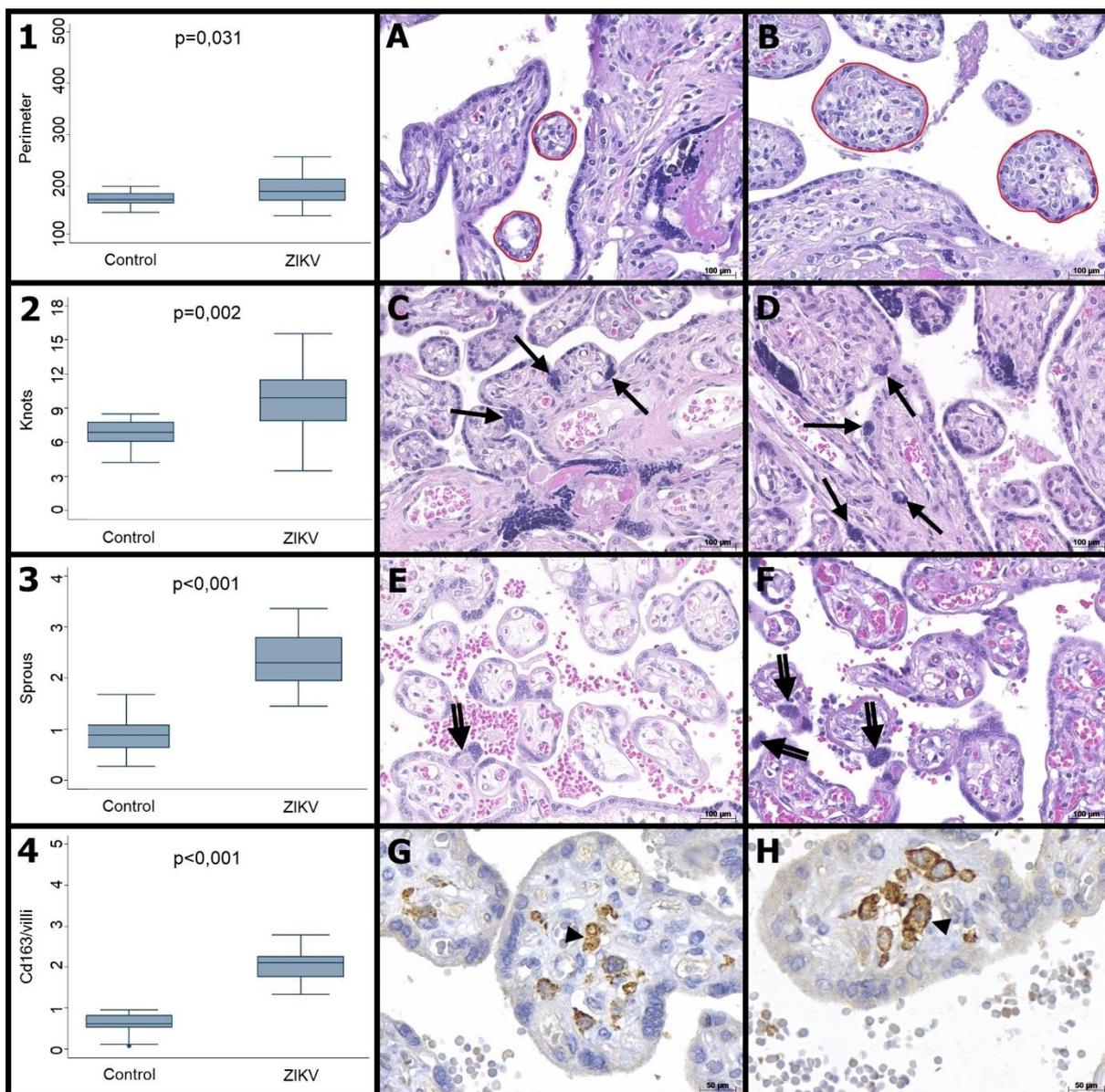


FIGURA 6: Análise morfométrica de amostras placentárias de mulheres infectadas com ZIKV durante a gravidez em comparação ao grupo N-controle. (1) O perímetro das vilosidades (2) Número de nós/vilosidades. (3) O número de brotos/vilosidades. (4) O número de células de Hofbauer CD163+. Fotomicrografia de uma amostra placentária corada com HE mostrando: perímetro das vilosidades (desenho à mão livre em vermelho) no grupo N-controle (A) e no grupo ZIKV (B); número de nós/vilosidades sincitais (setas) no grupo N-controle (C) e no grupo ZIKV (D); número de brotos/vilosidades (setas duplas) no grupo N-controle (E) e no grupo ZIKV (F). Ampliação original: 200x. Barras de escala: 100 μm . Fotomicrografia de imunocoloração com CD163 destacando a célula Hofbauer (ponta de seta) no grupo N-controle (G) e no grupo ZIKV (H). Ampliação original: 400x. Barras de escala: 50 μm .

