

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

*ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS IDENTIFICADAS EM PLACENTAS DE
GESTANTES INFECTADAS PELO VÍRUS ZIKA*

Aluno: Patricia Zadorosnei Rebutini

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia de Noronha

Curitiba, junho/2019

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

*ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS IDENTIFICADAS EM PLACENTAS DE
GESTANTES INFECTADAS PELO VÍRUS ZIKA*

Dissertação 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 Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia de Noronha

Curitiba, junho/2019

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Pamela Travassos de Freitas – CRB 9 /1960

R293a
2019 Rebutini, Patricia Zadorosnei
 Alterações anatomopatológicas identificadas em placentas de gestantes infectadas pelo vírus zika / Patricia Zadorosnei Rebutini ; orientadora: Lúcia de Noronha. – 2019.
 67 f. : il. ; 30 cm

 Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2019
 Bibliografia: f. 46-56

 1. Ciência da saúde. 2. Zika virus. 3. Transmissão vertical de doenças infecciosas. 4. Placenta. 5. Patologia. I. Noronha, Lúcia de. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.III. Título.

CDD 22. 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 DEFESA DO PROJETO DE PESQUISA DE PASSAGEM COM DEFESA DO MESTRADO PARA O DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Exame de Defesa de Projeto de Pesquisa – Número: **02**

Aos 14 dias de junho de 2019, às 14:00, reuniu-se a banca examinadora composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profa. Dra. Lúcia de Noronha – Presidente (PUCPR)	
Profa. Dra. Ana Paula Martins Sebastião	
Profa. Dra. Ana Paula Percicote	Ana Paula Percicote

Designada para avaliação do Projeto de Passagem com Defesa do Mestrado para o Doutorado, sob título provisório **“ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS IDENTIFICADAS EM PLACENTAS DE GESTANTES INFECTADAS PELO VÍRUS ZIKA”**, ano de ingresso 2017, do Programa de Pós Graduação em Ciências da saúde, da mestranda **Patricia Zadorosnei Rebutini**, de acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os pareceres a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profa. Dra. Lúcia de Noronha	Conceito <u>APROVADO</u>
Profa. Dra. Ana Paula Martins Sebastião	Conceito <u>APROVADO</u>
Profa. Dra. Ana Paula Percicote	Conceito <u>APROVADO</u>

Parecer Final: APROVADO

Observações da Banca Examinadora:

A aluna defendeu o mestrado e a
passagem p/ o doutorado

Profa. Dra. Lúcia de Noronha
Presidente da Banca Examinadora

Prof.ª Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde
Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

A dissertação foi redigida seguindo a normatização estabelecida pela ABNT e as normas para elaboração de dissertações e teses do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Patologia Experimental da Escola de Medicina da PUCPR, em colaboração com o Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ-PR), o Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN) e o Laboratório de Imuno-histoquímica do Serviço de Anatomia Patológica do Complexo Hospital de Clínicas da UFPR. Declaramos que não há conflito de interesse na realização da presente dissertação.

Dedico esta obra aos meus pais,
Antonio e Estela, e à minha avó, Sofia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, ao Senhor Jesus Cristo, pela minha salvação, e ao Espírito Santo, pela consolação.

Aos meus pais, Antonio e Estela, à minha avó, Sofia, e à minha irmã, Vanessa, pela compreensão e incentivo.

Ao meu esposo, Raphael, tanto pelo amor, carinho e encorajamento, quanto pela paciência e parceria nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Profa Dra Lúcia de Noronha, pela oportunidade, confiança e orientação, assim como pela amizade construída desde o início da minha formação como médica residente em Anatomia Patológica.

À equipe do Laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR, Marina, Ana, Seigo e Caroline, pela acolhida calorosa e pela colaboração diligente e generosa em todas as etapas desse trabalho.

Aos pesquisadores, professores e colegas do PPGCS, do Instituto Carlos Chagas / Fundação Oswaldo Cruz de Curitiba, da Secretaria da Saúde do Estado do Paraná (SESA-PR) e do Laboratório Central do estado do Paraná (LACEN) que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste projeto.

À PUC-PR, pelo suporte acadêmico, técnico e financeiro, sem o qual este projeto não se tornaria realidade.

“O temor do SENHOR é o princípio da sabedoria...”

Salmo 111:10a

RESUMO

A infecção por vírus Zika (ZIKV) em seres humanos tem sido associada a malformações congênitas e outras desordens neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré. O(s) mecanismo(s) da transmissão intrauterina do ZIKV, os tipos celulares envolvidos, o período gestacional mais crítico para a ocorrência de desfechos graves decorrentes da infecção e outros aspectos fisiopatológicos não estão completamente elucidados. Neste estudo, analisamos amostras de placentas obtidas imediatamente após o parto de um grupo de 24 mulheres diagnosticadas com infecção pelo ZIKV durante o primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional. O principal achado histológico nessas amostras foi imaturidade vilosa, embora placentas sem alterações foram observadas frequentemente. Detectou-se aumento significativo do número de nós sinciciais em placentas de mulheres infectadas no terceiro trimestre, indicando anormalidades do desenvolvimento placentário após a infecção pelo ZIKV. Hiperplasia de células de Hofbauer também foi observada e, notavelmente, células de Hofbauer foram as únicas células fetais positivas para ZIKV identificadas nas placentas estudadas que persistiram até o final da gestação, conforme demonstrado por análise imuno-histoquímica. Trinta e três por cento das mulheres infectadas durante a gestação deram à luz conceptos com anormalidades congênitas, embora não tenha sido identificada correlação entre a idade gestacional em que ocorreu a infecção, a positividade imuno-histoquímica de células de Hofbauer nos tecidos placentários e a presença de malformações congênitas ao nascimento. Análise do tecido placentário permitiu confirmar a infecção pelo ZIKV nos casos em que amostras de soro obtidas durante a fase aguda da infecção não estavam disponíveis, o que reforça a importância dessa técnica na identificação de possíveis causas de anomalias congênitas. As alterações observadas nas amostras de gestantes naturalmente infectadas podem contribuir para o entendimento de alguns aspectos da fisiopatologia da infecção por ZIKV.

Palavras-chave: Vírus Zika. Transmissão vertical. Placenta. Análise anatomopatológica. Células de Hofbauer. Análise morfométrica.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) infection in humans has been associated with congenital malformations and other neurological disorders, such as Guillain-Barré syndrome. The mechanism(s) of ZIKV intrauterine transmission, the cell types involved, the most vulnerable period of pregnancy for severe outcomes from infection and other physiopathological aspects are not completely elucidated. In this study, we analyzed placental samples obtained at the time of delivery from a group of 24 women diagnosed with ZIKV infection during the first, second or third trimesters of pregnancy. Villous immaturity was the main histological finding in the placental tissues, although placentas without alterations were also frequently observed. Significant enhancement of the number of syncytial sprouts was observed in the placentas of women infected during the third trimester, indicating the development of placental abnormalities after ZIKV infection. Hyperplasia of Hofbauer cells was also observed in these third-trimester placental tissues, and remarkably, Hofbauer cells were the only ZIKV-positive fetal cells found in the placentas studied that persisted until birth, as revealed by immunohistochemical analysis. Thirty-three percent of women infected during pregnancy delivered infants with congenital abnormalities, although no pattern correlating the gestational stage at infection, the immunohistochemical positivity of Hofbauer cells in placental tissues and the presence of congenital malformations at birth was observed. Placental tissue analysis enabled us to confirm maternal ZIKV infection in cases where serum from the acute infection phase was not available, which reinforces the importance of this technique in identifying possible causal factors of birth defects. The results we observed in the samples from naturally infected pregnant women may contribute to the understanding of some aspects of the pathophysiology of ZIKV.

Keywords: Zika virus. Vertical transmission. Placenta. Anatomopathological analysis. Hofbauer cells. Morphometric analysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação esquemática da arquitetura vilositária no 1º e 3º trimestres. 19
- Figura 2 – Folha de rosto do artigo. 26
- Figura 3 – Characterization of the anti-ZIKV MAb by immunofluorescence. The MAb recognized ZIKV-infected C6/36 cells and showed no crossreactivity with DENV serotypes 1 to 4 or with the yellow fever (YFV), West Nile (WNV) and Saint Louis encephalitis (SLEV) viruses. No reaction was observed in the MOCK-infected cells. The pan-flavivirus MAb 4G2 was used as the positive control, and an unrelated MAb was used as the negative control. The scale bars are 250 µm. 31
- Figura 4 – Photomicrography of third trimester placental samples (chorion frondosum) from women diagnosed positive for ZIKV infection immunostained with anti-ZIKV (**A**), anti-pan-flavivirus 4G2 (**B**) and anti-CHIKV MAbs (**C**) or with no primary antibody (**D**) and stained with Harris's hematoxylin. (**A–B**): The arrows indicate positive Hofbauer cells inside the chorionic villi. Notice that the cytotrophoblast and syncytiotrophoblast cells, as well as fibroblastic cells inside Wharton's jelly, are negative for both antibodies used. (**C–D**): No reaction was observed in the negative controls. The scale bars are 60 µm. 32
- Figura 5 – Photomicrography of the placental samples stained with H&E or immunostained with anti-ZIKV MAb and stained with Harris's hematoxylin (squares). The scale bars are 60 µm (**A–D**) and 40 µm (**E,F**). (**A**) Case LRV/15 572–First trimester placenta sample (chorion frondosum) showing chronic villitis (TORCH-like) with lymphohistiocytic chronic villous inflammation. (**B**) Case LRV/16 515–Third trimester placenta sample (chorion frondosum) showing delayed villous maturation with additional stromal changes, such as stromal fibrosis. (**C**) Case LRV/16 845–Third trimester placenta sample (chorion frondosum) showing delayed villous maturation with persistence of the cytotrophoblastic layer, stromal fibrosis and reduced numbers of syncytial knots. (**A–C**) The squares highlight Hofbauer cells positive for anti-ZIKV MAb (arrows) inside the chorionic villi. Notice that the cytotrophoblast and syncytiotrophoblast cells, as well as other fibroblastic cells inside Wharton's jelly, are negative for anti-ZIKV MAb. (**D**) Negative control (ZIKV-negative patient)–Third trimester placenta sample (chorion frondosum) without pathological changes. Hofbauer cells are negative for anti-ZIKV MAb inside the chorionic villi (square). Note that the cytotrophoblast and syncytiotrophoblast cells, as well as other fibroblastic cells inside Wharton's jelly, are negative for the antibody used. (**E**) Case LRV/15 578–Third trimester placenta sample (chorion frondosum) showing delayed villous mat-

uration with additional stromal changes, such as stromal fibrosis (square arrow), an increase in the number of fetal capillaries (arrows), hyperplasia of Hofbauer cells (*) and an increase in intravillous fibrinoid deposits (arrow head). **(F)** Negative control (ZIKV-negative patient)—Third trimester placenta sample (chorion frondosum) showing a normal number of Hofbauer cells (+). No delayed villous maturation or additional stromal changes were observed. 37

Figura 6 – Morphometric analysis of placental specimens from women infected with ZIKV during the pregnancy and from negative controls. (A) Photomicrography of a placental sample stained with H&E showing syncytial knots (arrows) and sprouts (*). **(B)** Quantification of knots and sprouts. A significant increase in the number of placental sprouts was observed in the groups whose mothers were infected with ZIKV during the first ($n = 4$), second ($n = 7$), or third ($n = 6$) trimester of pregnancy, when compared to the negative controls ($n = 6$). **(C)** Immunostaining with CD163 highlights Hofbauer cell hyperplasia in ZIKV-infected placentas. **(D)** Quantification of CD163+ Hofbauer cells. The average numbers of CD163+ cells and CD163+ cells per villus were significantly higher in the ZIKV-positive group ($n = 5$) than in the negative controls ($n = 3$). **(B,D)** Thirty high-power fields (HPFs = 400x) for each case were randomly selected for counting. The mean of the 30 fields was used for the statistical analyses. The ZIKV-infected and negative control groups were compared using either the One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test **(B)** or the Mann Whitney test **(D)**. The asterisks indicate statistically significant differences between the groups (* $p < 0.05$)... 39

Figura 7 – Photomicrography of placenta, cord and membrane samples from women diagnosed as positive for ZIKV infection immunostained with anti-ZIKV MAb and stained with Harris's hematoxylin. The scale bars are 100 μ m (A,B) and 20 μ m (C–F). (A) Case LRV/16 515—Umbilical cord slides from a third trimester placenta negative for anti-ZIKV MAb. Fibroblasts in Wharton's jelly (*) and amniotic epithelium (arrow) are negative for the antibody used. **(B)** Case LRV/16 515—Chorioamniotic membrane from a third trimester placenta negative for anti-ZIKV MAb. Notice that the capsular decidua (*), the smooth chorion above the capsular decidua (arrowhead) and the amniotic epithelium (arrow) are negative for the antibody used. **(C)** Case LRV/16 515—Decidua basalis (*) from a third trimester placenta negative for anti-ZIKV MAb. **(D)** Case LRV/15 572—Intervillous space from a first trimester placenta with inflammatory cell infiltrates positive for anti-ZIKV MAb (arrow). **(E)** Case LRV/16 927 and **(F)** Case LRV/16 848: Chorion frondosum from third trimester placentas showing Hofbauer cells positive for anti-ZIKV MAb (arrows) inside the chorionic villi. Notice that the cytotrophoblast and syncytiotrophoblast cells, as well as fibroblastic cells inside Wharton's jelly, are negative for the antibody used. 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pathological features and laboratory findings from 24 cases of Zika virus infection confirmed during pregnancy.	34
Tabela 2 – Main placental histopathological findings from infants with and without congenital disorder at birth.. . . .	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	15
1.2 REVISÃO DA LITERATURA	16
1.2.1 Vírus Zika	16
1.2.2 Placenta	18
1.2.3 Vírus Zika e a placenta.	21
1.3 JUSTIFICATIVA	23
1.4 OBJETIVOS	24
1.4.1 Objetivo geral	24
1.4.2 Objetivos específicos	24
2 ARTIGO	26
2.1 INTRODUCTION	27
2.2 MATERIALS AND METHODS	28
2.2.1 Patients and ethics approval	28
2.2.2 RNA extraction and viral genome detection	29
2.2.3 Antibody Detection	29
2.2.4 Anatomopathological, immunohistochemical and morphometric analysis	30
2.3 RESULTS	33
2.4 DISCUSSION	38
3 CONCLUSÃO	45
3.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	46
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICE	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Durante a gestação, a transmissão vertical de agentes infecciosos pode levar a consequências deletérias ao desenvolvimento fetal, cujo espectro inclui malformações orgânicas diversas e óbito do concepto. Em muitos casos, tais alterações podem não ser evidentes ao nascimento, mas suas manifestações acabam sendo detectadas tardiamente ao longo do primeiro ano de vida, invariavelmente acarretando prejuízo para o indivíduo [1].

A partir do segundo semestre de 2015 [2–5], a infecção por vírus Zika (ZIKV) ganhou notoriedade globalmente nesse contexto, devido ao subsequente aumento na incidência de microcefalia e outras malformações congênitas em neonatos de mulheres que haviam apresentado sintomas compatíveis com infecção por esse agente durante a gestação [6–10].

No Brasil, apenas no período de novembro de 2015 a fevereiro de 2016, houve um aumento de 100 vezes no número de notificações de casos de microcefalia [7]. Desde o início da epidemia, foram registrados 243.111 casos de provável doença causada pelo ZIKV, incluindo cerca de 20.000 gestantes [11–14]. De um total de 16.900 casos de microcefalia notificados no mesmo período, ao menos 3.279 já foram confirmados como decorrentes de infecção pelo ZIKV; desses, 1.809 (64%) demandam atendimento de suporte especializado. Há registro de mais de 400 óbitos fetais, neonatais e infantis atribuídos ao ZIKV no país [15]. Tal foi o impacto da epidemia que, em fevereiro de 2016, a Organização Mundial da Saúde declarou estado de emergência em saúde pública [16, 17].

Embora tenha havido uma diminuição do número de casos registrados de do-

ença causada pelo ZIKV, até março de 2017 havia evidência de circulação do vírus em 84 países e territórios, 66 dos quais com transmissão documentada e 31 países com casos relatados de microcefalia e outras alterações do sistema nervoso central potencialmente associadas ao ZIKV [18].

Tendo em vista a gravidade dos efeitos da infecção pelo ZIKV em bebês, em um contexto ambiental potencialmente favorável ao surgimento de novas epidemias, é relevante o estudo das alterações placentárias associadas à infecção por este agente, tanto para identificar padrões morfológicos de acometimento que contribuam para o seu diagnóstico, quanto para a possível elucidação dos mecanismos associados a transmissão materno-fetal.

