



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANA PAULA CAMARGO MARTINS

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA E IMUNOHISTOQUÍMICA
EM AMOSTRAS PARAFINADAS DA PLACENTA DE
GESTANTES HIV SOROPOSITIVAS**

Curitiba

2007

ANA PAULA CAMARGO MARTINS

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA E IMUNOHISTOQUÍMICA
EM AMOSTRAS PARAFINADAS DA PLACENTA DE
GESTANTES HIV SOROPOSITIVAS**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências da Saúde da
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
– PUCPR, como requisito parcial para
obtenção do grau acadêmico de Mestre.**

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Lúcia de Noronha

CURITIBA

2007

Dedico esta dissertação a Deus pela oportunidade da vida, à minha avó pela sua eterna alegria e aos meus pais e irmãos pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Lúcia de Noronha por sua amizade e paciência, além da dedicação e competência na orientação desta dissertação.

À professora Márcia Olandoski pela análise estatística.

À bióloga Mônica Gabriela dos Santos pelo auxílio na análise morfométrica deste trabalho.

À bióloga Fabiane Bonafini Zanatta Flizikowski pela incansável colaboração e amizade.

À bióloga Marina Luise Viola de Azevedo, que além do companheirismo, dedicou horas de auxílio na formatação desta tese.

Às acadêmicas Karla Abujamra, Camila Deneka e Fernanda Leme, pelo apoio vital para a realização deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas da UFPR pela atenção e preparo de lâminas.

Às residentes do Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas da UFPR, Luciane Choppa do Valle e Larissa Luvizon Gomes da Silva pelo auxílio na leitura das lâminas.

À equipe da secretaria da pós-graduação, que com presteza e dedicação sempre nos ajudou.

SUMÁRIO

RESUMO	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. REVISÃO DA LITERATURA	12
3.1 HIV e transmissão vertical – dados epidemiológicos	13
3.2 O exame anatomopatológico das placentas de gestantes HIV soropositivas	14
3.3 O exame imunohistoquímico das placentas de gestantes HIV soropositivas	15
3.4 O exame morfométrico das placentas de gestantes HIV soropositivas	17
3.5 A detecção do HIV em placentas de gestantes soropositivas	18
4. MÉTODO	21
4.1 Testes morfométricos	23
4.2 Análise imunohistoquímica	25
4.3 Método estatístico	30
4.4 Aspectos éticos de biossegurança	32
5. RESULTADOS	33
5.1 Resultados da morfometria	34
5.2 Resultados da imunohistoquímica	44
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÕES	57
8. REFERÊNCIAS	59
9. ANEXOS	66
9.1 Artigo para publicação	67
9.2 Comitê de ética em pesquisa	75

RESUMO

Introdução - O exame anatomopatológico das placentas HIV soropositivas geralmente não revela alterações, porém, quando métodos mais sensíveis são aplicados, algumas alterações podem ser evidenciadas. **Objetivo** - Analisar dados morfométricos e de imunoreatividade em placentas de gestantes HIV soropositivas e compará-las com aquelas de gestantes HIV soronegativas.

Método - Amostras de placentas sem alterações histopatológicas foram divididas em 2 grupos: HIV soronegativas (controle = C = 60) e HIV soropositivas (experimento = E = 56). A relação CD4/CD8, terapia antiretroviral, peso do bebê e taxa de transmissão vertical da população foram analisados. A imunohistoquímica para o p24 e para o vírus herpes (Dako ®) foi realizada em todos os casos e para o CMV (Zymed®) em 10 casos de cada grupo.

Resultados e Conclusões - As vilosidades do grupo E (experimento) apresentaram área média de $3932,94\mu^2$ e perímetro de $246,15\mu$. Já as do C (controle) apresentaram área de $4339,93\mu^2$ e perímetro de $258,05\mu$, com $p < 0,05$. Sendo assim as vilosidades do grupo E são menores que o grupo C. Isto pode significar aceleração da maturação. Obtivemos um caso positivo para o p24 no grupo E e nenhum para o grupo C, 8 casos positivos para o herpes vírus no grupo E e 12 no grupo C; nenhum dos casos foi positivo para o CMV, sendo $p > 0,05$. Isto é, quando analisamos a chance de infecções congênitas tipo herpes e CMV na população E, ela é idêntica as do grupo C. Isto pode ser devido a terapia antiretroviral (47 das 56 gestantes E realizaram), relação CD4/CD8 próximas do normal (média da relação CD4/CD8 neste estudo = 0,7) e carga viral baixa (média de 4.248,83 cópias neste estudo). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos quando analisamos idade gestacional, idade materna e peso do bebê. A taxa de transmissão vertical do HIV confirmado pelo exame do recém-nascido foi de 3 casos em 56 neste estudo (5,35%).