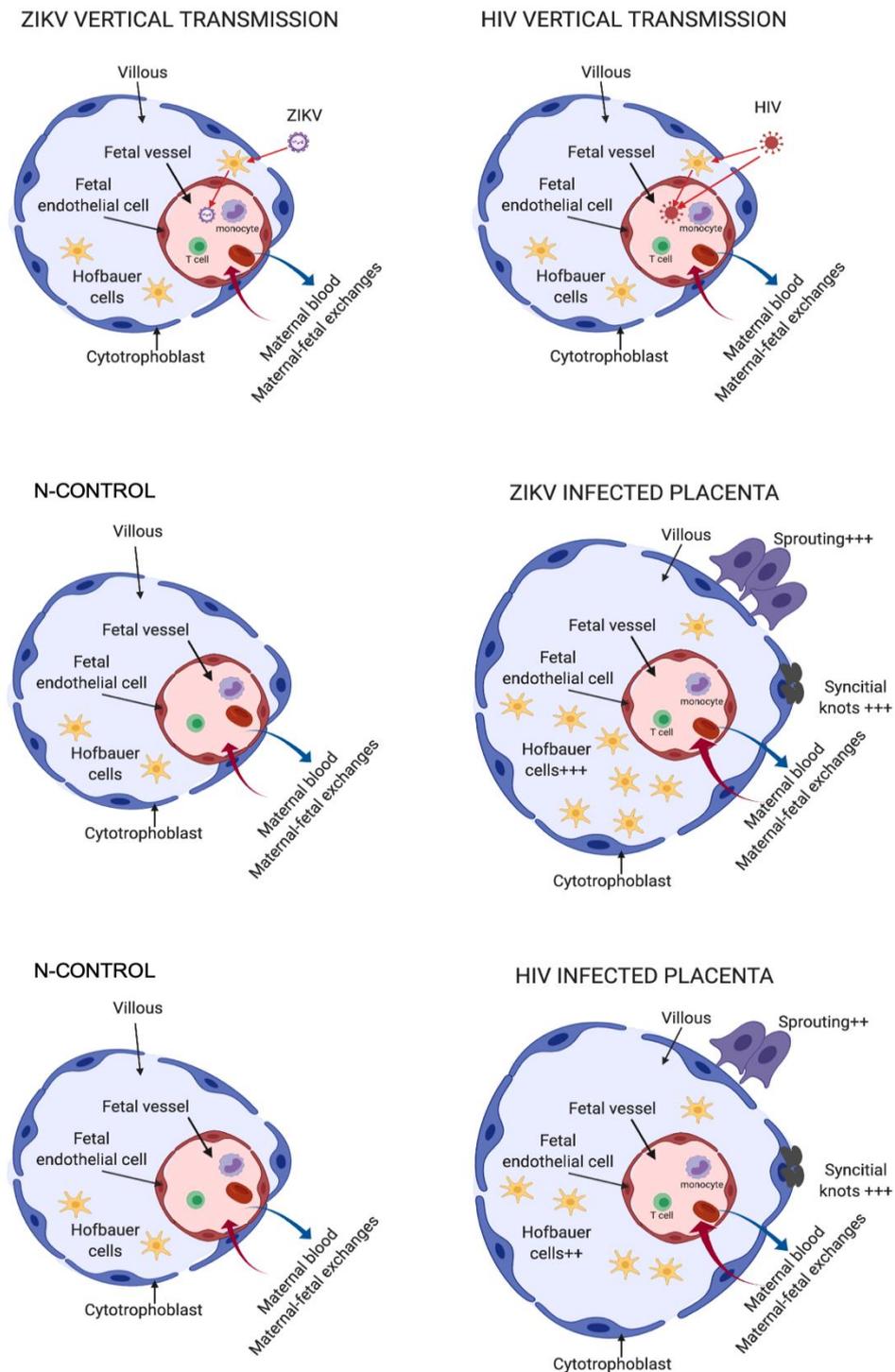


FIGURA 7: A ilustração mostra as diferenças na transmissão vertical entre o ZIKV e o HIV. Além disso, demonstra as diferenças morfométricas entre o grupo N-controle e o ZIKV e entre o grupo N-controle e o grupo HIV, respectivamente. No entanto, também representa resultados morfométricos semelhantes quando o grupo ZIKV foi comparado com o grupo HIV. As membranas sinciciais do grupo N-controle são mais eficientes porque os vasos estão mais próximos do citotrofoblasto e as trocas mãe-fetais são mais apropriadas. Nas placentas infectadas com ZIKV e HIV, as vilosidades aumentam de tamanho, afastando o vaso da camada de trofoblasto, distanciando as membranas sinciciotrofoblásticas, que podem causar morte intrauterina, bebês prematuros com baixo peso ao nascer e/ou outras malformações. Criado com www.biorender.com

As análises morfométricas foram realizadas em amostras de tecido placentário de mães que foram infectadas com ZIKV durante o primeiro ($n = 4$), segundo ($n = 7$) e terceiro trimestre de gravidez ($n = 6$). Em cinco amostras de placenta, o trimestre da infecção era desconhecido. O perímetro ($p = 0,029$), contagem de nós ($p = 0,006$), brotos ($p < 0,001$) e células Hofbauer CD163 + ($p < 0,001$) apresentaram diferenças significativas no trimestre da infecção. No entanto, a análise dessas placentas mostrou que o diâmetro e a área não apresentaram diferenças quando comparado o trimestre gestacional da infecção ($p > 0,05$). As diferenças mais relevantes foram observadas entre o segundo e o terceiro trimestre de infecção versus o grupo N-controle (TABELA 2).

Quando comparadas as placentas infectadas pelo ZIKV com e sem alterações patológicas pela microscopia convencional, observou-se diferença significativa no diâmetro ($p = 0,023$), perímetro ($p = 0,021$), contagem de nós ($p = 0,010$), brotos ($p < 0,001$) e células de Hofbauer CD163+ ($p < 0,001$), porém a área não apresentou diferença significativa nesse aspecto ($p > 0,05$) (TABELA 2).