1.2 REVISÃO DA LITERATURA

1.2.1 Vírus Zika

O ZIKV foi identificado pela primeira vez em Uganda em 1947, com casos esporádicos registrados na África e na Ásia até 2007 [19], e na Polinésia Francesa em 2013 [9, 20]. Trata-se de um arbovírus transmitido primariamente por picada de mosquitos do gênero *Aedes* [21], mas também por contato sexual [22–25], mordida de animais infectados [26], transfusão sanguínea e aleitamento materno [27–29]. Pertence à família *Flaviviridae* e está relacionado aos vírus causadores da febre amarela, dengue, febre do Nilo ocidental e encefalite japonesa, espécies do gênero *Flavivirus* [17, 30–33], um grupo de RNA vírus que infectam seres humanos causando desde quadros febris discretos até manifestações hemorrágicas e encefalíticas severas [34].

Em adultos, após um período de incubação de 3 a 12 dias, a infecção por ZIKV é sintomática na minoria dos casos (cerca de 20%) e pode ser suspeitada clinicamente pela presença de *rash* maculopapular associado a dois ou mais dos seguintes sintomas: febre baixa com ao menos 48 horas de duração, conjuntivite não purulenta,

poliartralgia e edema periarticular. O quadro clínico geralmente é leve, autolimitado e muitas vezes é acompanhado de cefaleia, dor retro-ocular, vômitos e mialgia [35–39]. Tais sintomas são inespecíficos e frequentemente observados em pacientes acometidos por síndromes infecciosas de outra etiologia, como a dengue, sendo necessária a confirmação por métodos laboratoriais. Foram descritas também manifestações mais graves como meningite, meningoencefalite e Síndrome de Guillain-Barré, que é uma desordem neurológica caracterizada pelo acometimento do sistema nervoso periférico por autoanticorpos, originalmente produzidos em resposta a um agente infeccioso, resultando em paralisia muscular progressiva, inclusive dos músculos respiratórios [40–44]. No Brasil, há registro de 15 óbitos, 8 dos quais ocorridos no ano de 2016 [11, 13]. Não há tratamento específico ou vacina disponíveis até o momento, de modo que o controle da doença depende da prevenção da transmissão do patógeno [45].

Flavivírus raramente estão relacionados a malformações congênitas, mesmo aqueles reconhecidamente neurotrópicos como os causadores da febre do Nilo ocidental e da encefalite japonesa, responsáveis por quadros de encefalite pós-natal [46, 47]. Todavia, uma vez estabelecida a relação epidemiológica entre a infecção materna e o aumento de desfechos neurológicos neonatais desfavoráveis, uma relação de causalidade passou a ser investigada. Além da confirmação da presença de ZIKV pela detecção de antígenos virais, foi demonstrada também replicação viral em líquido amniótico, placenta, sangue e cérebro de bebês microcefálicos, o que foi crítico para identificação dos alvos celulares da infecção viral e da persistência do vírus nos tecidos [37, 48–52]. Assim, com a confirmação da penetração através da barreira placentária e do neurotropismo, o ZIKV passou a ser reconhecido como patógeno TORCH [53, 54], acrônimo que engloba os patógenos mais comumente associados a infecções congênitas, como o *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, HIV, parvovírus, o vírus da rubéola, o citomegalovírus e o herpesvírus [54, 55].

Uma vez que o vírus demonstra tropismo por células do sistema nervoso [56], principalmente por células progenitoras [34, 39, 57, 58], as desordens neurológicas em conceptos são as manifestações clínicas mais frequentes. A alteração mais ca-

racterística é a microcefalia (definida como a medida do perímetro cefálico inferior ao terceiro percentil para a idade gestacional e sexo [31]), uma desordem grave do desenvolvimento fetal que resulta em uma cabeça menor que o normal associada ao colapso parcial do crânio devido ao subdesenvolvimento do tecido nervoso, acompanhada de déficits físicos e cognitivos. Entretanto, estão descritos outros achados como microencefalia, diminuição do número e complexidade de giros corticais (lissencefalia, paquigiria, agiria), polimicrogiria, hipoplasia cerebelar, ventriculomegalia, hidrocefalia, desenvolvimento anormal do corpo caloso, alterações na migração neuronal, calcificações subcorticais, retardo na mielinização, dentre outros [33, 50, 52, 59–61]. Por conseguinte, ao menos 20% dos bebês com infecção por ZIKV confirmada ou provável exibem disfunções neurológicas e cognitivas com perímetro cefálico normal [1, 7, 62]. Os fetos infectados no primeiro trimestre gestacional apresentaram anormalidades sugestivas de efeito patológico durante a embriogênese, decorrentes tanto da produção neuronal diminuída quanto do aumento da morte celular (apoptose) [63, 64], mas alterações no sistema nervoso central foram reconhecidas mesmo em conceptos infectados por volta da 27ª semana de gestação [51, 65].

A associação de malformações no sistema nervoso com alterações oculares, contraturas congênitas como artrogripose e hipertonia muscular caracterizam a Síndrome da Zika Congênita [31, 35].

1.2.2 Placenta

Após a fecundação, as primeiras divisões celulares resultam em um maciço de células indiferenciadas até por volta do quarto dia, na fase de blastocisto, quando há o surgimento de uma cavidade interna decorrente do acúmulo de fluido, distinguindo-se então um aglomerado central de células que compõe o embrioblasto e uma camada celular externa, o trofoblasto, o qual dará origem a placenta [66, c. 2].

Por volta do sexto dia, posto em contato com o endométrio, o trofoblasto inicia sua invasão (fase de implantação), proliferando ativamente e constituindo duas subpo-

pulações: cito e sinciciotrofoblasto. Este, situado perifericamente e composto por uma massa citoplasmática multinucleada (massa sincicial); aquele, mais interno e formado por células poligonais individualizadas. A partir do nono dia, surgem vacúolos no interior dessa massa sincicial (fase lacunar), os quais confluirão, dando origem a uma cavidade única, totalmente delimitada por sinciciotrofoblasto: a câmara intervilositária [67, c. 1].

A partir do décimo oitavo dia inicia-se o período vilositário propriamente dito, momento em que um eixo mesenquimatoso oriundo do embrião permeia o citotrofoblasto, levando à formação de projeções digitiformes para o interior da câmara intervilositária, tendo início o desenvolvimento de esboços vasculares que, quando conectados ao coração embrionário, estabelecerão a circulação placentária fetal. Além disso, a concomitante erosão dos vasos sanguíneos endometriais faz com que a câmara intervilositária seja preenchida por sangue materno [66, c. 2].

Desse modo, a placenta constitui basicamente uma interface entre os sistemas circulatórios fetal e materno que exhibe arquitetura arboriforme, pois os vasos fetais embebidos em estroma fibroconjuntivo e delimitados por trofoblasto constituem projeções ou vilos, os quais se ramificam por brotamento e, por sua vez, estão banhados em sangue materno (Figura 1).

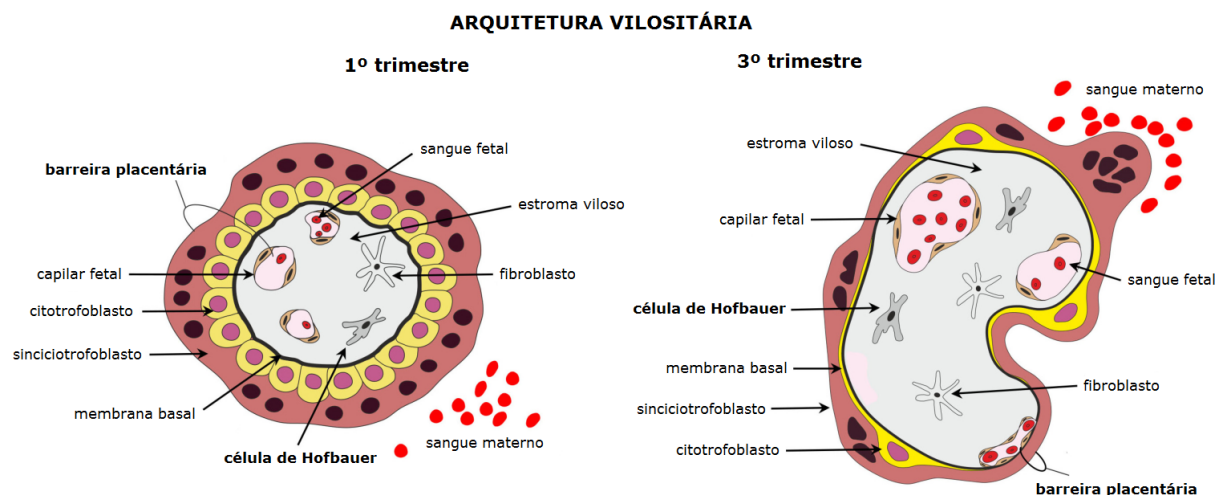


Figura 1 – Representação esquemática da arquitetura vilositária no 1º e 3º trimestres.

Fonte: adaptado de Chatuphonprasert *et al.* [68].

No primeiro trimestre predominam as vilosidades jovens, ou seja, vilosidades maiores, revestidas por duas camadas bem definidas de trofoblasto (cito e sinciciotrofoblasto), e dotadas de numerosos brotos sinciciais (massas de sinciciotrofoblasto que se projetam no espaço vilositário e representam o arcabouço a ser penetrado pelo eixo mesenquimatoso, o qual é subsequentemente vascularizado, dando origem à nova vilosidade). Ao longo da gestação, o tamanho da placenta aumenta em virtude do brotamento vilositário, gerando vilosidades de menor tamanho, com estroma mais compacto, menor número de brotos sinciciais e significativo adelgaçamento do revestimento citotrofoblástico. Nas menores vilosidades observáveis, denominadas vilosidades terminais, o revestimento trofoblástico delgado associado a distribuição periférica dos vasos fetais leva à formação das membranas sinciciovasculares (ou barreira placentária, região da placenta onde ocorrem as trocas materno-fetais) [69, c. 6].

Histologicamente, a placenta é composta por diferentes tipos celulares que desempenham funções variadas como invasão endometrial e remodelamento vascular do tecido materno para ancoragem e estabelecimento da referida interface, produção de moléculas diversas (incluindo hormônios e citocinas) e transporte de nutrientes e resíduos metabólicos [70]. Sua arquitetura vilositária típica, com ramificações hierarquizadas com propriedades e tamanhos diferenciados em cada trimestre gestacional, reflete seu grau de desenvolvimento e funcionalidade.

Como órgão intermediário entre a mãe e o conceito, a placenta tem papel fundamental na inibição de transmissão de agentes infecciosos para o feto baseado na separação dos suprimentos vasculares materno e fetal. Assim, a propagação por via hematogênica direta de micro-organismos é limitada por uma barreira física, embora não restrita a ela. Isso porque as células do trofoblasto são resistentes à infecção e secretam moléculas que atuam localmente na regulação gênica e imunidade adaptativa (pró-inflamatória), como interferon e micro-RNAs, e pela presença de macrófagos no estroma viloso (conhecidas como células de Hofbauer), integrando uma barreira imunológica [43, 71–76]. Outras rotas de contaminação propostas para o período que antecede o estabelecimento do fluxo sanguíneo placentário de origem materna

incluem difusão de partículas virais para o embrião em formação a partir de espermatozoides ou de células imunes infectadas, de secreções de glândulas uterinas, entre outros [54, 73, 77].

Por conseguinte, as alterações histopatológicas placentárias oriundas da ação de micro-organismos podem fornecer informações importantes quanto ao mecanismo da transmissão materno-fetal, quer seja pelo reconhecimento do impacto no desenvolvimento, maturação e suficiência placentária, quanto pela natureza da resposta inflamatória da mãe e do feto à infecção, ou ainda pela distribuição anatômica dos efeitos na placenta como influxo leucocitário, necrose, hemorragia, dentre outros.

Os achados mais comuns em infecções transmitidas verticalmente incluem alterações vilositárias maturativas e vilosite, uma vez que a presença de um agente patogênico desencadeia uma reação inflamatória com recrutamento de leucócitos oriundos tanto da circulação materna quanto da circulação fetal. Eventualmente, esse processo pode levar à fibrose ou necrose das vilosidades envolvidas, com subsequente deposição de fibrina e microcalcificação distrófica [33, 53, 78][69, c. 20].

1.2.3 Vírus Zika e a placenta

O ZIKV comporta-se de maneira diferente de outros agentes infecciosos transmitidos hematogenicamente, os quais produzem mais comumente lesões vilositárias inflamatórias ou necrotizantes (vilosite). Foi identificada placentite crônica padrão TORCH, com inflamação vilosa predominantemente histiocítica, edema vilositário, lesão do epitélio trofoblástico e histiócitos no espaço intervilloso apenas em amostras oriundas do primeiro trimestre gestacional, as quais estavam associadas a óbito fetal precoce [33, 50, 75, 78].

Em amostras de placentas de segundo e terceiro trimestre de mulheres infectadas em diferentes momentos da gestação, os achados relatados são inespecíficos e incluem alterações vilositárias maturativas e estromais. As desordens maturativas incluem vilosidades de tamanho maior que o esperado para a idade gestacional, per-

sistência da camada de citotrofoblastos e elevado número de brotos sinciciais, o que caracteriza retardo da maturação placentária. As alterações estromais vilositárias englobam o espessamento da membrana basal trofoblástica, hipervascularização vilosa, fibrose estromal, hiperplasia de células de Hofbauer, microcalcificações abundantes e moderado aumento de depósitos de fibrina intra e perivilosa [10, 33, 37, 50, 60]. A ausência de vilosite nessas amostras é inesperada, do mesmo modo que microcalcificações e deposição aumentada de fibrina na ausência de evidências de necrose vilositária, especialmente porque o vírus pode causar reações necroinflamatórias no cérebro fetal [53].

Dentre esses achados, a hiperplasia de células de Hofbauer chama a atenção. O aumento de células de Hofbauer é anormal e foi constatado em infecções bacterianas ascendentes, vilosite de origem indeterminada, TORCH e doença de Chagas [78].

As células de Hofbauer são macrófagos derivados de monócitos recrutados da circulação fetal e, junto com fibroblastos, constituintes normais do estroma viloso. São células designadas genericamente como M2 ou macrófagos ativados de padrão alternativo e, portanto, com fenótipo imunorregulatório e anti-inflamatório [79, 80]. São identificáveis em amostras teciduais mediante o uso de anticorpos direcionados contra receptores e proteínas específicas, como o CD163, aplicados em técnica de imunohistoquímica [81–83]. Sua atuação contribuiria para a tolerância imunológica materna em relação ao conceito [81, 82, 84], secreção de enzimas e citocinas que cruzam a barreira feto-placentária, angiogênese e brotamento vilositário, diminuindo em número com a evolução da gestação [85–87].

Tais células são suscetíveis a micro-organismos, podendo ser ativadas em processo infecciosos, o que resulta em sua proliferação, expansão em número e permanência por muitas semanas nas vilosidades coriônicas de placentas de mulheres acometidas [78, 85, 86]. *In vivo*, elas são permeáveis ao ZIKV, o qual foi detectado nessas células por até 10 semanas após a infecção inicial, com evidências de replicação viral [88, 89], possivelmente facilitando a transmissão do vírus.

Embora a ativação de macrófagos vilositários tenha sido implicada na des-

truição da barreira placentária facilitando a transmissão de patógenos, não é o que parece ocorrer na infecção por ZIKV. Acredita-se que o ZIKV poderia ser transportado da circulação materna através do trofoblasto, seja por difusão paracelular em focos de descontinuidade do revestimento sinciciotrofoblástico [86] ou através de vesículas intracitoplasmáticas, como parte de um processo de autofagia não degradativa ou secretória em que, ao invés de fundir-se a lisossomos, o conteúdo dessas vesículas é secretado [90–93].

Assim, o vírus seria fagocitado pelas células de Hofbauer que, por sua vez, tem capacidade migratória no estroma viloso, deslocando-se entre a superfície epitelial trofoblástica e os vasos fetais, propiciando a transferência e disseminação do vírus presente na circulação materna para a circulação fetal [36, 48, 75, 94]. Especula-se também, que a células de Hofbauer representariam uma fonte de persistência da infecção viral que, por sua vez, acarretaria adoecimento fetal tardio, não necessariamente vinculado à fase aguda da doença materna [95].

1.3 JUSTIFICATIVA

Considerando que os mecanismos da transmissão intrauterina, replicação, tropismo e persistência do ZIKV em tecidos são ainda pouco entendidos [48] e a gravidade dos danos para o conceito, em um contexto ambiental e epidemiológico propício para o surgimento de novas epidemias, o estudo das alterações histopatológicas da placenta é essencial para a compreensão dos fenômenos relacionados a fisiopatologia da transmissão vertical e para identificação de alterações morfológicas que eventualmente contribuam para seu diagnóstico.

A hipótese é de que placentas de mães infectadas por ZIKV apresentam alterações morfológicas, morfométricas e imuno-histoquímicas significativamente diferentes de placentas de mães não infectadas.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo geral

Descrever e quantificar as alterações morfológicas, morfométricas e imuno-histoquímicas em placentas de gestantes com infecção documentada pelo ZIKV (grupo estudo), em comparação com achados de placentas de mulheres saudáveis (grupo controle), pareadas pela idade gestacional.