(Palavras-chaves: HIV, transmissão vertical, p24, placenta)

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, em torno de 620.000 pessoas estão infectadas pelo HIV, compreendendo 1/3 de todas as pessoas com o vírus na América Latina (UNAIDS, 2006). A ênfase dada sobre a prevenção e o tratamento tem colaborado para manter a epidemia do HIV estável nestes últimos anos. No entanto, mesmo com a promoção da educação sexual e prevenção da AIDS nas escolas, em profissionais do sexo e em usuários de drogas, as taxas de infecção pelo HIV ainda permanecem altas, principalmente na região Sul do país, onde a epidemia tem apresentado índices preocupantes (HACKER *et al.*, 2006, 751). No início da epidemia havia um predomínio de casos entre homossexuais masculinos e a relação homem/mulher na década de 1980 era de cerca de 23:1. Desde a década de 1990, no entanto, tem-se observado uma diminuição dessa relação. Em 1997 ela já era de dois homens infectados para cada mulher, sendo que na faixa etária de 15-19 anos, essa relação já é de 1:1 (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE AIDS, 2004). Uma das preocupações que decorrem da mudança dessa proporção é o aumento do número de casos entre mulheres em idade fértil. Até o ano de 2004, foram notificados 114.052 casos de AIDS em mulheres entre 15 e 45 anos no país (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE AIDS, 2004). Como consequência disso, surge a preocupação com a transmissão vertical do HIV. A transmissão vertical ou materno-infantil é a principal via de infecção pelo HIV em crianças. No Brasil, ela é responsável por mais de 80% dos casos de HIV em menores de 13 anos, e pela quase totalidade dos casos diagnosticados atualmente. Até junho de 2004, foram notificados 9.162 casos de HIV por transmissão vertical, representando 2,5% de todos os casos de AIDS notificados no Brasil (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE AIDS, 2004). Dados do Ministério da Saúde estimam que 0,6% das gestantes sejam infectadas (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE AIDS, 2004). Outros estudos chegaram a estimar que 1 a 3,6% das gestantes são infectadas pelo HIV (ORTIGÃO, 1995, 11). Se nenhum tipo de profilaxia for realizado nessas pacientes, as taxas de transmissão vertical podem variar de 13% a 45%, dependendo do percentual de crianças amamentadas ao seio materno nos diferentes grupos populacionais (LINDEGREN *et al.*, 2000).

A transmissão vertical é o modo dominante de aquisição do HIV entre crianças de todo o mundo, resultando em 1600 novas infecções a cada dia ou

pelo menos uma infecção a cada minuto (WORLD HEALTH ORGANIZATION AND UNITED NATIONS PROGRAMME ON AIDS, 1999). No Brasil, todas as intervenções preconizadas para prevenção da transmissão vertical estão disponíveis para a população de gestantes infectadas pelo HIV e seus filhos. No entanto, as dificuldades dos serviços de saúde em fazer o diagnóstico da infecção, cobertura insuficiente dos testes para HIV no pré-natal, e o próprio pré-natal inadequado, resultam na administração de zidovudina (AZT) injetável em menos de 50% dos partos do total de mulheres estimadas como sendo infectadas. Apesar de todas essas dificuldades, a incidência de casos de AIDS em crianças vem decrescendo progressivamente no nosso país. A probabilidade de transmissão vertical do HIV já está estabelecida, sendo evidenciado que a maioria dos casos de transmissão ocorre durante o trabalho de parto e no parto propriamente dito (60-65%), o restante da transmissão ocorre no período intra-útero (35-40%) (NISHIMOTO, *et al.*, 2005, 51). O aleitamento materno representa risco adicional de transmissão, de 7% a 22% (BULTERS, 2000, 22; EKPINI, *et al.*, 1997, 349). Em estudo sobre a prevenção da transmissão vertical do HIV realizado 1994, foram publicados os resultados do protocolo Aids Clinical Trial Group (ACTG 076), que avaliou o uso da AZT nas gestantes e no recém-nascido e a suspensão do aleitamento materno. Esse estudo demonstrou uma redução de 68% na taxa de transmissão vertical, com 22,6% no grupo controle (placebo) e 7,6% no grupo que usou AZT (SPERLING, *et al.*, 1996, 335). Além disso, sabe-se, atualmente, que o uso de terapia antiretroviral combinada, ou seja, a utilização simultânea de duas ou mais drogas antiretrovirais, é capaz de reduzir significativamente a carga viral plasmática da mãe para níveis não detectáveis, diminuindo ainda mais o risco de transmissão vertical do HIV (BARTLETT, 2001-2002). A via de parto também pode ajudar na queda das taxas de transmissão vertical. Foi observado que o uso do protocolo ACTG 076 associado com parto por via cesariana diminuiu a transmissão vertical até cerca de 2% (READ, 1998). Nesses casos, a cesariana deve ser realizada de maneira eletiva ou pelo menos antes da ruptura das membranas amnióticas.