O *status* dos recém-nascidos (com ou sem CZS) também foi analisado. O diâmetro ($p = 0,011$), a área ($p = 0,010$), o perímetro ($p = 0,004$), a contagem de nós ($p = 0,005$), as brotações ($p < 0,001$) e as células de Hofbauer CD163+ ($p < 0,001$) apresentaram diferença significativa entre os recém-nascidos com CZS quando comparados aos recém-nascidos sem essa condição (TABELA 2).

Além das placentas infectadas pelo ZIKV, as placentas infectadas pelo HIV, consideradas sem alterações patológicas pela microscopia convencional, também mostram alterações na maturação das vilosidades, quando comparadas às placentas não infectadas. Quando comparadas ao grupo N-controle, a área ($p < 0,001$), o perímetro ($p < 0,001$), a contagem de nós ($p = 0,005$), brotos ($p = 0,011$) e células de Hofbauer CD163+ ($p < 0,001$) do grupo HIV revelou diferença significativa, enquanto o diâmetro não mostrou diferença entre esses grupos ($p > 0,05$) (TABELA 3; FIGURA 7).

As placentas infectadas com ZIKV apresentaram diferença significativa apenas no número de brotos ($p < 0,001$) e de células de Hofbauer CD163+ ($p < 0,001$) quando comparadas às placentas infectadas pelo HIV. No entanto, o diâmetro, a área, o perímetro e o número de brotos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) (TABELA 3; FIGURA 7).

TABELA 3 - Mediana e valor de p dos dados morfométricos entre o grupo N-controle, o grupo HIV e o grupo ZIKV.

VARIABLE	PATHOLOGICAL ALTERATIONS OF PLACENTA			
	N-control group	HIV group	ZIKV-group	HIV group
Diâmetro (μm)	37,55 (43,44-30,37)	39,48 (49,08-32,55)	40,49 (57,72-29,09)	39,48 (49,08-32,55)
		0,0824		0,7919
Área (μm^2)	1866,78 (2496,19-1314,06)	2347,43 (3684,28-1520,34)	2241,82 (4354,37-1228,81)	2347,43 (3684,28-1520,34)
		<0,0001*		0,5381
Perímetro (μm)	173,55 (218,77-148,17)	202,65 (301,05-149,12)	189,49 (477,68-142,16)	202,65 (301,05-149,12)
		<0,0001*		0,1134
Número de nós/vilosidade	6,85 (11,66-4,16)	8,26 (10,56-4,36)	9,86 (15,46-3,46)	8,26 (10,56-4,36)
		0,0496*		0,1162
Número de brotos/vilosidade	0,86 (1,93-0,26)	1,43 (1,83-0,63)	2,28 (3,33-1,43)	1,43 (1,83-0,63)
		0,0114*		<0,0001*
Número de células de Hofbauer CD163+/vilosidade	0,61 (0,95-0,079)	1,14 (1,62-0,64)	2,10 (4,40-1,32)	1,14 (1,62-0,64)
		<0,0001*		<0,0001*

Legenda: * refere-se ao valor de p significativo.