1.4.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) descrever alterações morfológicas no grupo estudo em coloração de rotina (H&E);
- b) avaliar a quantidade de brotos e de nós sinciciais no grupo estudo e no grupo controle utilizando técnicas de morfometria em coloração de rotina (H&E);
- c) avaliar a quantidade de células de Hofbauer por meio da identificação de células positivas para CD163 no grupo estudo e no grupo controle utilizando técnicas de morfometria em reações imuno-histoquímicas;
- d) avaliar a presença e distribuição de antígenos virais no tecido placentário por meio da identificação de células positivas para anticorpos anti-flavivirus e anti-ZIKV no grupo estudo utilizando reações imuno-histoquímicas;
- e) comparar os achados dos dois grupos a fim de determinar os padrões de lesão causados pelo ZIKV nas vilosidades placentárias;

- f) estabelecer relação entre os achados morfológicos e as condições clínicas do concepto ao nascimento.

2 ARTIGO

Este capítulo contém a transcrição do artigo científico publicado no periódico *Frontiers in Microbiology* (Figura 2), no idioma original de sua publicação.

O artigo abrange todas as etapas que caracterizaram o desenvolvimento deste trabalho, a saber, o detalhamento da seleção das amostras que constituíram o grupo estudo e o grupo controle, materiais e método implementados (quer seja para extração de RNA, detecção do genoma viral e detecção de anticorpos anti-ZIKV, quanto a análise anatomopatológica, imuno-histoquímica e morfométrica adotadas), descrição dos resultados atingidos, análise estatística empregada, assim como a discussão dos resultados.



ORIGINAL RESEARCH
published: 25 September 2018
doi: 10.3389/fmicb.2018.02266



Zika Virus Infection at Different Pregnancy Stages: Anatomopathological Findings, Target Cells and Viral Persistence in Placental Tissues

Lucia de Noronha^{1*}, Camila Zanluca², Marion Burger³, Andreia Akemi Suzukawa^{2†}, Marina Azevedo^{1†}, Patricia Z. Rebutini^{1†}, Iolanda Maria Novadzki³, Laurina Setsuko Tanabe³, Mayra Marinho Presibella⁴ and Claudia Nunes Duarte dos Santos^{2*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Francois Villinger,
University of Louisiana at Lafayette,
United States

Reviewed by:

Sanjeev Gumber,
Emory University, United States
Jose Luiz Proenca-Modena,
Universidade Estadual de Campinas,
Brazil

¹ Laboratório de Patologia Experimental, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil, ² Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Curitiba, Brazil, ³ Secretaria da Saúde do Estado do Paraná, Curitiba, Brazil, ⁴ Laboratório Central do Estado do Paraná, Curitiba, Brazil

Zika virus (ZIKV) infection in humans has been associated with congenital malformations and other neurological disorders, such as Guillain-Barré syndrome. The mechanism(s) of ZIKV intrauterine transmission, the cell types involved, the most vulnerable period

Figura 2 – Folha de rosto do artigo.

2.1 INTRODUCTION

Zika virus (ZIKV) is an emergent arthropod-borne virus that belongs to the genus *Flavivirus* of the *Flaviviridae* family [30]. This virus is primarily transmitted through the bite of the *Aedes* mosquito [21]. Unlike most other flaviviruses, however, person-to-person ZIKV transmission is possible, although the contribution of this transmission mode to maintaining an epidemic is unclear. Transmission by sexual and perinatal interactions and from blood and platelet transfusions has been described [33, 50, 56].

In general, ZIKV infection in humans is characterized as a self-limiting disease, and the most frequent signs and symptoms are low fever, myalgia, rash, arthralgia, headache and conjunctival hyperemia [2, 19]. Nevertheless, cases of neurological manifestations, such as Guillain-Barré syndrome [8, 33, 41], have been reported in patients diagnosed with ZIKV. In addition, ZIKV infection during pregnancy has been associated with fetal malformations. Brain microcalcification and other central nervous system disorders, ocular abnormalities, and arthrogryposis are all a part of congenital Zika syndrome [8, 51, 61]. By March 17, 2017, thirty-one countries or territories in the Americas had reported central nervous system malformations that were potentially associated with ZIKV infection, and Brazil is the most affected country to date [18].

Since June 2015, we have been receiving samples of serum, urine and other body fluids for ZIKV diagnosis. Additionally, during the peak of the ZIKV outbreak in Brazil, in agreement with the local health authorities, most pregnant women in Paraná State suspected of having ZIKV infection were monitored. Samples of tissues, such as the placenta and umbilical cord, as well as fetal tissues (in the case of stillbirths), all of which were collected at the time of delivery, were sent to our laboratory for analysis.

Here, we present a case series in which we analyzed placental tissues from women infected with ZIKV at different pregnancy stages, focusing on the anatomopathological and morphometric findings, target cells and viral persistence.

2.2 MATERIALS AND METHODS

2.2.1 Patients and ethics approval

This study was approved by Fiocruz and the Brazilian National Ethics Committee of Human Experimentation under the number CAAE:42481115.7.0000.5248. Since our laboratory is a Reference Center for the Diagnosis of Emerging Viruses of the Brazilian Ministry of Health, we obtained the waiver for the written informed consent to work with these samples. We are in compliance with all the ethical principles and our study was approved by the above-mentioned Ethical Committee.

During the ZIKV outbreak in Brazil (2015–2016), 331 pregnant women exhibiting ZIKV infection-compatible symptoms presented to the Public Health Units in Paraná State. Two hundred ninety-two of them tested negative for ZIKV infection, and 39 cases were laboratory-confirmed for ZIKV by RT-qPCR. From the positive cases, two patients had spontaneous abortions, and the remaining 37 women were monitored during pregnancy until the time of delivery.

This report describes the anatomopathological and morphometric findings from the placental tissues of 24 pregnant women with confirmed ZIKV infection, *i.e.*, those with positive results by RT-qPCR or immunohistochemical (IHC) analysis of placental tissue.

Although the ZIKV infection had occurred at different gestational periods, the fragments of all but one placental tissue analyzed in this study were collected immediately after delivery and frozen. The presence of the ZIKV genome in the samples was investigated by RT-qPCR, and when appropriate, the presence of antibodies in the serum samples was screened with an ELISA, as described below. An additional fragment of the placenta was kept in buffered formalin for further anatomopathological, morphometric and IHC analyses. The clinical condition of the newborns was evaluated immediately after delivery (no follow-up was performed).

2.2.2 RNA extraction and viral genome detection

Viral RNA was isolated from 140 μ L of biological fluids (serum, cerebrospinal fluid, lacrimal fluid, saliva or urine) using a QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. RNA extraction from unfixed placenta or viscera was performed with a RNeasy Mini Kit (Qiagen), while RNA from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues was extracted using the ReliaPrepTM FFPE Total RNA Miniprep System (Promega, Madison, USA). RNA was stored at -80 °C until use.

The primers and probes were synthesized and purified by Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, USA). The reporter dye 5-FAM was used for the probes. All real-time assays were performed with the GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega) with amplification by a LightCycler 96 instrument (Roche, Mannheim, Germany).

The ZIKV genome was detected according to the protocol of Lanciotti *et al.* [96], which used 5 μ L of RNA per 20 μ L reaction, while the dengue virus (DENV) serotypes were detected according to the protocol of Johnson *et al.* [97]. Human RNase P was used as an endogenous control [98].

Positive controls for ZIKV and DENV were obtained by virus isolation from Brazilian patients' sera in C6/36 or Vero E6 cells.

2.2.3 Antibody Detection

Anti-ZIKV IgM in serum samples was detected with an in-house IgM capture enzyme-linked immunosorbent assay (MAC-ELISA) using β -propiolactone-inactivated ZIKV and MOCK (from noninfected cells) cell cultures as antigens according to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) guidelines [99], with minor modifications. A humanized anti-flavivirus monoclonal antibody (MAb) was kindly provided by the CDC and was used as a positive control. Serum samples were also tested for

anti-DENV antibodies using either the Panbio Dengue IgM Capture ELISA or the Panbio Dengue IgG Indirect ELISA (Alere, Brisbane, Australia) following the manufacturer's instructions.

2.2.4 Anatomopathological, immunohistochemical and morphometric analysis

Placentas were fixed in 10% buffered formalin immediately after delivery.

Umbilical cord, membranes, and disk were examined. Multiple parallel sections were taken through the disk at 2-cm intervals.

Histologic samples of placental villous tissue were made from separate areas of distinct cotyledons. At least three sections were taken from the parenchyma in such a way that both chorionic and basal plates were included. Also, sections from the cord and the "jelly roll" of membranes were examined.

Deparaffinization and rehydration of the FFPE placental samples were performed using xylene and ethanol baths, respectively, and hydrogen peroxide/methanol was used to block endogenous peroxidase activity. Then, the sections were incubated with anti-flavivirus (4G2) or specific anti-ZIKV (produced at ICC/Fiocruz-PR) MAb and then with rabbit anti-mouse secondary antibody followed by goat anti-rabbit antibody conjugated to HRP (Spring Bioscience, Pleasanton, USA). Finally, the slides were incubated with a freshly prepared substrate mixture (DAB, DakoCytomation) and counterstained with Mayer's hematoxylin.

The anti-ZIKV MAb did not show any cross reactivity with other flaviviruses (dengue serotypes 1–4 and the yellow fever, Saint Louis encephalitis and West Nile viruses) in a cell culture model (Figure 3). Additionally, 73 placental samples of other etiologies were tested by IHC using anti-ZIKV MAb, and no cross reactivity was observed. Also, RT-qPCR yielded negative results in most of these samples.

Negative controls were obtained either by omitting the primary antibody from the incubation step or by using an unrelated MAb against Chikungunya virus (CHIKV), produced at ICC/Fiocruz-PR, as the primary antibody (Figure 4).

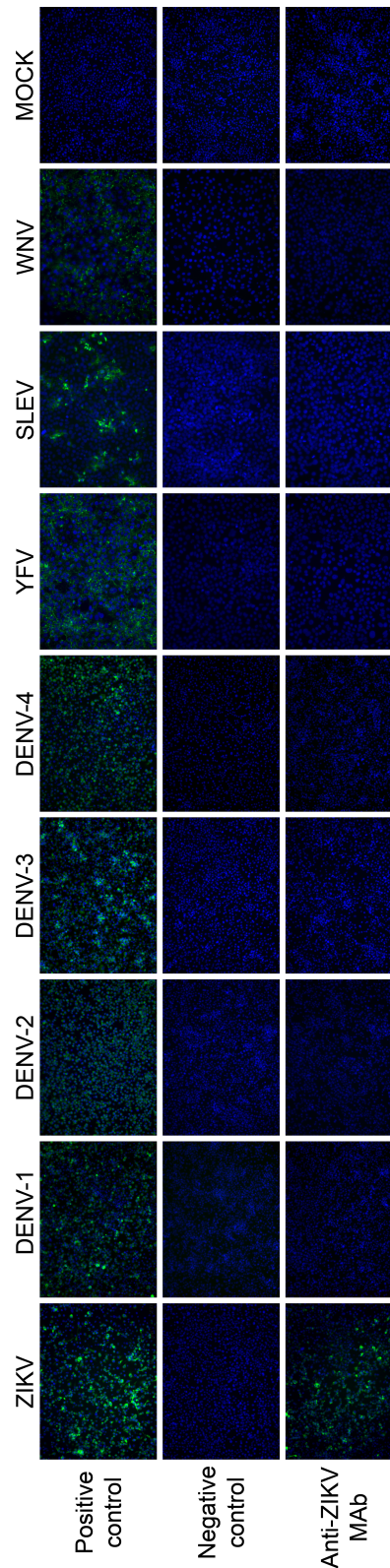


Figure 3 – Characterization of the anti-ZIKV MAb by immunofluorescence. The MAb recognized ZIKV-infected C6/36 cells and showed no crossreactivity with DENV serotypes 1 to 4 or with the yellow fever (YFV), West Nile (WNV) and Saint Louis encephalitis (SLEV) viruses. No reaction was observed in the MOCK-infected cells. The pan-flavivirus MAb 4G2 was used as the positive control, and an unrelated MAb was used as the negative control. The scale bars are 250 μm .

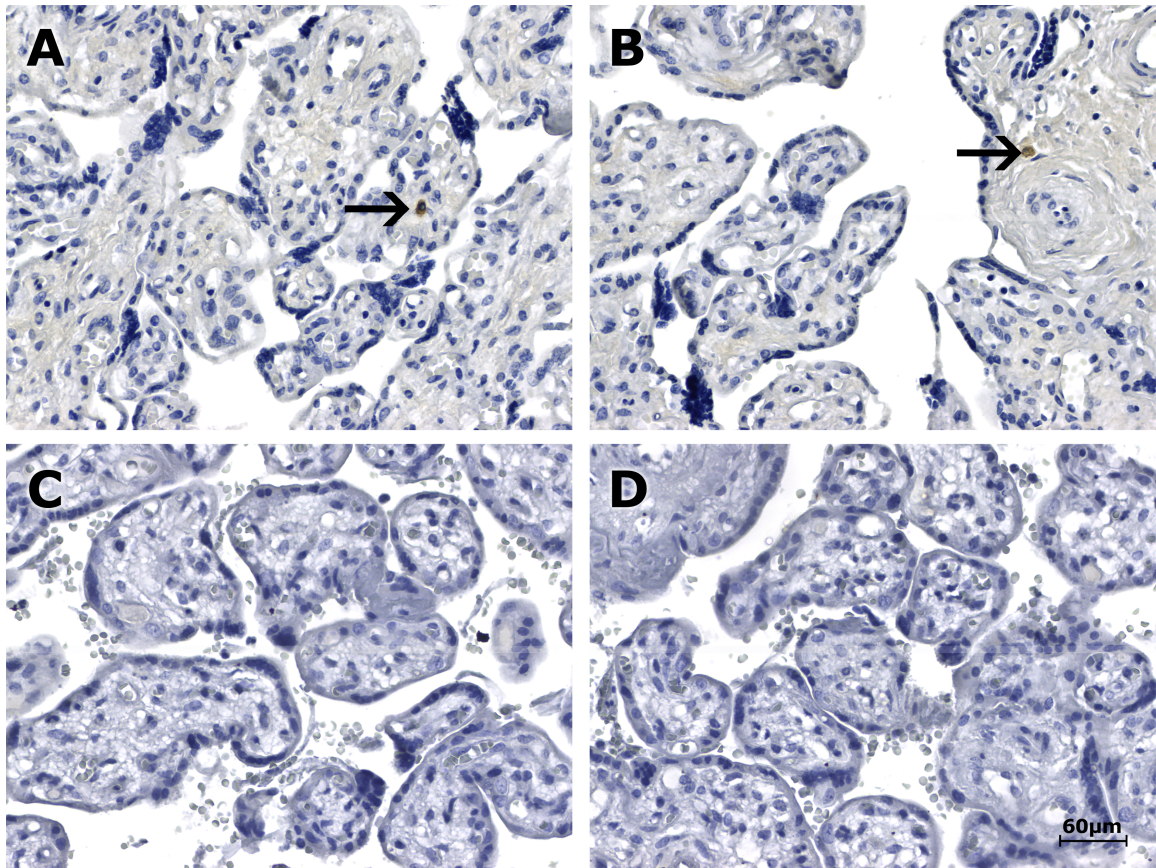


Figure 4 – Photomicrography of third trimester placental samples (chorion frondosum) from women diagnosed positive for ZIKV infection immunostained with anti-ZIKV (A), anti-pan-flavivirus 4G2 (B) and anti-CHIKV MAbs (C) or with no primary antibody (D) and stained with Harris's hematoxylin. (A–B): The arrows indicate positive Hofbauer cells inside the chorionic villi. Notice that the cytotrophoblast and syncytiotrophoblast cells, as well as fibroblastic cells inside Wharton's jelly, are negative for both antibodies used. (C–D): No reaction was observed in the negative controls. The scale bars are 60 μ m.

To better identify Hofbauer cells (HCs), the FFPE placental tissue specimens were incubated with the primary antibody anti-human CD163 (Invitrogen, Carlsbad, USA) by using the same protocol.

The placenta slides (three slides from the placental disc, one slide from the chorioamniotic membrane and one slide from umbilical cord) were observed with an Olympus TM BX50 optical microscope (Tokyo, Japan), and photomicrographs were acquired in a high-power field (400x) using a Zeiss Axio Scan.Z1 TM scanner (Carl Zeiss, Thornwood, USA) for both routine hematoxylin-eosin (H&E) staining and IHC staining. Villus maturation was evaluated by considering the villus morphology and the gestational age at delivery.

Morphometric analyses were performed in placental tissue specimens from mothers who were infected with ZIKV during the first ($n = 4$), second ($n = 7$), and

third trimester of pregnancy ($n = 6$). A negative control group ($n = 6$) was used for comparison [94]. For each case, 30 high-power fields (HPFs = 400x) were randomly selected, and the knots and sprouts in each field were counted. The mean values of these parameters over the 30 fields were used for the statistical analyses. The Zika-infected and uninfected control groups were compared using the One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. Similarly, villi and HCs CD163 positive cells were counted in 30 fields from placental samples from mothers infected during the third trimester of pregnancy ($n = 5$) and from a negative control group ($n = 3$). The Zika-infected and uninfected control groups were compared using the Mann Whitney test.