6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo analisar as alterações morfológicas e morfométricas em placentas infectadas com ZIKV, comparando-as com placentas de gestantes saudáveis e placentas infectadas com HIV, levando em consideração a idade gestacional, alterações patológicas da placenta na microscopia convencional e presença de CZS.

6.1 ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS

Os resultados mostraram aumento significativo da área e do perímetro do grupo ZIKV quando comparado ao grupo N-controle. Além disso, também foi observado um número maior de nós, brotos e células de Hofbauer CD163+ (TABELA 2).

Os nós sinciciais são especializações nos sinciciotrofoblastos e seu aumento acentuado no final da gestação indica maturação precoce da vilosidade (NORONHA *et al.*, 2018). Os brotos sinciciais são marcadores de proliferação de trofoblastos e são vistos com frequência no início da gravidez e aumentam em muitas doenças (LOUKERIS *et al.*, 2010).

As células Hofbauer foram as únicas células fetais positivas para o ZIKV nas placentas humanas naturalmente infectadas, independentemente do período gestacional em que a infecção ocorreu. As células de Hofbauer também parecem permanecer persistentemente infectadas até o momento do parto (NORONHA *et al.* 2018). Isso sugere que a hipótese mais plausível para a transmissão transplacentária do ZIKV estaria relacionada à sua associação com as células Hofbauer e sua capacidade migratória de alcançar os vasos fetais e infectar o feto por transcitose ou pelo mecanismo de "cavalo de Troia" (AAGAARD *et al.*, 2017).

Os achados deste estudo corroboram com estudos que mostraram um atraso na maturação das vilosidades e sinais da hiperplasia de Hofbauer nas placentas infectadas pelo ZIKV. Essas alterações podem levar a danos nas vilosidades coriônicas, como calcificação, necrose, esclerose da geleia Wharton, deposição de fibrina e aumento significativo do tamanho das vilosidades (BHATNAGAR *et al.*, 2017; TABATA *et al.*, 2016; RABELO *et al.*, 2017; ZARE MEHRJARDI e SHOBEIRIAN, 2017). Pode-se concluir que todos os parâmetros anatomopatológicos podem ser

confirmados pelos dados morfométricos e podem ser usados para descrever placentas infectadas pelo ZIKV.

6.2 TRIMESTRE DE INFECÇÃO POR ZIKV

Quando o tempo da infecção por ZIKV foi analisado em termos de dados morfométricos da placenta, observou-se que a maioria das diferenças entre o grupo ZIKV e N-controle parece ocorrer quando a infecção ocorre no segundo e no terceiro trimestre de gestação. Como todos os recém-nascidos deste

No presente estudo, todos os recém-nascidos foram infectados no terceiro trimestre (a termo ou pré-termo), sendo assim, o curto intervalo de tempo decorrido entre o momento da infecção por ZIKV e o seu nascimento pode ser uma explicação para alterações mais pronunciadas nessas placentas.

O número de células Hofbauer CD163+ também mostrou diferenças entre os grupos, sugerindo que essas células podem apresentar hiperplasia precoce e essa hiperplasia parece ser mantida durante todo o período gestacional, embora diminua de intensidade ao longo dos meses. Esse fato parece concordar com a hipótese de que essas células podem funcionar como um reservatório de ZIKV (NORONHA *et al.*, 2018; ZANLUCA *et al.*, 2015).

6.3 ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS

Quinze das 23 placentas infectadas com ZIKV foram diagnosticadas sem alterações patológicas pelo patologista pediátrico. Oito delas tiveram alterações patológicas na microscopia convencional na observação dos patologistas pediátricos, principalmente imaturidade das vilosidades (TABELA 1).

Quando as placentas com e sem alterações patológicas na microscopia convencional foram comparadas (TABELA 2), as placentas diagnosticadas com imaturidade das vilosidades apresentaram diâmetro, perímetro e número de nós, brotos e células de Hofbauer CD163+ mais elevados. Isso significa que os patologistas provavelmente identificaram essas alterações na microscopia convencional e todos denominaram imaturidade das vilosidades, portanto não precisavam de técnicas de morfometria para fazer o diagnóstico.