For both, statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.01 software. Differences were considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

2.3 RESULTS

This report describes the evaluation of the 24 cases of ZIKV infection confirmed in pregnant women at different gestational periods (Table 1).

Serological analysis was performed in the 15 cases for which serum samples were available; nine of these cases presented with both anti-ZIKV IgM and anti-DENV IgG, and one had only anti-DENV IgG. The presence of these IgG antibodies suggests a past Flavivirus infection. None of the anti-ZIKV IgM-positive samples cross reacted in the anti-DENV IgM ELISA (Table 1, cases LRV/16 1318, 16 1317, 16 870, 16 1065, 16 1068, 16 1029, 16 1004, 16 859, and 16 284).

Neither ZIKV RNA nor anti-ZIKV IgM were detected in samples of amniotic fluid, newborn cerebrospinal fluid (CSF) or ocular/oral swabs in the cases described in this article. Of the five newborn serum samples available, one presented anti-ZIKV IgM, indicating transplacental infection, although no congenital disorder was observed at the time of delivery in this case (Table 1, case LRV/16 1065).

Table 1 – Pathological features and laboratory findings from 24 cases of Zika virus infection confirmed during pregnancy.

TIME of infection -gestational trimester/ Probable month of infection*	Patient code	RT-PCR (serum)	RT-PCR (urine)	Anti- ZIKV IgM DENV (serum) Serology	IHC Placenta (FFPE)	RT-PCR Placenta (FFPE)	RT-PCR Placenta (unfixed) features	Congenital disorder	Outcome/Delivery gestational age	Newborn samples-additional observation
First Trimester (weeks 1–13)	2nd LRV/16 1350	+	-	I IgM-/IgG-	-	NT	-	Third trimester/umbilical artery agenesis	Newborn/preterm (36 w)	CSF, urine, lacrimal fluid and saliva RT-PCR-
	3rd LRV/16 1318	+	-	+	IgM-/IgG+	NT	-	Third trimester/without pathological changes	Newborn/term	CSF, Lacrimal fluid and saliva RT-PCR- Serum RT-PCR-/IgM- Brain tissue RT-PCR+
	1st LRV/15 578	NA	NA	NA	-†	+	NA	Third trimester/villous immaturity	Newborn/term	Yes—microcephaly, arthrogryposis, perinatal death
	1st LRV/16 1317	+	NA	+	IgM-/IgG+	NT	-	Third trimester/without pathological changes	Newborn/term	NA
	2nd LRV/15 572	NA	NA	NA	+	+	NA	First trimester/chronic villitis TORCH-like	Spontaneous abortion/12 w	NA
	6th LRV/16 870	+	NA	+	IgM-/IgG+	-	-	Third trimester/without pathological changes	Newborn/term	NA
Second Trimester (weeks 14–26)	4th LRV/16 1065	+	-	+	IgM-/IgG+	NT	-	Third trimester/without pathological changes	Newborn/term	Lacrimal fluid and saliva RT-PCR- Serum RT-PCR-/IgM+ Colostrum IgM+
	5th LRV/16 933	+	-	I IgM-/IgG+	-	-	+	Third trimester/without pathological changes	Newborn/term	NA
	6th LRV/16 1068	+	-	+	IgM-/IgG+	NT	+	Third trimester/mild acute funitis	Newborn/term	Lacrimal fluid and saliva RT-PCR-
	6th LRV/16 995	+	NA	I IgM-/IgG-	-	-	-	Third trimester/without pathological changes	Newborn/term	NA
	5th LRV/16 1029	+	-	+	IgM-/IgG+	-	-	Third trimester/without pathological changes	Newborn/term	Lacrimal fluid, saliva, serum RT-PCR-/IgM- Colostrum IgM+
	5th LRV/16 1004	+	-	+	IgM-/IgG+	-	+	Third trimester/without pathological changes	Newborn/term (40 w)	Serum RT-PCR-/IgM-
Third Trimester (weeks 27–40)	6th LRV/16 845	+	NA	-	IgM-/IgG-	-	-	Third trimester/villous immaturity	Newborn/term	NA
	8th LRV/16 927	NA	-	NA	+	-	-	Third trimester/without pathological changes	Newborn/term	NA
	7th LRV/16 854	+	NA	I IgM-/IgG-	+	-	-	Third trimester/villous immaturity	Newborn/term	NA
	7th LRV/16 859	-	-	+	IgM-/IgG+	-	-	Third trimester/without pathological changes	Newborn/term	NA
	7th LRV/16 931	+	NA	I IgM-/IgG-	-	-	-	Third trimester/without pathological changes	Newborn/term	NA

Table 1 – Continued.

TIME of infection -gestational trimester/ Probable month of infection*	Patient code	RT-PCR (serum)	RT-PCR (urine)	Anti- ZIKV IgM DENV (serum) Serology	IHC Placenta (FFPE)	RT-PCR Placenta (FFPE)	RT-PCR Placenta (unfixed) features	Gestational age/ Pathological features	Congenital disorder	Outcome/Delivery gestational age	Newborn samples-additional observation
7th	LRV/16 848	NA	NA	NA	+	-	-	Third trimester/without pathological changes	No	Newborn/term	NA
8th	LRV/16 284	-	+	+	-	NT	+	Third trimester/without pathological changes	No	Newborn	Serum RT-PCR-/IgM-
?	LRV/16 857	NA	NA	NA	+	-	-	Third trimester/without pathological changes	Yes— Hydrocephalus	Newborn/preterm (34 w)	NA
?	LRV/16 103	NA	NA	NA	+	-	-	Third trimester/villous immaturity	Yes—Stillborn	Intrauterine fetal demise/term	Viscera RT-PCR-
?	LRV/16 515	NA	NA	NA	+	-	-	Third trimester/villous immaturity	Yes—brain abnormalities, encephalocele, death at 1-month -old	Newborn/term (38 w)	Viscera and CSF RT-PCR-
?	HC N16-09	NA	NA	NA	+	-	NA	Third trimester/villous immaturity	Yes—Microcephaly, discrete multifocal cerebritis, calcifications	Intrauterine fetal demise/term	NA
?	LRV/16 855	NA	-	NA	+	-	-	Third trimester/without pathological changes	Yes— Hydrocephalus, ventriculomegaly, calcifications, bilateral congenital cataract	Newborn/preterm (34 w)	CSF RT-PCR-

*For term placentas, the probable month of infection was calculated assuming delivery at week 39 as described by Moore et al. (Moore et al., 2014). †IHC was positive in the brain tissue of the newborn. ?, not known; +, positive; -, negative; I, inconclusive; NT, not tested; NA, not available; w, weeks; CSF, cerebrospinal fluid.

The anatomopathological findings for the FFPE placental tissue specimens are compiled in Tables 1, 2. Of note, although our panel includes samples from women who

had ZIKV infection at different stages of pregnancy, all placental samples were obtained at the time of delivery except for one, which was from a spontaneous abortion at 12 weeks of gestation (first trimester placenta, case LRV/15 572). Additional information about this case has been published [33]. This ZIKV-positive first trimester human placental sample (LRV/15 572) exhibited chronic villitis and TORCH-like features that are shown in Table 2; Figure 5A.

Table 2 – Main placental histopathological findings from infants with and without congenital disorder at birth.

First trimester (n = 1)	Third trimester (n = 23)	
Chronic villitis with TORCH-like features	Without congenital disorder (n = 15)	No pathological changes (n = 12)
• Lymphohistiocytic chronic villous inflammation		Delayed villous maturation with additional stromal changes* (n = 2)
• Edema		Mild acute funisitis (n = 1)
• Trophoblastic lesion	With Congenital Disorder (n = 8)	No pathological changes (n = 3)
• Increase in HCs		Delayed villous maturation with additional stromal changes* (n = 4)
• Increase in stromal lymphocytes		Umbilical artery agenesis (n = 1)
• Histiocytes in the intervillous spaces		

HCs, Hofbauer cells.

*Stromal changes:

- Persistence of the cytotrophoblastic layer
- Thickening of the trophoblastic basement membrane
- Stromal fibrosis
- Increase in the number of fetal capillaries
- Edematous or sclerotic villi
- Coarse calcification foci
- Hyperplasia of HCs
- Moderate increases in intervillous and perivillous fibrinoid deposits.

Eight of the 23 third trimester human placental tissue samples exhibited pathological features in routine H&E-stained sections (whereas placentas without pathological signs were observed in the remaining 15 cases). The most prevalent alteration was delayed villous maturation with additional stromal changes, such as hyperplasia of HCs (75%), as shown in Table 2; Figures 5B,C,E. Of the nine cases exhibiting pathological signs in the H&E staining, five were associated with congenital disorders (55.6%), and one evolved to a spontaneous abortion (first trimester placenta, case LRV/15 572). In the remaining 15 cases, no pathological evidence was observed in the H&E sections, but three of these cases presented with congenital disorders (20%; Tables 1, 2). Of the six cases with villous immaturity, four had a congenital disorder diagnosed at birth (66.7%), two had intrauterine fetal death (Table 1), one had acute funisitis, and one had umbilical artery agenesis (Table 2).

Morphometric analysis of the placentas from women infected during the third

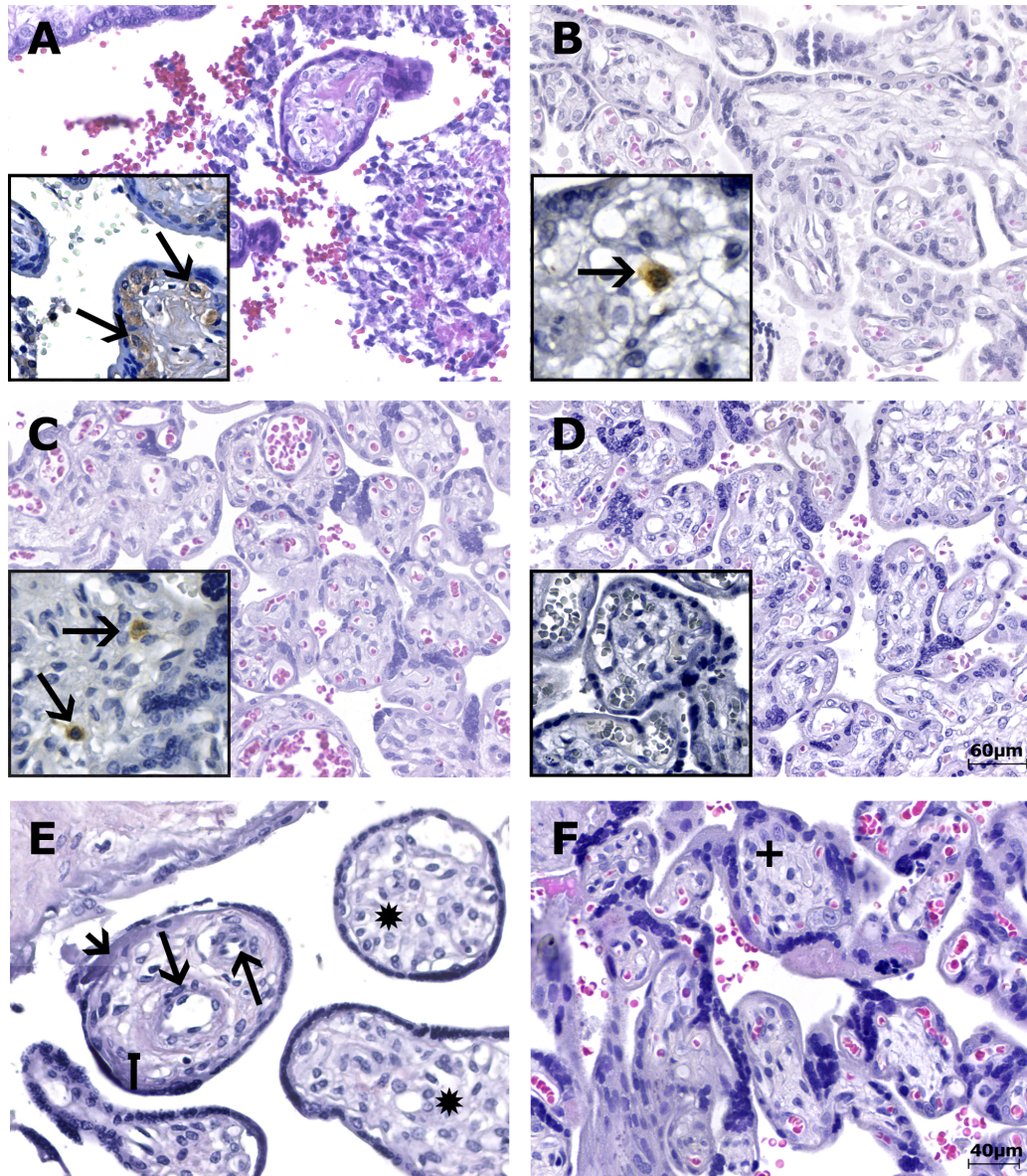


Figure 5 – Photomicrography of the placental samples stained with H&E or immunostained with anti-ZIKV MAb and stained with Harris's hematoxylin (squares). The scale bars are 60 μ m (A–D) and 40 μ m (E,F). (A) Case LRV/15 572–First trimester placenta sample (chorion frondosum) showing chronic villitis (TORCH-like) with lymphohistiocytic chronic villous inflammation. (B) Case LRV/16 515–Third trimester placenta sample (chorion frondosum) showing delayed villous maturation with additional stromal changes, such as stromal fibrosis. (C) Case LRV/16 845–Third trimester placenta sample (chorion frondosum) showing delayed villous maturation with persistence of the cytotrophoblastic layer, stromal fibrosis and reduced numbers of syncytial knots. (A–C) The squares highlight Hofbauer cells positive for anti-ZIKV MAb (arrows) inside the chorionic villi. Notice that the cytotrophoblast and syncytiotrophoblast cells, as well as other fibroblastic cells inside Wharton's jelly, are negative for anti-ZIKV MAb. (D) Negative control (ZIKV-negative patient)–Third trimester placenta sample (chorion frondosum) without pathological changes. Hofbauer cells are negative for anti-ZIKV MAb inside the chorionic villi (square). Note that the cytotrophoblast and syncytiotrophoblast cells, as well as other fibroblastic cells inside Wharton's jelly, are negative for the antibody used. (E) Case LRV/15 578–Third trimester placenta sample (chorion frondosum) showing delayed villous maturation with additional stromal changes, such as stromal fibrosis (square arrow), an increase in the number of fetal capillaries (arrows), hyperplasia of Hofbauer cells (*) and an increase in intravillous fibrinoid deposits (arrow head). (F) Negative control (ZIKV-negative patient)–Third trimester placenta sample (chorion frondosum) showing a normal number of Hofbauer cells (+). No delayed villous maturation or additional stromal changes were observed.

trimester of pregnancy confirmed the villous immaturity and hyperplasia of HCs (Figure 6). Syncytial knots and sprouts were quantified to demonstrate disorders of villus maturation, and a higher number of sprouts was detected in the ZIKV-infected group than in the control group ($p < 0.05$), regardless the gestational period of infection (Figure 6B). Villi and CD163 positive HCs were measured to evaluate hyperplasia of HCs. Compared to the placentas in the control group, the placentas from women infected with ZIKV during the third trimester showed increased numbers of HCs (hyperplasia; Figures 6C,D).

Immunohistochemical (IHC) analysis of the placental tissue samples using anti-flavivirus MAb (4G2) and anti-ZIKV MAb showed immunostaining in the HCs, regardless of the gestational age when ZIKV infection occurred (Figures 5A–C, 7E,F). The cytotrophoblast (CTB) and syncytiotrophoblast (STB) cells (chorion frondosum), as well as the fibroblastic cells and Wharton's jelly, were negative in all specimens (Figures 5, 7E,F). All umbilical cord (fibroblasts, Wharton's jelly, and amniotic epithelium), chorioamniotic membrane (capsular decidua, amniotic epithelium, and smooth chorion above the capsular decidua), and decidua basalis samples were consistently negative for the anti-ZIKV and anti-flavivirus monoclonal antibodies (Figures 7A–C). The intervillous space showed maternal inflammatory cell infiltrates that were positive for both the anti-flavivirus and anti-ZIKV MAbs in only the first trimester placental sample (LRV/15572) with villitis (Figure 7D). ZIKV infection of this sample was confirmed by RT-qPCR using RNA extracted from a FFPE tissue core corresponding to a villitis area [33].

2.4 DISCUSSION

In this study, we examined human placental samples from naturally infected women, focusing on the anatomopathological and morphological aspects of the samples and on determining which cells were targeted by ZIKV during pregnancy.