Por outro lado, placentas infectadas com ZIKV que não apresentavam alterações patológicas após a microscopia convencional também apresentaram maior diâmetro, perímetro e número de nós, brotos e células de Hofbauer CD163+ quando comparados ao grupo N-controle (TABELA 2). Por esse motivo, observa-se que a microscopia convencional não consegue identificar alterações sutis que a morfometria pode encontrar.

6.4 SÍNDROME DO ZIKA CONGÊNITO

Os dados morfométricos também foram comparados com a presença ou ausência de CZS (Tabela 2). Este estudo mostrou aumento significativo do diâmetro, da área e do perímetro das vilosidades, bem como aumento do número de brotos, nós e células de Hofbauer CD163+ no grupo que apresentou CZS. Oito recém-nascidos tiveram malformações fetais relacionadas à infecção pelo ZIKV durante a gravidez. No entanto, quinze mulheres tiveram o início dos sintomas do ZIKV durante a gravidez e deram à luz a recém-nascidos sem CZS.

Independentemente do trimestre em que a infecção ocorreu, como o ZIKV é detectado nas células da placenta até o final da gravidez, é plausível especular que a infecção do feto possa ocorrer como um evento secundário e, em alguns casos, que as anormalidades sejam detectadas apenas meses após parto (AAGAARD *et al.*, 2017; ARAGÃO *et al.*, 2017; VENTURA *et al.*, 2017; LOU *et al.*, 2018; SHERIDAN *et al.*, 2017).

Neste estudo, observou-se que o ZIKV causa alterações essenciais nas vilosidades da placenta que podem levar a distúrbios congênitos, natimortos e morte neonatal. Também pode-se concluir que os parâmetros morfométricos podem ser biomarcadores para CZS, uma vez que são mais pronunciados nos recém-nascidos malformados. Esses dados podem ajudar no acompanhamento clínico dos recém-nascidos com distúrbios congênitos subclínicos ou até mesmo não aparentes ao nascimento.

6.5 PLACENTAS INFECTADAS COM HIV E ZIKV

Neste estudo, 23 placentas infectadas pelo HIV (grupo HIV) sem alterações morfológicas na microscopia convencional observada pelo patologista pediátrico

foram comparadas a placentas saudáveis (grupo N-controle). Os achados mostraram que o grupo HIV possuía maior área, perímetro, contagem de nós, brotos e células de Hofbauer CD163+ quando comparado ao grupo N-controle (TABELA 3).

Estudos também revelaram que as placentas expostas à infecção pelo HIV exibiam as seguintes características microscópicas: edema, imaturidade das vilosidades, necrose focal de trofoblastos, numerosas células Hofbauer, deposição de fibrina intervilosa e corangiiose (LÓPEZ *et al.*, 2013; OBIMBO *et al.*, 2019; ANDERSON 1997). No entanto, quando esses padrões são sutis ou mínimos, os patologistas não conseguem fazer o diagnóstico, porque grande parte dessas anormalidades é fisiológica em expressão mínima. Dado isso, técnicas morfométricas podem ser úteis para identificar anormalidades sutis.

Este estudo também demonstra que as anormalidades morfométricas encontradas no grupo ZIKV e HIV são semelhantes, portanto, quando ambas foram comparadas, não foram encontrados resultados estatisticamente significativos, exceto pelo número de brotos e células de Hofbauer CD163+ que tiveram maior contagem no grupo ZIKV (TABELA 3).

Aparentemente a hiperplasia de Hofbauer e as vilosidades de brotação/imaturidade podem ser mais pronunciadas e características nas placentas infectadas pelo ZIKV (NORONHA *et al.*, 2018; LÓPEZ *et al.*, 2013). Esse aspecto pode ajudar os patologistas pediátricos a suspeitar do diagnóstico da transmissão vertical do ZIKV.

7 CONCLUSÕES

7.1 CONCLUSÃO GERAL

Há um aumento no tamanho (maior perímetro) das vilosidades, alterações na maturação vilosa (presença de maior quantidade de brotos e nós) e aumento do número de células de Hofbauer após a infecção pelo ZIKV quando comparada ao grupo controle. Além disso, alterações muito semelhantes foram demonstradas nas placentas infectadas pelo HIV quando comparadas ao grupo ZIKV, mas a hiperplasia de células de Hofbauer podem ser menos pronunciadas no primeiro grupo.

7.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

Neste estudo foi possível observar que, mesmo as placentas que foram diagnosticadas como dentro dos padrões de normalidade pelo patologista no exame de rotina, ao exame morfométrico apresentavam alterações de tamanho e de maturação das vilosidades, porém discretas ao ponto de não serem percebidas pelo patologista sem um exame mais acurado, como a morfometria automatizada.

Foi observado que infecções que ocorreram no segundo e no terceiro trimestre geraram mais alterações de maturação e tamanho nas vilosidades placentárias, quando comparadas aquelas gestantes que se infectaram no primeiro trimestre.

Ao compararmos os resultados morfométricos com a informação de presença de CZS nos conceptos, foi observado que as placentas cujos bebês apresentaram CZS demonstraram alterações de tamanho e maturação mais pronunciadas.

Sendo assim, a imaturidade vilosa e a hiperplasia de Hofbauer observadas nas placentas de gestantes infectadas com ZIKV quando comparadas a placentas infectadas com HIV e placentas saudáveis, tornam-se parâmetros para avaliação do grau de comprometimento placentário de acordo com a idade gestacional bem como a presença ou não de CZS nos conceptos.

REFERÊNCIAS

Aagaard KM, Lahon A, Suter MA, et al. Primary human placental trophoblasts are permissive for Zika virus (ZIKV) replication. *Sci. Rep.* 2017; 7: 41389.

Adibi, JJ; Marques Jr, ETA; Cartus, A; Beiji, RH. Teratogenic effects of the zika virus and the role of the placenta. 2016. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00650-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00650-4).

Anderson, VM. The placental barrier to maternal HIV infection. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1997;24(4):797-820.

Aragão, M; Holanda, A; Brainer-Lima A; *et al.* Nonmicrocephalic infants with congenital Zika syndrome suspected only after neuroimaging evaluation compared with those with microcephaly at birth and postnatally: how large is the Zika virus “iceberg”? *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 2017;38:1427-1434.

Ayres, CFJ. Identification of Zika virus vectors and implications for control. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(3):278-9.

Baurakiades, E; Martins, APC; Moreschi, V; Souza, CDA; Abujamra, K; Saito, AO; Mecatti, MC; Santos, MG; Pimentel, CR; Silva, LLG; Cruz, CR; Noronha, L. Histomorphometric and immunohistochemical analysis of infectious agents, T-cell subpopulations and inflammatory adhesion molecules in placentas from HIV-seropositive pregnant women. *Diagnostic Pathology.* 2011;6:101.

Bhatnagar, J; Blau, DM; Shieh, WJ; *et al.* Molecular detection and typing of dengue viruses from archived tissues of fatal cases by rt-PCR and sequencing: diagnostic and epidemiologic implications. *Am J Trop Med Hyg* 2012;86:335-40. Available from: <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh>.

Bhatnagar, J; Rabeneck, DB; Martines, RB; Reagan-Steiner, S; Ermias, Y; Estetter, LBC; Suzuki, T; Ritter, J; Keating, MK; Hale, G; Gary, J; Muehlenbachs, A; Lambert, A; Lanciotti, R; Oduyebo, T; Meaney-Delman, D; Bolaños, F; Saad, EAP; Shieh, WJ; Zaki, SR. Zika vírus RNA replication and persistence in brain and placental tissue. *Emerging Infectious Diseases.* 2017;23(3):405-414.

Bordignon, J; Probst, C; Mosimann, A; Pavoni, D; Stella, V; Buck, G; Satproedprai, N; Fawcett, P; Zanata, S; Noronha, I. Expression profile of interferon stimulated genes in central nervous system of mice infected with dengue virus Type-1. *Virology (New York, N.Y. Print).* 2008;377:319-329.

Brasil, P; Pereira, JP; Moreira, ME; *et al.* Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *N. Engl. J. Med.* 2016;375:2321-2334.

Brazil/Ministry of Health 2016 [homepage on the Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; [updated 2016 Jan 14; cited 2016 Jan 14]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21677-novos-casos-suspeitos-de-microcefalia-sao-divulgados-pelo-ministerio-da-saude>.

Cao, B; Parnell, LA; Diamond, MS; Mysorekar, IU. Inhibition of autophagy limits vertical transmission of Zika virus in pregnant mice. *J Exp Med.* 2017;214(8):2303-13.

Cao-Lormeau, VM; *et al.* Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014;20(6):1085-1086.

Dick, GWA. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46(5):509-20.

Dick, GWA. ZIKV II. Pathogenicity and physical properties. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1952;46:521-534.