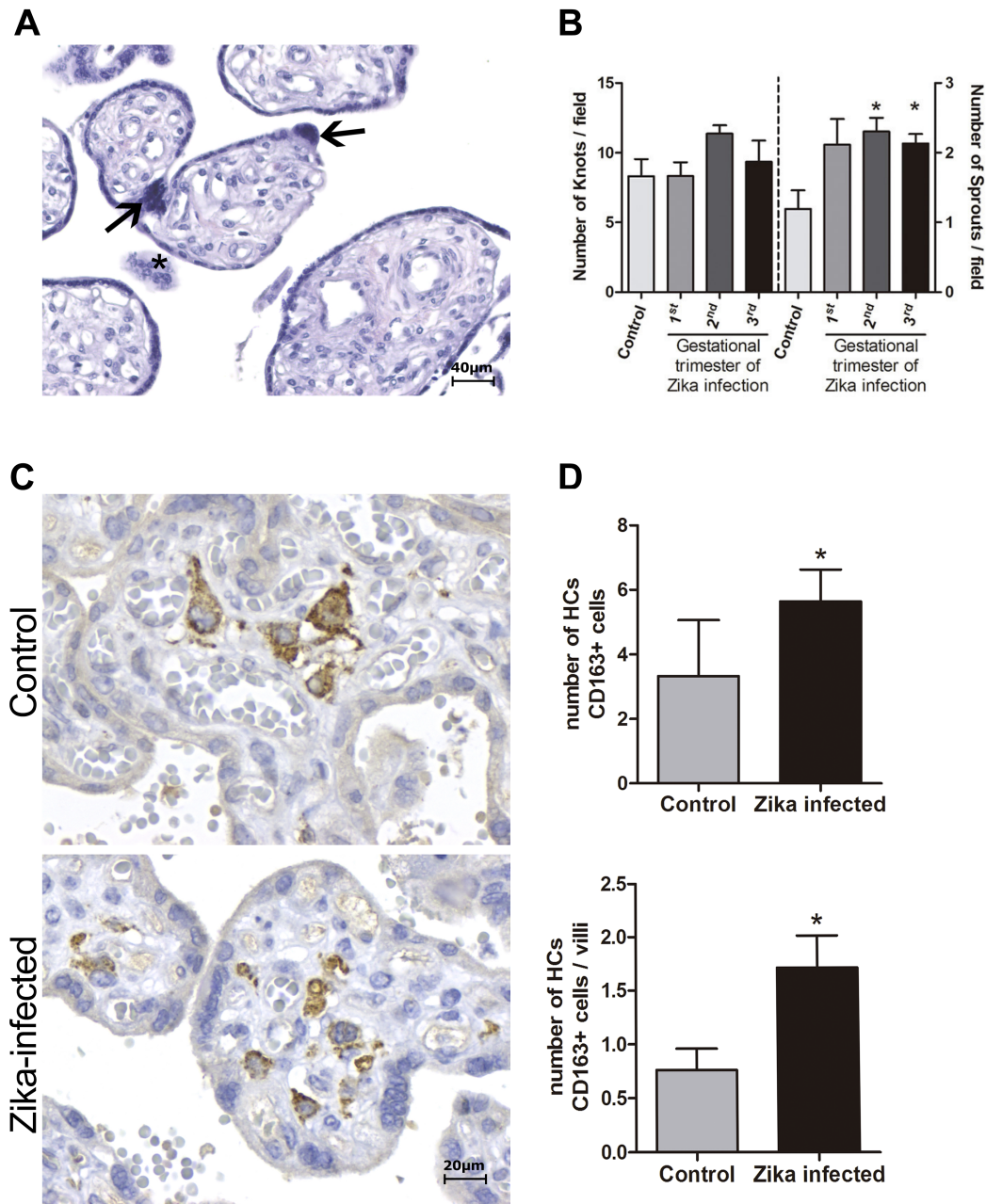


Figure 6 – Morphometric analysis of placental specimens from women infected with ZIKV during the pregnancy and from negative controls. **(A)** Photomicrography of a placental sample stained with H&E showing syncytial knots (arrows) and sprouts (*). **(B)** Quantification of knots and sprouts. A significant increase in the number of placental sprouts was observed in the groups whose mothers were infected with ZIKV during the first ($n = 4$), second ($n = 7$), or third ($n = 6$) trimester of pregnancy, when compared to the negative controls ($n = 6$). **(C)** Immunostaining with CD163 highlights Hofbauer cell hyperplasia in ZIKV-infected placentas. **(D)** Quantification of CD163+ Hofbauer cells. The average numbers of CD163+ cells and CD163+ cells per villus were significantly higher in the ZIKV-positive group ($n = 5$) than in the negative controls ($n = 3$). **(B,D)** Thirty high-power fields (HPFs = 400x) for each case were randomly selected for counting. The mean of the 30 fields was used for the statistical analyses. The ZIKV-infected and negative control groups were compared using either the One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test **(B)** or the Mann Whitney test **(D)**. The asterisks indicate statistically significant differences between the groups (* $p < 0.05$).

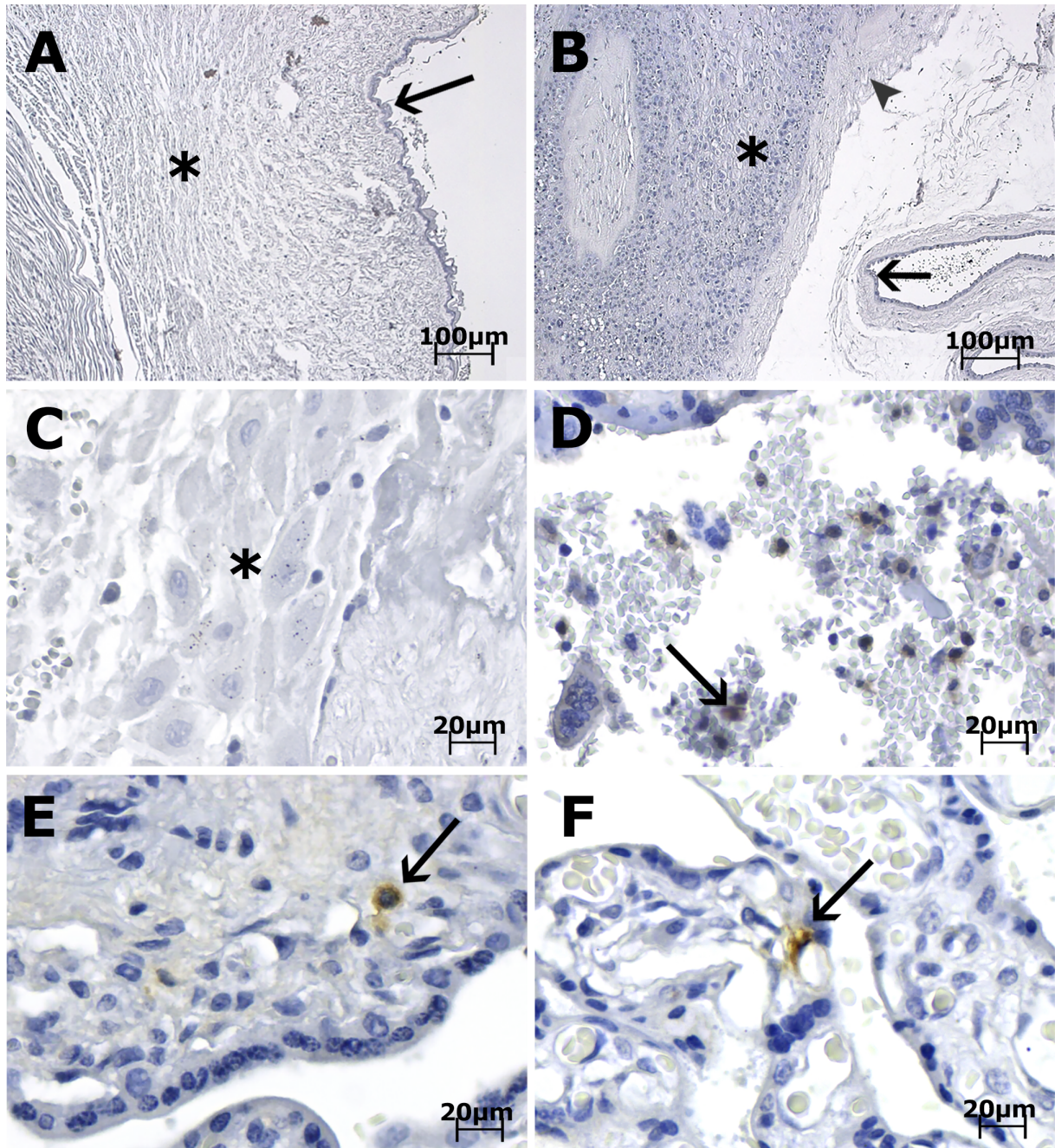


Figure 7 – Photomicrography of placenta, cord and membrane samples from women diagnosed as positive for ZIKV infection immunostained with anti-ZIKV MAb and stained with Harris's hematoxylin. The scale bars are 100 μ m (**A,B**) and 20 μ m (**C–F**). (**A**) Case LRV/16 515–Umbilical cord slides from a third trimester placenta negative for anti-ZIKV MAb. Fibroblasts in Wharton's jelly (*) and amniotic epithelium (arrow) are negative for the antibody used. (**B**) Case LRV/16 515–Chorioamniotic membrane from a third trimester placenta negative for anti-ZIKV MAb. Notice that the capsular decidua (*), the smooth chorion above the capsular decidua (arrowhead) and the amniotic epithelium (arrow) are negative for the antibody used. (**C**) Case LRV/16 515–Decidua basalis (*) from a third trimester placenta negative for anti-ZIKV MAb. (**D**) Case LRV/15 572–Intervillous space from a first trimester placenta with inflammatory cell infiltrates positive for anti-ZIKV MAb (arrow). (**E**) Case LRV/16 927 and (**F**) Case LRV/16 848: Chorion frondosum from third trimester placentas showing Hofbauer cells positive for anti-ZIKV MAb (arrows) inside the chorionic villi. Notice that the cytotrophoblast and syncytiotrophoblast cells, as well as fibroblastic cells inside Wharton's jelly, are negative for the antibody used.

The main histological findings (from H&E sections) in the placental tissues from women that were infected with ZIKV at different gestational periods were villous immaturity and stromal changes, such as hyperplasia of HCs, stromal fibrosis, edema of stromal villi, sclerotic villi, calcification foci and fibrinoid deposits (Table 2). Although studies on naturally infected placental tissues are limited, two previous reports corroborate our findings [37, 60]. Both reports detected chorionic villi with calcification, fibrosis, perivillous fibrin deposition, patchy intervillitis and focal villitis in the cases that presented pathological signs. Conversely, tissues from several ZIKV-positive samples had normal-appearing chorionic villi, in agreement with the results shown in Table 2 [5, 60].

Morphometric analysis showed enhancement of the number of HCs and syncytial sprouts (indicating a villous maturation disorder) in the placentas of women infected with ZIKV at late gestational periods compared to the numbers of these features in the control group placentas. Syncytial knots are specializations in the syncytiotrophoblast, and an increase in these structures in late gestation indicates placental pathology and can be used to evaluate villous maturity. Syncytial sprouts are markers of trophoblast proliferation; they are seen frequently during early pregnancy and are increased in many diseases [100]. These findings agree with the results of a study showing the damaging effect of type I interferon (INF I) on *ex vivo* human mid-gestation placental tissues treated with INF- β . The authors demonstrated that type I INFs trigger fetal death in a mouse model and that treatment of *ex vivo* human placentas with INF- β induces morphological changes in the villi, such as syncytial knots and sprouts [101].

Immunohistochemical analysis revealed that HCs were the only ZIKV-positive fetal cells in the naturally infected human placental samples examined in this study, regardless of the gestational period at which infection occurred, and that HCs remain persistently infected until the time of delivery. It is noteworthy that even in the tissue samples from women infected in late pregnancy, *i.e.*, with a short interval between the acute phase of infection and delivery time (LRV/16 854, 16 859, 16 931, 16 848, 16 927, and 16 284), ZIKV was detected exclusively in HCs (Table 1).

HCs are placental villous macrophages of fetal origin, and alterations in their

numbers (hyperplasia) and biological features are associated with complications in pregnancy. HCs play a role in diverse functions, such as placental vasculogenesis, immune regulation and the secretion of enzymes and cytokines across the maternal-fetal barrier. In addition, the results from a double-labeling assay showed the association of sprouty proteins (implicated in villus branch morphogenesis) with HCs, suggesting the involvement of HCs in the development of placental villi [85].

HCs are categorized as placental M2 macrophages, and their location and migratory behavior confer an ability to move around the villous stroma and to make transient contacts with other macrophages and villous core cells [102, 103].

Another fact worth mentioning is the apparent correlation between villous immaturity and congenital disorders caused by ZIKV infection since we observed the occurrence of fetal malformations in four out of six cases (66.7%) of villous immaturity (observed in H&E staining and morphometric analysis). Furthermore, villous immaturity may be related to an increase in HCs, the cells that sustain the presence of ZIKV in the placenta. These data could be valuable to pathologists and neonatologists following up on newborns exposed to ZIKV by vertical transmission.

Of note, the case of the first trimester placenta with villitis (LRV/15 572) exhibited ZIKV-positive maternal inflammatory cells in the intervillous space. Although positivity in fetal endothelium and maternal leukocytes [60], and in decidual cells, CTBs and mesenchymal cells of chorionic villi [40] in a few first trimester placentas has also been reported, we speculate that maternal or other fetal cells may be infected only transiently. In support of this hypothesis, studies of natural ZIKV infections using either IHC or in situ hybridization analysis (ISH) have also reported that HCs were the most frequently observed infected cells [33, 37, 48, 78].

The persistence of ZIKV-positive fetal HCs in full-term placentas regardless of the period at which infection occurred indicates that ZIKV can persist in the placenta for several months after maternal infection and may provide a viral source for continued fetal infection.

Examination of the entire human placenta, comprising the umbilical cord, amni-

otic membrane, chorion frondosum (CTB and STB), smooth chorion, capsular decidua, and decidua basalis, revealed that all these tissues were consistently negative for ZIKV infection. Mlakar *et al.* [50] reported similar findings in a single case. Rabelo *et al.* [104] showed ZIKV NS1 protein in the decidual and endothelial cells of the maternal decidua and in CTB, STB, and HCs in the third trimester placental tissues associated with an HIV-exposed but uninfected infant with severe congenital Zika syndrome. Nonetheless, the maternal HIV infection could have contributed to the permissiveness of other maternal/placental cell types to ZIKV infection.

Thus, we suggest that the most plausible hypothesis for the transplacental transmission of ZIKV would be related to its association with HCs and its migratory ability to reach the fetal vessels and then infect the fetus either by transcytosis or through ZIKV-infected “Trojan horse” cells [75].

Furthermore, as both ZIKV genomic material and viral particles are detected in placental cells until the end of pregnancy (regardless of the trimester in which infection occurred), it is plausible to speculate that the infection of the fetus could happen as a secondary event, i.e., not necessarily concomitant with the maternal acute phase of disease [95]. In this case, understanding the biology of HCs after ZIKV infection is of utmost importance in explaining the different congenital outcomes related to ZIKV infection [86].

We emphasize that a negative ZIKV detection (by RT-qPCR or IHC) in a placental sample does not exclude the possibility of maternal ZIKV infection. Possible reasons for false negative results include ZIKV RNA/protein levels below the limit of detection of the employed assays, RNA degradation due to storage/shipping processes or variability in tissue sampling, and the viral strain. For example, eight of the pregnant women described in Table 1 had ZIKV infection confirmed by RT-qPCR in the serum sample during the acute phase of infection, but no viral RNA/protein was detected in their placental tissues.

Conversely, in this study, ZIKV was also detected in placental samples from nine women who had an onset of ZIKV clinical symptoms during the first, second or

third trimester but gave birth to normal infants. Abnormalities in these infants may have been prevented because placental integrity limited viral spreading from mother to fetus. However, we cannot exclude fetal exposure to ZIKV, and it is noteworthy that, in some cases, abnormalities are only detected months after delivery [1, 105]. Serological examination and clinical follow-up of the newborns are required to confirm and define the diagnosis. Periodic monitoring of these infants may be helpful for the early recognition of future sequelae from congenital infection [48]. In conclusion, tissue analysis provides the opportunity to confirm maternal/placental ZIKV infection, which may alert the practitioner to the potential for a congenital disorder in the child.

3 CONCLUSÃO

Considerando que as alterações observadas nas amostras de gestantes naturalmente infectadas pelo ZIKV, em comparação com amostras de gestantes saudáveis, pode contribuir para o entendimento de alguns aspectos da fisiopatologia dessa doença, destacam-se as seguintes conclusões:

- a) a infecção pelo ZIKV está associada a alterações histológicas placentárias ao exame anatomopatológico realizado em coloração de rotina (H&E). Tais alterações incluem imaturidade vilosa associada a alterações estromais em amostras de terceiro trimestre gestacional, indicando anormalidades do desenvolvimento placentário após a infecção. A infecção pelo ZIKV está associada a alterações vilositárias inflamatórias (vilosite) apenas em amostra de primeiro trimestre gestacional;
- b) a infecção pelo ZIKV está associada a aumento significativo do número de brotos sinciciais em placentas de mulheres infectadas, o que constitui parâmetro quantitativo que corrobora as alterações descritas ao exame anatomopatológico, refletindo a imaturidade vilositária detectada nessas amostras;
- c) a infecção pelo ZIKV está associada a aumento significativo do número de células de Hofbauer no estroma vilositário, identificadas por positividade para CD163 em análise quantitativa, em amostras de mulheres infectadas no terceiro trimestre gestacional, o que sugere que as células de Hofbauer possam desempenhar um papel no mecanismo fisiopatológico de transmissão vertical do ZIKV;
- d) a infecção pelo ZIKV está associada a presença de antígenos virais detectáveis em tecido placentário por método imuno-histoquímico, com dis-

tribuição restrita a células de Hofbauer, tanto em gestantes com infecção aguda recente (no terceiro trimestre) quanto mais antiga (primeiro e segundo trimestres), o sugere que tais células possam constituir reservatório para o vírus.

- e) a detecção de antígenos virais na placenta permitiu confirmar a infecção pelo ZIKV nos casos em que amostras de soro obtidas durante a fase aguda da infecção não estavam disponíveis, o que reforça a importância dessa técnica na identificação de possíveis causas de anomalias congênitas;
- f) os conceitos com desfecho clínico desfavorável, quer sejam malformações ou óbito, exibiam mais frequentemente alterações anatomopatológicas placentárias, embora não tenha sido identificada correlação entre a idade gestacional em que ocorreu a infecção, a positividade imuno-histoquímica de células de Hofbauer nos tecidos placentários e a presença de malformações congênitas ao nascimento.

3.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Embora os resultados publicados e discutidos previamente sejam relevantes, eles representam apenas parte do projeto delineado inicialmente. Faz-se necessário continuar este trabalho, finalizando a avaliação morfométrica de brotos e nós sinciciais, assim como a quantificação de células de Hofbauer nos demais casos que constituem os grupos estudo e controle.

Para tornar ainda mais robustas as conclusões já vislumbradas, é pertinente ampliar a avaliação morfométrica, aplicando-a a outros parâmetros, por exemplo, a medida do tamanho das vilosidades (tanto o diâmetro quanto o perímetro), para documentar de maneira mais completa as alterações vilositárias maturativas. Do mesmo

modo, é possível caracterizar quantitativamente as alterações morfológicas estromais, como a medida da espessura da membrana basal, aferição da quantidade de microcalcificações, de fibrose e deposição de fibrina.

Pode-se ainda, após quantificação de células de Hofbauer, avaliar seu perfil fenotípico dentro das subpopulações de macrófagos, o que reflete sua atuação e poderia contribuir para a compreensão do papel que essas células desempenham nesse contexto.

Por fim, a inclusão de um grupo controle positivo à análise constituído, por exemplo, por casos de pacientes infectadas por outra TORCH como o HIV, cuja expressão morfológica em termos de alterações placentárias é semelhante [94], porém com mecanismos fisiopatológicos melhor compreendidos, enriqueceria a discussão.

As sugestões acima apresentadas encontram-se reunidas no Projeto de Progressão para Doutorado da Autora incluído no Apêndice deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- 1 ARAGAO, M. F. V. V.; HOLANDA, A. C.; BRAINER-LIMA, A. M.; PETRIBU, N. C. L.; CASTILLO, M.; LINDEN, V. van der; SERPA, S. C.; TENÓRIO, A. G.; TRAVASSOS, P. T. C.; CORDEIRO, M. T.; SARTESCHI, C.; VALENCA, M. M.; COSTELLO, A. 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”? **American Journal of Neuroradiology**, v. 38, n. 7, p. 1427–1434, 2017.
- 2 ZANLUCA, C.; DE MELO, V. C. A.; MOSIMANN, A. L. P.; DOS SANTOS, G. I. V.; DOS SANTOS, C. N. D.; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 569–572, 2015.
- 3 CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, 2015.
- 4 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Zika virus outbreaks in the Americas. **Weekly Epidemiological Record**, v. 90, n. 45, p. 609–616, 2015.
- 5 MARTINES, R. B.; BHATNAGAR, J.; KEATING, M. K.; SILVA-FLANNERY, L.; MUEHLENBACHS, A.; GARY, J.; GOLDSMITH, C.; HALE, G.; RITTER, J.; ROLLIN, D.; SHIEH, W. J.; LUZ, K. G.; RAMOS, A. M. de O.; DAVI, H. P. F.; DE OLIVERIA, W. K.; LANCIOTTI, R.; LAMBERT, A.; ZAKI, S. Evidence of Zika virus infection in brain and placental tissues from two congenitally infected newborns and two fetal losses. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 6, p. 159–160, 2016.
- 6 SAMPATHKUMAR, P.; SANCHEZ, J. L. Zika virus in the Americas: a review for clinicians. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 91, n. 4, p. 514–521, 2016.
- 7 FRANÇA, G. V. A.; SCHULER-FACCINI, L.; OLIVEIRA, W. K.; HENRIQUES, C. M. P.; CARMO, E. H.; PEDI, V. D.; NUNES, M. L.; CASTRO, M. C.; SERRUYA, S.; SILVEIRA, M. F.; BARROS, F. C.; VICTORA, C. G. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. **The Lancet**, v. 388, p. 891–897, 2016.
- 8 SCHULER-FACCINI, L.; RIBEIRO, E. M.; FEITOSA, I. M. L.; HOROVITZ, D. D. G.; CAVALCANTI, D. P.; PESSOA, A.; DORIQUEI, M. J. R.; NERI, J. I.; NETO, J. M. de P.; WANDERLEY, H. Y. C.; CERNACH, M.; EL-HUSNY, A. S.; PONE, M. V. S.; SERAO, C. L. C.; SANSEVERINO, M. T. V. Possible association between Zika virus infection and microcephaly – Brazil, 2015. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 59–62, 2016.

- 9 CAUCHEMEZ, S.; BESNARD, M.; BOMPARD, P.; DUB, T.; GUILLEMETTE-ARTUR, P.; EYROLLE-GUIGNOT, D.; SALJE, H.; VAN KERKHOVE, M. D.; ABADIE, V.; GAREL, C.; FONTANET, A.; MALLET, H. P. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–2015: a retrospective study. **The Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2125–2132, 2016.
- 10 SARNO, M.; SACRAMENTO, G. A.; KHOURI, R.; DO ROSÁRIO, M. S.; COSTA, F.; ARCHANJO, G.; SANTOS, L. A.; NERY, N.; VASILAKIS, N.; KO, A. I.; DE ALMEIDA, A. R. P. Zika virus infection and stillbirths: a case of hydrops fetalis, hydranencephaly and fetal demise. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004517, 2016.
- 11 MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 52, 2016. **Boletim Epidemiológico – Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 48, n. 3, 2017.
- 12 MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 52, 2017. **Boletim Epidemiológico – Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 49, n. 2, 2018.
- 13 MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 52 de 2018. **Boletim Epidemiológico – Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 50, n. 4, 2019.
- 14 MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 5 de 2019. **Boletim Epidemiológico – Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 50, n. 5, 2019.
- 15 MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a semana epidemiológica 45 de 2018. **Boletim Epidemiológico – Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 49, n. 54, 2018.
- 16 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Director-General Summarizes the Outcome of the Emergency Committee Regarding Clusters of Microcephaly and Guillain-Barré Syndrome**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/emergency-committee-zika-microcephaly/en/>>. Acesso em: janeiro de 2018.
- 17 GARCIA, E.; YACTAYO, S.; NISHINO, K.; MILLOT, V.; PEREA, W.; BRIAND, S. Zika virus infection: global update on epidemiology and potentially associated clinical manifestations. **WHO Weekly epidemiological record**, v. 91, n. 7, p. 73–88, 2016.
- 18 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Zika, microcephaly, Guillain-Barré syndrome. **Situation Report**, 2017. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254714/zikasitrep10Mar17-eng.pdf>>. Acesso em: janeiro de 2018.

- 19 DUFFY, M. R.; CHEN, T.-H.; HANCOCK, W. T.; POWERS, A. M.; KOOL, J. L.; LANCIOTTI, R. S.; PRETRICK, M.; MARFEL, M.; HOLZBAUER, S.; DUBRAY, C.; GUILLAUMOT, L.; GRIGGS, A.; BEL, M.; LAMBERT, A. J.; LAVEN, J.; KOSOY, O.; PANELLA, A.; BIGGERSTAFF, B. J.; FISCHER, M.; HAYES, E. B. Zika virus outbreak on yap island, federated states of micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.
- 20 CAO-LORMEAU, V.-M.; ROCHE, C.; TEISSIER, A.; ROBIN, E.; BERRY, A.-L.; MALLET, H.-P.; SALL, A. A.; MUSSO, D. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Disease**, v. 20, n. 6, p. 1085–1086, 2014.
- 21 ZANLUCA, C.; DOS SANTOS, C. N. D. Zika virus – an overview. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 5, p. 295–301, 2016.
- 22 D'ORTENZIO, E.; MATHERON, S.; DE LAMBALLERIE, X.; HUBERT, B.; PIORKOWSKI, G.; MAQUART, M.; DESCAMPS, D.; DAMOND, F.; YAZDANPANAH, Y.; LEPARC-GOFFART, I. Evidence of sexual transmission of Zika virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 22, p. 2195–2198, 2016.
- 23 TURMEL, J. M.; ABGUEGUEN, P.; HUBERT, B.; VANDAMME, Y. M.; MAQUART, M.; GUILLOU-GUILLEMETTE, H. L.; LEPARC-GOFFART, I. Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in the semen. **The Lancet**, v. 387, n. 10037, p. 2501, 2016.
- 24 MUSSO, D.; ROCHE, C.; ROBIN, E.; NHAN, T.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU, V. M. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015.
- 25 NICASTRI, E.; CASTILLETI, C.; LIUZZI, G.; IANNETTA, M.; CAPOBIANCHI, M. R.; IPPOLITO, G. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 32, p. 30314, 2016.
- 26 LEUNG, G. H. Y.; BAIRD, R. W.; DRUCE, J.; ANSTEY, N. M. Zika virus infection in Australia following a monkey bite in Indonesia. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 46, p. 460—464, 2015.
- 27 PLOURDE, A. R.; BLOCH, E. M. A literature review of Zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 1185–1192, 2016.
- 28 DE CARVALHO, N. S.; DE CARVALHO, B. F.; FUGAÇA, C. A.; DÓRIS, B.; BISCAIA, E. S. Zika virus infection during pregnancy and microcephaly occurrence: a review of literature and brazilian data. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 282–289, 2016.
- 29 DRIGGERS, R. W.; HO, C.-Y.; KORHONEN, E. M.; KUIVANEN, S.; JÄÄS-KELÄINEN, A. J.; SMURA, T.; ROSENBERG, A.; HILL, D. A.; DEBIASI, R. L.; VEZINA, G.; TIMOFEEV, J.; RODRIGUEZ, F. J.; LEVANOV, L.; RAZAK, J.; IYENGAR, P.; HENNENFENT, A.; KENNEDY, R.; LANCIOTTI, R.; DU PLESSIS, A.; VAPALAHTI, O. Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 22, p. 2142–2151, 2016.

- 30 INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Virus Taxonomy: 2016 Release**. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: janeiro de 2018.
- 31 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Zika and Pregnancy**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/pregnancy/zika/index.html>>. Acesso em: janeiro de 2018.
- 32 LESSLER, J.; CHAISSON, L. H.; KUCIRKA, L. M.; BI, Q.; GRANTZ, K.; SALJE, H.; CARCELEN, A. C.; OTT, C. T.; SHEFFIELD, J. S.; FERGUSON, N. M.; CUMMINGS, D. A. T.; METCALF, C. J. E.; RODRIGUEZ-BARRAQUER, I. Assessing the global threat from Zika virus. **Science**, v. 353, p. aaf8160, 2016.
- 33 DE NORONHA, L.; ZANLUCA, C.; AZEVEDO, M. L. V.; LUZ, K. G.; DOS SANTOS, C. N. D. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 287–293, 2016.
- 34 BRAULT, J. B.; KHOU, C.; BASSET, J.; COQUAND, L.; FRAISIER, V.; FRENKIEL, M. P.; GOUD, B.; MANUGUERRA, J. C.; PARDIGON, N.; BAFFET, A. D. Comparative analysis between flaviviruses reveals specific neural stem cell tropism for Zika virus in the mouse developing neocortex. **EBioMedicine**, v. 10, p. 71–76, 2016.
- 35 PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Zika Resources: Case Definitions**. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11117&Itemid=41532&lang=en>. Acesso em: janeiro de 2018.
- 36 DE CARVALHO, N. S.; DE CARVALHO, B. F.; DÓRIS, B.; BISCAIA, E. S.; FUGAÇA, C. A.; DE NORONHA, L. Zika virus and pregnancy: an overview. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 77, n. 2, p. e12616, 2017.
- 37 MARTINES, R. B.; BHATNAGAR, J.; RAMOS, A. M. de O.; DAVI, H. P. F.; IGLEZIAS, S. D.; KANAMURA, C. T.; KEATING, M. K.; HALE, G.; SILVA-FLANNERY, L.; MUEHLENBACHS, A.; RITTER, J.; GARY, J.; ROLLIN, D.; GOLDSMITH, C. S.; REAGAN-STEINER, S.; ERMIA, Y.; SUZUKI, T.; LUZ, K. G.; DE OLIVEIRA, W. K.; LANCIOTTI, R.; LAMBERT, A.; SHIEH, W.-J.; ZAKI, S. R. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. **The Lancet**, v. 388, n. 10047, p. 898—904, 2016.
- 38 DE SOUZA, A. S.; DIAS, C. M.; BRAGA, F. D. C. B.; TERZIAN, A. C. B.; ESTOFOLETE, C. F.; OLIANI, A. H.; OLIVEIRA, G. H.; DE MATTOS, C. C. B.; DE MATTOS, L. C.; NOGUEIRA, M. L.; VAZ-OLIANI, D. C. M. Fetal infection by Zika virus in the third trimester: report of 2 cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 12, p. 1622–1625, 2016.
- 39 HUGHES, B. W.; ADDANKI, K. C.; SRISKANDA, A. N.; MCLEAN, E.; BAGASRA, O. Infectivity of immature neurons to Zika virus: a link to Congenital Zika Syndrome. **EBioMedicine**, v. 10, p. 65–70, 2016.

- 40 RABELO, K.; SOUZA, L. J.; SALOMÃO, N. G.; OLIVEIRA, E. R. A.; SENTINELLI, L. de P.; LACERDA, M. S.; SARAQUINO, P. B.; ROSMAN, F. C.; OLIVEIRA, R. B. de; CARVALHO, J. J.; PAES, M. V. Placental inflammation and fetal injury in a rare Zika case associated with Guillain-Barré syndrome and abortion. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1018, 2018.
- 41 BECKHAM, J. D.; PASTULA, D. M.; MASSEY, A.; TYLER, K. L. Zika virus as an emerging global pathogen: neurological complications of Zika virus. **JAMA Neurology**, v. 73, n. 7, p. 875–879, 2016.
- 42 OEHLER, E.; WATRIN, L.; LARRE, P.; LEPARC-GOFFART, I.; LASTÈRE, S.; VALOUR, F.; BAUDOUIN, L.; MALLET, H. P.; MUSSO, D.; GHAWCHE, F. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré Syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 9, p. e20720, 2014.
- 43 CAO, B.; DIAMOND, M. S.; MYSOREKAR, I. U. Maternal-fetal transmission of Zika virus: routes and signals for infection. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 37, n. 7, p. 287–294, 2017.
- 44 IOOS, S.; MALLET, H.-P.; GOFFART, I. L.; GAUTHIER, V.; CARDOSO, T.; HERIDA, M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014.
- 45 WEAVER, S. C.; COSTA, F.; GARCIA-BLANCO, M. A.; KO, A. I.; RIBEIRO, G. S.; SAADE, G.; SHI, P.-Y.; VASILAKIS, N. Zika virus: history, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Research**, v. 130, p. 69–80, 2016.
- 46 O'LEARY, D. R.; KUHN, S.; KNISS, K. L.; HINCKLEY, A. F.; RASMUSSEN, S. A.; PAPE, W. J.; KIGHTLINGER, L. K.; BEECHAM, B. D.; MILLER, T. K.; NEITZEL, D. F.; MICHAELS, S. R.; CAMPBELL, G. L.; LANCIOTTI, R. S.; HAYES, E. B. Birth outcomes following west Nile virus infection of pregnant women in the United States: 2003-2004. **Pediatrics**, v. 117, n. 3, p. e537–e545, 2006.
- 47 ALPERT, S. G.; FERGERSON, J.; NOEL, L.-P. Intrauterine west Nile virus: ocular and systemic findings. **American Journal of Ophthalmology**, v. 136, n. 4, p. 733–735, 2003.
- 48 BHATNAGAR, J.; RABENECK, D. B.; MARTINES, R. B.; REAGAN-STEINER, S.; ERMIA, Y.; ESTETTER, L. B. C.; SUZUKI, T.; RITTER, J.; KEATING, M. K.; HALE, G.; GARY, J.; MUEHLENBACHS, A.; LAMBERT, A.; LANCIOTTI, R.; ODUYEBO, T.; MEANEY-DELMAN, D.; BOLAÑOS, F.; SAAD, E. A. P.; SHIEH, W.-J.; ZAKI, S. R. Zika virus RNA replication and persistence in brain and placental tissue. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 405–414, 2017.
- 49 CALVET, G.; AGUIAR, R. S.; MELO, A. S. O.; SAMPAIO, S. A.; DE FILIPPIS, I.; FABRI, A.; ARAUJO, E. S. M.; DE SEQUEIRA, P. C.; DE MENDONÇA, M. C. L.; DE OLIVEIRA, L.; TSCHOEKE, D. A.; SCHRAGO, C. G.; THOMPSON, F. L.; BRASIL, P.; DOS SANTOS, F. B.; NOGUEIRA, R. M. R.; TANURI, A.; DE FILIPPIS, A. M. B. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 653–660, 2016.