Hughes, BW; Addanki, KC; Sriskanda, AN; McLean, E; Bagasra, O. Infectivity of immature neurons to zika virus: a link to congenital zika syndrome. *EBioMedicine.* 2016;10:65-70.

López, CL; Pires, ARC; Fonseca, EC; *et al.* Anatomopathological characterization of placentas from HIV+ patients associated with p24 expression. *J Bras Patol Med Lab.* 2013;49(6):437-445.

Luo, H; Winkelmann, ER; Fernandez-Salas, I; Li, L; Mayer, SV; Danis-Lozano, R; *et al.* Zika, dengue and yellow fever viruses induce differential anti-viral immune responses in human monocytic and first trimester trophoblast cells. *Antiviral Res.* 2018;151:55-62.

Loukeris, K; Sela, R; Baergen, RN. Syncytial knots as a reflection of placental maturity: reference values for 20 to 40 weeks gestational age. *Pediatr. Dev. Pathol.* 2010;13:305–309.

Maartens, G; Celum, C; Lewin, SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet* 2014;384(9939):258-71

Mattern, CFT; Murray, K; Jensen, A; *et al.* Localization of human immunodeficiency virus core antigen in term human placentas. *Pediatrics.* 1992;89:207-209.

Melo, AS; Aguiar, RS; Amorim, MM; *et al.* Congenital Zika virus infection: beyond neonatal microcephaly. *JAMA Neurol.* 2016;73:1407-1416.

Menu, E; Mbopi-Keou, FX; Lagaye, S; *et al.* Selection of maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in human placenta. *J Infect Dis.* 1999;179:44-51.

Neu, N; Duchon, J; Zachariah, P. TORCH infections. *Clin. Perinatol.* 2015;42(1):77-103(viii).

Noronha, L; Zanluca, C; Luize, M; Azevedo, V; Luz KG; Nunes C. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111(5):287-293.

Noronha, L; Zanluca, C; Burger, M; Suzukawa, A; Azevedo, M; Rebutini, PZ; Novadzki, IM; Tanabe, LS; Presibella, MM; Santos, CND. Zika virus infection at different pregnancy stages: anatomopathological findings, target cells and viral persistence in placental tissues. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:1-11.

Obimbo, MM; Zhou, Y; McMaster, MT; Cohen, CR; Qureshi, Z; Ong'ech, J; Fisher, SJ. Placental structure in preterm birth among HIV-positive versus HIV-negative women in Kenya. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2019;80(1):94-102.

Oehler, E; Watrin, L; Larre, P; Leparç-Goffart, I; Lastere, S et al. ZIKV infection complicated by Guillain-Barré syndrome: case report. French Polynesia, december 2013. *Euro Surveill*. 2014;19(9):1-3.

Oliveira Melo, AS. *et al*. Zika vírus intrauterine infecção causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet. Gynecol*. 2016;47:1,6-7.

Oster, AM; Brooks, JT; Stryker, JE; Kachur, RE; Mead, P; Pesik, NT; *et al*. Interim Guidelines for Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus - United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2016;65(5):120–1. Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6505e1.htm>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26866485>.

PAHO/WHO 2016 [homepage on the Internet]. Washington: Pan American Health Organization; [cited 2016 Jan 14]. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=427&Itemid=41484. Tsai TF. Congenital arboviral infections: something new, something old. *Pediatrics* 2006;117:936-9.

Petersen, LR; Jamieson, DJ; Powers, AM; Honein, MA. Zika Virus. Baden LR, editor. *N Engl J Med*. 2016;374(16):1552-63.

Quicke, KM; Bowen, JR; Johnson, EL; McDonald, CE; Ma, H; O'Neal, JT; *et al*. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe* . 2016;20(1):83-90.

Rabelo, K; de Souza Campos Fernandes, RC; Souza, LJ; de Louvain de Souza, T; Santos, FB; Guerra Nunes, PC; *et al*. Placental Histopathology and Clinical Presentation of Severe Congenital Zika Syndrome in a Human Immunodeficiency Virus-Exposed Uninfected Infant. *Front Immunol*. 2017;7(8):1-8.

Schuler-Faccini, L; Ribeiro, EM; Feitosa, IM; *et al*. Brazilian Medical Genetics Society–Zika Embryopathy Task Forceet. Possible association between Zika Virus infection and microcephaly–Brazil, 2015. *Morb. Mortal. Wkly. Rep*. 2016;65:59-62.