- 50 MLAKAR, J.; KORVA, M.; TUL, N.; POPOVIĆ, M.; POLJŠAK-PRIJATELJ, M.; MRAZ, J.; KOLENC, M.; RUS, K. R.; VIPOTNIK, T. V.; VODUŠEK, V. F.; VIZJAK, A.; PIŽEM, J.; PETROVEC, M.; ŽUPANC, T. A. Zika virus associated with microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–958, 2016.
- 51 BRASIL, P.; PEREIRA, J. P.; GABAGLIA, C. R.; DAMASCENO, L.; WAKIMOTO, M.; NOGUEIRA, R. M. R. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 2016.
- 52 SOUSA, A. Q.; CAVALCANTE, D. I. M.; FRANCO, L. M.; ARAÚJO, F. M. C.; SOUSA, E. T.; VALENÇA-JUNIOR, J. T.; ROLIM, D. B.; MELO, M. E. L.; SINDEAUX, P. D. T.; ARAÚJO, M. T. F.; PEARSON, R. D.; WILSON, M. E.; POMPEU, M. M. L. Postmortem findings for 7 neonates with congenital Zika virus infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 7, p. 1164–1167, 2017.
- 53 D. A. SCHWARTZ. Viral infection, proliferation, and hyperplasia of Hofbauer cells and absence of inflammation characterize the placental pathology of fetuses with congenital Zika virus infection. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 295, n. 6, p. 1361–1368, 2017.
- 54 COYNE, C. B.; LAZEAR, H. M. Zika virus – reigniting the TORCH. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 707–715, 2016.
- 55 ARORA, N.; SADOVSKY, Y.; DERMODY, T. S.; COYNE, C. B. Microbial vertical transmission during pregnancy. **Cell Host and Microbe**, v. 21, n. 2, p. 561–567, 2017.
- 56 MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika virus pathogenesis and tissue tropism. **Cell Host & Microbe**, v. 21, n. 2, p. 134–142, 2017.
- 57 DANG, J.; TIWARI, S. K.; LICHINCHI, G.; QIN, Y.; PATIL, V. S.; EROSHKIN, A. M.; RANA, T. M. Zika virus depletes neural progenitors in human cerebral organoids through activation of the innate immune receptor TLR3. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 2, p. 258–265, 2016.
- 58 ONORATI, M.; LI, Z.; LIU, F.; SOUSA, A. M. M.; NAKAGAWA, N.; LI, M.; DELL'ANNO, M. T.; GULDEN, F. O.; POCHAREDDY, S.; TEBBENKAMP, A. T. N.; HAN, W.; PLETIKOS, M.; GAO, T.; ZHU, Y.; BICHSEL, C.; VARELA, L.; SZIGETI-BUCK, K.; LISGO, S.; ZHANG, Y.; TESTEN, A.; GAO, X.-B.; MLAKAR, J.; POPOVIC, M.; STRITTMATTER, S. M.; KACZMAREK, L. K.; ANTON, E. S.; HORVATH, T. L.; LINDENBACH, B. D.; SESTAN, N. Zika virus disrupts phospho-TBK1 localization and mitosis in human neuroepithelial stem cells and radial glia. **Cell Reports**, v. 16, n. 10, p. 2576–2592, 2016.
- 59 COSTELLO, A.; DUA, T.; DURAN, P.; GÜLMEZOGLUV, M.; OLADAPO, O. T.; PEREA, W.; PIRES, J.; RAMON-PARDO, P.; ROLLINS, N.; SAXENA, S. Defining the syndrome associated with congenital Zika virus infection. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, p. 406–406A, 2016.

- 60 RITTER, J. M.; MARTINES, R. B.; ZAKIR, S. R. Zika virus: pathology from the pandemics. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 141, n. 1, p. 49–59, 2017.
- 61 MELO, A. S. de O.; AGUIAR, R. S.; AMORIM, M. M. R.; ARRUDA, M. B.; MELO, F. de O.; RIBEIRO, S. T. C.; BATISTA, A. G. M.; FERREIRA, T.; DOS SANTOS, M. P.; SAMPAIO, V. V.; MOURA, S. R. M.; RABELLO, L. P.; GONZAGA, C. E.; MALINGER, G.; XIMENES, R.; SZEJNFELD, P. S. de Oliveira; TOVAR-MOLL, F.; CHIMELLI, L.; SILVEIRA, P. P.; DELVECHIO, R.; HIGA, L.; CAMPANATI, L.; NOGUEIRA, R. M. R.; FILIPPIS, A. M. B.; SZEJNFELD, J.; VOLOCH, C. M.; FERREIRA JR., O. C.; BRINDEIRO, R. M.; TANURI, A. Congenital Zika virus infection: beyond neonatal microcephaly. **JAMA Neurology**, v. 73, n. 12, p. 1407–1416, 2016.
- 62 LINDEN, V. van der; ROLIM FILHO, E. L.; LINS, O. G.; LINDEN, A. van der; ARAGÃO, M. de F. V. V.; BRAINER-LIMA, A. M.; CRUZ, D. C. S.; ROCHA, M. A. W.; DA SILVA, P. F. S.; CARVALHO, M. D. C. G.; AMARAL, F. J. do; GOMES, J. A.; DE MEDEIROS, I. C. R.; VENTURA, C. V.; RAMOS, R. C. Congenital Zika Syndrome with arthrogryposis: retrospective case series study. **British Medical Journal**, v. 354, p. i3899, 2016.
- 63 BARKOVICH, A. J.; GUERRINI, R.; KUZNIECKY, R. I.; JACKSON, G. D.; DOBYNS, W. B. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. **Brain**, v. 135, n. 5, p. 1348–1369, 2012.
- 64 TANG, H.; HAMMACK, C.; OGDEN, S. C.; WEN, Z.; QIAN, X.; LI, Y.; YAO, B.; SHIN, J.; ZHANG, F.; LEE, E. M.; CHRISTIAN, K. M.; DIDIER, R. A.; JIN, P.; SONG, H.; MING, G. I. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 587–590, 2016.
- 65 HONEIN, M. A.; DAWSON, A. L.; PETERSEN, E. E.; JONES, A. M.; LEE, E. H.; YAZDY, M. M.; AHMAD, N.; MACDONALD, J.; EVERT, N.; BINGHAM, A.; ELLINGTON, S. R.; SHAPIRO-MENDOZA, C. K.; ODUYEBO, T.; FINE, A. D.; BROWN, C. M.; SOMMER, J. N.; GUPTA, J.; CAVICCHIA, P.; SLAVINSKI, S.; WHITE, J. L.; OWEN, S. M.; PETERSEN, L. R.; BOYLE, C.; MEANEY-DELMAN, D.; JAMIESON, D. J. Birth defects among fetuses and infants of us women with evidence of possible Zika virus infection during pregnancy. **JAMA**, v. 317, n. 1, p. 59–68, 2017.
- 66 MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. **The Developing Human: Clinically Oriented Embryology**. 10. ed. Philadelphia: Elsevier, 2012.
- 67 GARCIA, A.; AZOUBEL, R. **A Placenta Humana: Morfologia e Patologia Fetal e Perinatal**. 1. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1986.
- 68 CHATUPHONPRASERT, W.; JARUKAMJORN, K.; ELLINGER, I. Physiology and pathophysiology of steroid biosynthesis, transport and metabolism in the human placenta. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 1027, p. 1–29, 2018.
- 69 BENIRSCHKE, K.; BURTON, G. J.; BAERGEN, R. N. **Pathology of the Human Placenta**. 6. ed. Heidelberg: Springer, 2012.

- 70 MALTEPE, E.; FISHER, S. J. Placenta: the forgotten organ. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 31, n. 1, p. 523–552, 2015.
- 71 ZELDOVICH, V. B.; CLAUSEN, C. H.; BRADFORD, E.; FLETCHER, D. A.; MALTEPE, E.; ROBBINS, J. R.; BAKARDJIEV, A. I. Placental syncytium forms a biophysical barrier against pathogen invasion. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 12, p. e1003821, 2013.
- 72 CORRY, J.; ARORA, N.; GOOD, C. A.; SADOVSKY, Y.; COYNE, C. B. Organotypic models of type III interferon-mediated protection from Zika virus infections at the maternal–fetal interface. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 35, p. 9433–9438, 2017.
- 73 LUO, H.; WINKELMANN, E. R.; FERNANDEZ-SALAS, I.; LI, L.; MAYER, S. V.; DANIZ-LOZANO, R.; SANCHEZ-CASAS, R. M.; VASILAKIS, N.; TESH, R.; BARRETT, A. D.; WEAVER, S. C.; WANG, T. Zika, dengue and yellow fever viruses induce differential anti-viral immune responses in human monocytic and first trimester trophoblast cells. **Antiviral Research**, v. 151, p. 55–62, 2018.
- 74 BAYER, A.; LENNEMANN, N. J.; OUYANG, Y.; BRAMLEY, J. C.; MOROSKY, S.; MARQUES JR., E. T. de A.; CHERRY, S.; SADOVSKY, Y.; COYNE, C. B. Type III interferons produced by human placental trophoblasts confer protection against Zika virus infection. **Cell Host Microbe**, v. 19, n. 5, p. 705–712, 2016.
- 75 ZANLUCA, C.; DE NORONHA, L.; DOS SANTOS, C. N. D. Maternal-fetal transmission of the Zika virus: an intriguing interplay. **Tissue Barriers**, v. 3, n. 19, p. e1402143, 2018.
- 76 DELORME-AXFORD, E.; DONKER, R. B.; MOUILLET, J.-F.; CHU, T.; BAYER, A.; OUYANG, Y.; WANG, T.; STOLZ, D. B.; SARKAR, S. N.; MORELLI, A. E.; SADOVSKY, Y.; COYNE, C. B. Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 29, p. 12048—12053, 2013.
- 77 ADIBI, J. J.; MARQUES JR., E. T. A.; CARTUS, A.; BEIGI, R. H. Teratogenic effects of the Zika virus and the role of the placenta. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1587–1590, 2016.
- 78 ROSENBERG, A. Z.; YU, W.; HILL, A. D.; REYES, C. A.; SCHWARTZ, D. A. Placental pathology of Zika virus: viral infection of the placenta induces villous stromal macrophage (Hofbauer cell) proliferation and hyperplasia. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 141, n. 1, p. 43–48, 2016.
- 79 MARTINEZ, F. O.; SICA, A.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 4, p. 453–461, 2008.
- 80 MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The m1 and m2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000 Prime reports**, v. 6, n. 13, 2014.
- 81 BROWN, M. B.; VON CHAMIER, M.; ALLAM, A. A.; REYES, L. M1/M2 macrophage polarity in normal and complicated pregnancy. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. e606, 2014.

- 82 JOERINK, M.; RINDSJÖ, E.; VAN RIEL, B.; ALM, J.; PAPADOGIANNAKIS, N. Placental macrophage (Hofbauer cell) polarization is independent of maternal allergen-sensitization and presence of chorioamnionitis. **Placenta**, v. 32, n. 5, p. 380–385, 2011.
- 83 RÓSZER, T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. **Mediators of Inflammation**, p. e816460, 2015.
- 84 SCHLIEFSTEINER, C.; PEINHaupt, M.; KOPP, S.; LÖGL, J.; LANG-OLIP, I.; HIDDEN, U.; HEINEMANN, A.; DESOYE, G.; WADSACK, C. Human placental Hofbauer cells maintain an anti-inflammatory M2 phenotype despite the presence of gestational diabetes mellitus. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 888, 2017.
- 85 ANTEBY, E. Y.; NATANSON-YARON, S.; GREENFIELD, C.; GOLDMAN-WOHL, D.; HAIMOV-KOCHMAN, R.; HOLZER, H.; YAGEL, S. Human placental Hofbauer cells express sprouty proteins: a possible modulating mechanism of villous branchin? **Placenta**, v. 26, n. 6, p. 476–483, 2005.
- 86 SIMONI, M. K.; JURADO, K. A.; ABRAHAMS, V. M.; FIKRIG, E.; GULLER, S. Zika virus infection of Hofbauer cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 77, n. 2, p. e12613, 2017.
- 87 GRIGORIADIS, C.; TYMPA, A.; CREATSA, M.; BAKAS, P.; LIAPIS, A.; KONDI-PAFITI, A.; CREATSAS, G. Hofbauer cells morphology and density in placentas from normal and pathological gestations. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 35, p. 407–412, 2013.
- 88 QUICKE, K. M.; BOWEN, J. R.; JOHNSON, E. L.; MCDONALD, C. E.; MA, H.; O'NEAL, J. T.; RAJAKUMAR, A.; WRAMMERT, J.; RIMAWI, B. H.; PULENDRAN, B.; SCHINAZI, R. F.; CHAKRABORTY, R.; SUTHAR, M. S. Zika virus infects human placental macrophages. **Cell Host & Microbe**, v. 20, n. 1, p. 83–90, 2016.
- 89 JURADO, K. A.; SIMONI, M. K.; TANG, Z.; URAKI, R.; HWANG, J.; HOUSEHOLDER, S.; WU, M.; LINDENBACH, B. D.; ABRAHAMS, V. M.; GULLER, S.; FIKRIG, E. Zika virus productively infects primary human placenta-specific macrophages. **Journal of Clinical Investigation Insight**, v. 1, n. 13, p. e88461, 2016.
- 90 CHAHAR, H. S.; BAO, X.; CASOLA, A. Exosomes and their role in the life cycle and pathogenesis of RNA viruses. **Viruses**, v. 7, n. 6, p. 3204–3225, 2015.
- 91 PONPUAK, M.; MANDELL, M. A.; KIMURA, T.; CHAUHAN, S.; CLEYRAT, C.; DERETIC, V. Secretory autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 35, p. 106–116, 2015.
- 92 TABATA, T.; PETITT, M.; PUERTA-GUARDO, H.; MICHLMAYR, D.; WANG, C.; FANG-HOOVER, J.; HARRIS, E.; PEREIRA, L. Zika virus targets different primary human placental cells suggesting two routes for vertical transmission. **Cell Host & Microbe**, v. 20, n. 2, p. 155–166, 2016.

- 93 ZHANG, Z.-W.; LI, Z.-L.; YUAN, S. The role of secretory autophagy in Zika virus transfer through the placental barrier. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, p. e206, 2017.
- 94 BAURAKIADES, E.; MARTINS, A. P. C.; MORESCHI, N. V.; SOUZA, C. D. A.; ABUJAMRA, K.; SAITO, A. O.; MECATTI, M. C.; SANTOS, M. G.; PIMENTEL, C. R.; SILVA, L. L. G.; CRUZ, C. R.; DE 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**, v. 6, n. 1, p. e101, 2011.
- 95 AAGAARD, K. M.; LAHON, A.; SUTER, M. A.; ARYA, R. P.; SEFEROVIC, M. D.; VOGT, M. B.; HU, M.; STOSS, F.; MANCINI, M. A.; HARRIS, R. A.; KAHR, M.; EPPES, C.; RAC, M.; BELFORT, M. A. Primary human placental trophoblasts are permissive for Zika virus (ZIKV) replication. **Scientific Reports**, v. 7, n. 41389, 2017.
- 96 LANCIOTTI, R. S.; KOSOY, O. L.; LAVEN, J. J.; VELEZ, J. O.; LAMBERT, A. J.; JOHNSON, A. J.; STANFIELD, S. M.; DUFFY, M. R. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.
- 97 JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; LANCIOTTI, R. S. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 4977–4983, 2005.
- 98 EMERY, S. L.; ERDMAN, D. D.; BOWEN, M. D.; NEWTON, B. R.; WINCHELL, J. M.; MEYER, R. F.; TONG, S.; COOK, B. T.; HOLLOWAY, B. P.; MCCAUSTLAND, K. A.; ROTA, P. A.; BANKAMP, B.; LOWE, L. E.; KSIAZEK, T. G.; BELLINI, W. J.; ANDERSON, L. J. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 2, p. 311–316, 2004.
- 99 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Zika MAC-ELISA**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/pdfs/zika-mac-elisa-instructions-for-use.pdf>>. Acesso em: julho de 2017.
- 100 LOUKERIS, K.; SELA, R.; BAERGEN, R. N. Syncytial knots as a reflection of placental maturity: reference values for 20 to 40 weeks' gestational age. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 13, n. 4, p. 305–309, 2010.
- 101 YOCKEY, L. J.; JURADO, K. A.; ARORA, N.; MILLET, A.; RAKIB, T.; MILANO, K. M.; HASTINGS, A. K.; FIKRIG, E.; KONG, Y.; HORVATH, T. L.; WEATHERBEE, S.; KLIMAN, H. J.; COYNE, C. B.; IWASAKI, A. Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. **Science Immunology**, v. 6, n. 1, p. eaao1680, 2018.
- 102 KHAN, S.; KATABUCHI, H.; ARAKI, M.; NISHIMURA, R.; OKAMURA, H. Human villous macrophage-conditioned media enhance human trophoblast growth and differentiation in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 4, p. 1075–1083, 2016.

- 103 TANG, Z.; TADESSE, S.; NORWITZ, E.; MOR, G.; ABRAHAMS, V. M.; GULLER, S. Isolation of Hofbauer cells from human term placentas with high yield and purity. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 66, n. 4, p. 336–348, 2011.
- 104 RABELO, K.; FERNANDES, R. C. de S. C.; DE SOUZA, L. J.; DE SOUZA, T. L.; DOS SANTOS, F. B.; NUNES, P. C. G.; DE AZEREDO, E. L.; SALOMÃO, N. G.; TRINDADE, G. F.; OLIVEIRA, C. A. B. de; DE CARVALHO, J. J.; MEDINA-ACOSTA, E.; PAES, M. V. Placental histopathology and clinical presentation of severe congenital Zika syndrome in a human immunodeficiency virus-exposed uninfected infant. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1704, 2017.
- 105 VENTURA, L. O.; VENTURA, C. V.; LAWRENCE, L.; LINDEN, V. van der; LINDEN, A. van der; GOIS, A. L.; CAVALCANTI, M. M.; BARROS, E. A.; DIAS, N. C.; BERROCAL, A. M.; MILLER, M. T. Visual impairment in children with congenital Zika syndrome. **Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus**, v. 21, n. 4, p. 295–299, 2017.

APÊNDICE

PROJETO DE PROGRESSÃO PARA DOUTORADO

INTRODUÇÃO

O texto a seguir expõe o Projeto de Doutorado da Autora, que visa ampliar o estudo executado durante o Mestrado, incluindo as sugestões para trabalhos futuros mencionadas no Capítulo Conclusão da Dissertação, tendo em vista os resultados e conclusões alcançados, publicados em periódico de relevância no meio acadêmico.

Dada a natureza de continuidade deste trabalho, a revisão bibliográfica será suprimida, uma vez que aquela apresentada na Dissertação permanece relevante, pois o embasamento bibliográfico é similar.

O projeto inicia-se pela justificativa, seguida dos objetivos, tanto geral quanto específicos. Na sequência é descrito o método que norteará o desenvolvimento desta nova etapa, incluindo a seleção de amostras, variáveis histopatológicas, detalhamento de procedimentos a serem executados e análise de dados. Por fim, são incluídos um cronograma e orçamento.

JUSTIFICATIVA

Considerando que os mecanismos da transmissão intrauterina, replicação, tropismo e persistência do ZIKV em tecidos são ainda pouco entendidos [48] e a gravidade dos danos para o conceito, em um contexto ambiental e epidemiológico propício

para o surgimento de novas epidemias, o estudo das alterações histopatológicas da placenta é essencial para a compreensão dos fenômenos relacionados a fisiopatologia da transmissão vertical e para identificação de alterações morfológicas que eventualmente contribuam para seu diagnóstico.

A hipótese é de que placentas de mães infectadas por ZIKV apresentam alterações morfológicas, morfométricas e imuno-histoquímicas significativamente diferentes de placentas de mães não infectadas e de placentas de mães infectadas por HIV.

OBJETIVO GERAL

Descrever e quantificar as alterações morfológicas, morfométricas e imuno-histoquímicas em placentas de gestantes com infecção documentada pelo ZIKV (grupo estudo), em comparação com achados de placentas de mulheres saudáveis (grupo controle negativo) e placentas de mulheres com infecção por HIV (grupo controle positivo), pareadas pela idade gestacional.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) avaliar o perímetro e o diâmetro das vilosidades placentárias no grupo estudo e nos grupos controle utilizando técnicas de morfometria em coloração de rotina por Hematoxilina-Eosina (H&E);
- b) avaliar a quantidade de nós e de brotos sinciciais no grupo estudo e nos grupos controle utilizando técnicas de morfometria em coloração de rotina (H&E);

- c) avaliar as alterações estromais vilositárias tais como presença de microcalcificações, fibrina e fibrose no grupo estudo e nos grupos controle utilizando técnicas de morfometria em colorações especiais como alizarina, hematoxilina fosfotúngstica e *sirius red*, respectivamente;
- d) avaliar a espessura da membrana basal trofoblástica no grupo estudo e nos grupos controle utilizando técnicas de morfometria em coloração especial de ácido periódico de Schiff com digestão;
- e) avaliar a quantidade de células de Hofbauer positivas para CD163 [81–83] no grupo estudo e nos grupos controle utilizando técnicas de morfometria em reações imuno-histoquímicas;
- f) avaliar o perfil de diferenciação de células de Hofbauer através da quantificação de células positivas para F4-80, iNOS, arginase e esfingosina kinase 1 [79, 80, 83] no grupo estudo e nos grupos controle, utilizando técnicas de morfometria em reações imuno-histoquímicas;
- g) comparar os achados dos três grupos a fim de determinar os padrões de lesão causados pelo ZIKV nas vilosidades placentárias, confrontando-os com o grupo controle positivo;
- h) estabelecer relação entre os achados morfológicos e desfecho clínico do conceito.

MÉTODO

Este estudo será desenvolvido por uma equipe multidisciplinar que envolve profissionais PUCPR e o Instituto Carlos Chagas – Fiocruz, tendo sido aprovado pela Fiocruz e pelo Comitê Nacional de Ética em Experimentação Humana sob o número CAAE: 42481115.7.0000.5248.

SELEÇÃO DA AMOSTRA

O grupo estudo foi selecionado a partir de uma população de 331 gestantes atendidas na rede estadual de Saúde Pública do estado do Paraná entre 2015 e 2016 com quadro clínico suspeito de infecção por ZIKV (exantema e febre), tendo sido acompanhadas desde então pela Secretaria Estadual da Saúde do Paraná (SESA). Trinta e nove delas tiveram a infecção por ZIKV confirmada por RT-PCR, tendo sido excluídas outras causas de exantema e febre em gestantes como Dengue e Chikungunya, entre outras. Todas as pacientes foram testadas para outras causas de infecção congênita intrauterina (TORCH). Duas pacientes evoluíram para abortamento espontâneo, sem envio de material para exame anatomopatológico. As 37 restantes foram monitoradas até o parto, que ocorreu entre 34 e 38 semanas de gestação, quando foram coletadas amostras de soro e/ou urina e/ou fragmentos de placenta para RT-PCR (congeladas) e/ou para exame anatomopatológico (fixadas em formol). Foi também realizada avaliação das condições clínicas do conceito, os quais continuam em seguimento pela SESA. Das 37 gestantes restantes, 23 tinham amostras de placenta em condições ideais para o exame anatomopatológico, sendo excluídas as demais que não foram amostradas em condições adequadas. As placentas destas 23 gestantes, incluídas neste estudo, foram analisadas no Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (LPE-PUCPR) e submetidas a exame imuno-histoquímico para pesquisa de ZIKV, sendo que 10 delas foram positivas. Todas as 23 pacientes incluídas no estudo ($n = 23$), têm pelo menos dois testes positivos para ZIKV, como por exemplo, RT-PCR positivo no sangue e na placenta, ou RT-PCR no sangue e urina ou ainda RT-PCR e imuno-histoquímica positivos na placenta. A inclusão das gestantes não levou em conta a idade gestacional em que ocorreu a infecção (tendo a infecção e início dos sintomas ocorrido tanto no primeiro, como no segundo ou no terceiro trimestre de gestação) ou as condições clínicas do conceito ao nascimento (presença ou não de malformações, gravidade de acometimento, por exemplo).

Para o grupo controle negativo foram utilizadas placentas de gestantes que

realizaram o parto no Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR), com pré-natal sem comorbidades. As gestantes deram à luz a conceptos considerados saudáveis, entre 34 e 38 semanas de gestação, entre os anos de 2004-2005, quando o ZIKV ainda não circulava pelo Brasil. Todas as pacientes realizaram testes laboratoriais para infecções congênitas intrauterinas (TORCH) com resultados negativos. As placentas não apresentavam alterações anatomopatológicas ($n = 23$). Gestantes e conceptos foram seguidos até o momento da alta hospitalar. As placentas deste grupo foram fixadas em formol e analisadas no LPE-PUCPR [94].

Para o grupo controle positivo serão utilizadas placentas de gestantes infectadas pelo HIV que realizaram o parto no CHC-UFPR, com pré-natal sem outras comorbidades realizado na mesma instituição. As gestantes deram à luz a conceptos considerados saudáveis, entre 34 e 38 semanas de gestação, entre 2003 e 2005, quando o ZIKV ainda não circulava pelo Brasil. Todas as pacientes realizaram testes laboratoriais para outras infecções congênitas intrauterinas (TORCH) com resultados negativos. Gestantes e conceptos foram seguidos até o momento da alta hospitalar. As placentas deste grupo foram fixadas em formol e analisadas no LPE-PUCPR ($n = 23$) [94].

VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS DO ESTUDO

As variáveis histopatológicas desse estudo são:

- a) medida do perímetro e do diâmetro das vilosidades placentárias;
- b) quantidade de nós e de brotos sinciciais das vilosidades;
- c) presença de alterações no estroma das vilosidades como microcalcificação, fibrina e fibrose;
- d) medida da espessura da membrana basal citotrofoblástica;

- e) quantidade de células de Hofbauer positivas para CD163;
- f) quantidade de células de Hofbauer positivas para F4-80, iNOS, arginase e esfingosina kinase 1.

PROCEDIMENTOS

Análise morfométrica do perímetro e diâmetro das vilosidades

Cortes histológicos de todas as placentas do estudo foram corados com H&E e fotografados em aumento de 400x utilizando o Digitalizador Axion Scan.Z1, gerando em média 5.000 imagens. Dentre as imagens confeccionadas, serão excluídas as que estiverem desfocadas ou com artefatos, além daquelas com tecido não-vilositário (membranas, cordão, decídua). As imagens restantes selecionadas (cerca de 1000) devem ter 100% do campo ocupado com vilosidades placentárias e serão randomizadas para a obtenção de cerca de 100 imagens para cada caso do grupo estudo e dos grupos controle.

A aferição do perímetro e do diâmetro das vilosidades será feita com auxílio do programa Image Pro Plus® 4, com base em desenho feito à mão livre em 100 vilosidades em imagens consecutivas. Ao final do contorno de cada vilosidade, o programa fornece dados de perímetro e diâmetros (maior e menor), entre outros, em micrômetros quadrados (μm^2). Para os cálculos estatísticos serão utilizados o menor diâmetro e o perímetro [94].

Análise morfométrica do número de nós e brotos sinciciais das vilosidades

Para avaliar os nós e brotos sinciciais, as mesmas 100 imagens em H&E previamente escolhidas serão utilizadas, sendo 30 delas selecionadas de modo randomi-

zado e submetidas a contagem simples destas duas estruturas microscópicas, assim como do número de vilosidades presentes nas imagens.

Análise morfométrica das alterações estromais das vilosidades

Cortes histológicos de todas as placentas do estudo serão coradas com alizarina, hematoxilina fosfotúngstica e *sirius red*. Todas as colorações serão fotografadas em aumento de 400x utilizando o Digitalizador Axion Scan.Z1, gerando em média 5.000 imagens para cada caso, para cada coloração. O método de seleção das imagens será o mesmo descrito para o H&E, restando cerca de 1000 imagens que serão randomizadas para a obtenção de cerca de 30 imagens para cada caso do grupo estudo e dos grupos controle, em cada coloração.

A aferição da quantidade de microcalcificações no estroma das vilosidades será feita com a coloração de alizarina, a qual cora os sais de cálcio em vermelho. Com o auxílio do programa Image Pro Plus® 4 e com base em morfometria de cores, serão avaliadas as áreas realçadas em vermelho (positivas para cálcio). Ao final do processo, o programa fornece dados de área positiva para cálcio, em micrômetros quadrados (μm^2).

A aferição da quantidade de fibrina no estroma das vilosidades será feita com a coloração de hematoxilina fosfotúngstica, a qual cora a fibrina em rosa/roxo. Com o auxílio do programa Image Pro Plus® 4 e com base em morfometria de cores, serão avaliadas as áreas realçadas em rosa/roxo (positivas para fibrina). Ao final do processo, o programa fornece dados de área positiva para fibrina, em micrômetros quadrados (μm^2).

A aferição da quantidade de fibrose no estroma das vilosidades será feita com a coloração de *sirius red*, a qual cora o tecido conjuntivo em magenta. Com o auxílio do programa Image Pro Plus® 4 e com base em morfometria de cores, serão avaliadas as áreas realçadas em magenta (positivas para fibrose). Ao final do processo, o programa fornece dados de área positiva para fibrose, em micrômetros quadrados (μm^2).

Análise morfológica da membrana basal citotrofoblástica das vilosidades

Cortes histológicos de todas as placentas do estudo serão coradas com PAS com digestão. Todas as lâminas serão fotografadas em aumento de 400x utilizando o Digitalizador Axion Scan.Z1, gerando em média 5.000 imagens para cada caso. O método de seleção das imagens será o mesmo descrito para o H&E, restando cerca de 1000 imagens que serão randomizadas para a obtenção de cerca de 30 imagens para cada caso do grupo estudo e grupo controle.

A aferição da membrana basal citotrofoblástica das vilosidades será feita com a coloração de PAS com digestão, a qual cora a membrana basal em rosa. Com o auxílio do programa Image Pro Plus® 4 e com base em morfometria de cores, serão avaliadas as áreas realçadas em rosa (positivas para membrana). Ao final do processo, o programa fornece dados de área positiva para membrana basal, em micrômetros quadrados (μm^2).

Análise imuno-histoquímica

Cortes histológicos de todas as placentas do estudo serão fixados em lâminas de vidro eletricamente carregadas e subsequentemente desparafinizados com xilol aquecido (37°C), desidratados com banhos sucessivos de álcool etílico absoluto e em solução com concentrações decrescentes e re-hidratados com água. Será utilizado álcool metílico e peróxido de hidrogênio para o primeiro bloqueio da peroxidase endógena e água destilada e peróxido de hidrogênio para o segundo bloqueio. Procede-se com a incubação com o anticorpo primário escolhido (anti-CD163, anti-F4-80, anti-iNOS, anti-arginase, anti-esfingosina kinase - Invitrogen, Carlsbad, USA) durante 1 hora e com anticorpo secundário associado ao polímero de dextrana (Spring Bioscience, Pleasanton, USA) durante 30 minutos. Para revelação será adicionado complexo DAB / substrato (DAB, DakoCytomation) sobre as lâminas, seguida de contracoloração com hematoxilina de Mayer's, desidratação com banhos de álcool etílico

em solução em concentrações crescentes, clarificação com xilol e montagem das lâminas com Bálsamo do Canadá. O protocolo desenvolvido e descrito acima já está padronizado no serviço [33].

As lâminas confeccionadas serão fotografadas em aumento de 400x utilizando o Digitalizador Axion Scan.Z1, gerando em média 5.000 imagens para cada caso, para cada anticorpo. O método de seleção das imagens será o mesmo descrito para o H&E, restando cerca de 1000 imagens que serão randomizadas para a obtenção de cerca de 30 imagens para cada caso do grupo estudo e dos grupos controle, para cada anticorpo.

Para avaliar e quantificar as células de Hofbauer positivas para cada anticorpo testado, serão analisadas as 30 imagens contando-se o número de vilosidades presentes nas imagens e a quantidade de células positivas para cada anticorpo.

ANÁLISE DE DADOS

Os dados obtidos serão armazenados em planilha eletrônica e transportados para um software estatístico para as análises estatísticas. Os resultados serão expressos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões ou por frequências e percentuais. Para a comparação entre os dois grupos, serão usados testes paramétricos ou não paramétricos conforme as características da variável em questão. Serão realizados testes de correlação de Pearson e análise uni e multivariada, orientada por um estatístico experiente. O nível de significância (ou probabilidade de significância) mínimo adotado será de 5%.

CRONOGRAMA

O cronograma para o desenvolvimento das atividades propostas neste projeto de doutorado é apresentado na figura a seguir.

ATIVIDADES	2019							2020							2021										
	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN
Revisão de Literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
Confecção das lâminas	X	X	X	X	X	X																			
Digitalização da lâminas		X	X	X	X	X	X																		
Análises morfológicas				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
Análises morfológicas				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
Análise imuno-histoquímica				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
Resultados parciais																		X							
Seminário Sênior																		X							
Análise estatística																			X	X					
Discussão do Resultados																				X	X	X			
Elaboração da tese															X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Submissão de artigo científico																					X	X			
Qualificação																								X	
Defesa da tese																									X

Cronograma do Projeto de Doutorado

ORÇAMENTO

O presente estudo será subsidiado pelo Laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR, pelo Instituto Carlos Chagas - ICC/FIOCRUZ-PR, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária-PR.