Schwartz, DA. Viral infection, proliferation, and hyperplasia of Hofbauer cells and absence of inflammation characterize the placental pathology of fetuses with congenital Zika virus infection. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;295(6):1361-8.

Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika: monitoramento do ano de 2019. *Boletim epidemiológico*. 2020; 51;5:5-13.

Sheikh, AU; Polliotti, BM, Miller, RK. Human immunodeficiency virus infection: In situ polymerase chain reaction localization in human placentas after in utero and in vitro infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182:207-213.

Sheridan; MA; Yunusov, D; Balaraman, V; Alexenko, AP; Yabe, S; Verjovski-Almeida, S; *et al.* Vulnerability of primitive human placental trophoblast to Zika virus. *Proc Natl Acad Sci.* 2017;114(9):E1587-96.

Solomon, IH; Milner, DA; Folkerth, RD. Neuropathology of zyka virus infection. *J Neuroinfect Dis.* 2016;7(2):1-6.

Souza, AS; Dias, CM; Braga, FDCB; Terzian, ACB; Estofolete, CF; Oliani, AH; Oliveira, GH; Mattos, CCB; Mattos, LC; Nogueira, ML; Vaz-Oliani, DCM. Fetal infection by zika virus in the third trimester: report of 2 cases. *Clinical Infectious Disease.* 2016;63:1622-1625.

Tabata, T; Petitt, M; Puerta-Guardo, H; Michlmayr, D; Wang, C; Fang-Hoover, J; *et al.* Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe* . 2016;20(2):155-66.

Ventura, L; Ventura, C; Lawrence, L; *et al.* Visual impairment in children with congenital Zika syndrome. *J. AAPOS.* 2017;21:295-299.

Yang, SW; Cho, EH; Choi, SY; *et al.* DC-SIGN expression in Hofbauer cells may play an important role in immune tolerance in fetal chorionic villi during the development of preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2017;124:30-37.

Zanluca, C; De Melo, VCA; Mosimann, ALP; Dos Santos, GIV; dos Santos, CND; Luz, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(4):569-72.

Zare Mehrjardi, M; Shobeirian, F. The role of the placenta in prenatally acquired Zika virus infection. *VirusDisease.* 2017;28(3):247-9.

8 APÊNDICE - ARTIGO SUBMETIDO NO AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY (AJOG)

American Journal of Obstetrics and Gynecology
Placental morphologic similarities between ZIKV-positive and HIV-positive pregnant women
 –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Article Type:	Original Research
Section/Category:	General Gynecology
Corresponding Author:	Daiane Cristine Martins Ronchi BRAZIL
First Author:	Daiane Cristine Martins Ronchi, MSc
Order of Authors:	Daiane Cristine Martins Ronchi, MSc Mineia Alessandra Scaranello Malaquias, PhD Patrícia Zadorosnei Rebutini, MSc Letícia Arianne Panini do Carmo Plínio César Neto Emily Scaranello Marini Amanda Prokopenko Camila Zanluca Claudia Nunes Duarte dos Santos Seigo Nagashima Lucia de Noronha, PhD
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	<p>Introduction: Zika virus (ZIKV) caused global concern due to the unexpected epidemic of infection in Brazil, associated with congenital microcephaly and other gestational interurrences. Study design: This report describes the morphometric analysis of ZIKV-infected placentas (ZIKV; n = 23), compared to the control non-infected group (N-control; n = 23) and HIV-infected group (HIV; n = 23). It also has analyzed the relationship between the morphometric changes with the pathological alterations on conventional microscopy, time of pregnant infection, and presence of the Congenital Zika Syndrome (CZS). Results: The findings of this study showed significant enlargement of area and perimeter, as well as a higher number of knots, sprouts, and CD163+ Hofbauer cells of the ZIKV group when compared to the N-control group. Placentas with pathological changes on conventional microscopy had a higher diameter, perimeter, and the number of knots, sprouts, and CD163+ cells when compared to the placenta without alterations. We also observed a significant enlargement of the villi's diameter, area, and perimeter, a higher number of sprouts, and CD163+ Hofbauer cells in the group that had CZS. HIV group had a larger area, perimeter, count of knots, sprouts, and CD163+ Hofbauer cells when compared to the N-control group, demonstrating that the morphometrical abnormalities finding on ZIKV and HIV group are very similar. Conclusions: There is an increase in villus size and maturity alterations after ZIKV infection during pregnancy, and the same alterations seem to be described for HIV-infected placentas. These alterations may help to understand the aspect of ZIKV infection related to placental damage and congenital disabilities, as well as possible deficiencies that might appear after birth.</p>