O Serviço de Infectologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) acompanha aproximadamente 100 bebês/ano expostos ao HIV. Em levantamento realizado como parte de um

estudo multicêntrico conduzido pela Sociedade Brasileira de Pediatria, com dados de diversas regiões do Brasil (incluindo o HC-UFPR), observou-se que nesta região as taxas de transmissão vertical encontravam-se próximas a 5% (SUCCI, 2003). No período compreendido entre 2000 a 2004, o Serviço de Infectologia Pediátrica atendeu 490 crianças expostas ao HIV, sendo que 100 (20,4%) não completaram a investigação. A taxa média de transmissão vertical nos 5 anos foi de 5,9% com um total de 23 crianças infectadas pelo HIV entre as 390 que concluíram a investigação (GUEDES, 2005). Dados de literatura demonstram a possibilidade de redução das taxas de transmissão vertical do HIV para índices próximos a 1-2%. Embora o Brasil disponha de protocolos, orientações, medicamentos antiretrovirais gratuitos, exames complementares como carga viral e contagem de CD4/CD8, além de profissionais capacitados para o atendimento da gestante infectada e do recém-nascido exposto, as taxas de transmissão vertical do HIV continuam inaceitáveis (SOUZA *et al.*, 2004).

À semelhança do que ocorre em adultos, crianças infectadas pelo HIV-1 apresentam alterações da função imune, predispondo-as a um maior risco de infecções secundárias. Entretanto, crianças infectadas intra-útero ou no período perinatal apresentam latência relativamente curta antes do surgimento da fase sintomática (ORTIGÃO, 1995, 11). A viremia plasmática nesses pacientes é superior à daqueles infectados após os três meses de idade (SAAG, 1991, 164). Clinicamente, as crianças infectadas por transmissão vertical tendem a apresentar evolução mais rápida e severa do que aquelas infectadas por outras vias (ORTIGÃO, 1995, 11).

Paralelamente, outros fatores certamente contribuem para a transmissão vertical do HIV, dentre estes, a presença de co-infecções, como sífilis, toxoplasmose, hepatites B e C e infecções pelos vírus da família herpesviridae. A presença destas infecções pode ser pesquisada por testes rotineiramente realizados no pré-natal, entretanto alguns resultados podem ser comprometidos devido à desregulação imune nestas pacientes. Assim, a análise do tecido placentário das pacientes HIV positivas para a pesquisa destes agentes infecciosos pode contribuir para a detecção dos mesmos, propiciando a instituição de terapia antiretroviral mais precocemente.

A placenta é uma barreira funcional entre a circulação materna e fetal e, apesar do tropismo pelas células placentárias, a transmissão intra-útero parece ser restrita a mecanismos ainda não completamente elucidados. Alguns destes têm sido citados, como as micro-transfusões materno-fetais que podem ocorrer no início da separação da placenta durante o parto, a corioamnionite e a presença de co-infecções, como sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, vírus herpes simplex e hepatites pelos vírus B e C. Estes agentes são citados como de alta frequência neste grupo de pacientes, podendo estar envolvidos no mecanismo de quebra de barreira placentária e, consequentemente, aumentando o risco transmissão vertical do HIV. Diversos estudos têm ressaltado a necessidade de pesquisas que avaliem o complexo mecanismo fisiopatológico, na placenta, que pode levar a infecção ou, mais comumente, a prevenção da infecção (BULTERS, 2000, 22).

A maneira mais efetiva de evitar a transmissão materno-infantil do HIV é com ações dirigidas a prevenção da infecção pelo HIV entre mulheres. Entretanto, uma vez que se identifique a gestante infectada, ações tomadas durante o pré-natal, parto e puerpério podem reduzir drasticamente as taxas transmissão vertical, destacando a utilização de antiretrovirais durante a gestação e parto, monitoramento da situação virológica e imunológica da gestante, com avaliações periódicas de carga viral e CD4/CD8, adequada assistência ao parto e ao recém-nascido. Vários fatores estão associados à transmissão vertical, entre eles destacam-se a viremia materna elevada, a doença materna avançada, tipo de parto, aleitamento materno, corioamnionites, ruptura prematura da placenta, prematuridade e tabagismo (NISHIMOTO, *et al.*, 2005, 51). A associação de outras infecções na gestante, como por exemplo, sífilis, CMV, toxoplasmose e hepatites podem ser fatores facilitadores da transmissão vertical do HIV bem como desses outros agentes.

A avaliação constante das taxas de transmissão vertical do HIV, das características clínico-laboratoriais das mães infectadas e de seus conceitos, e a identificação dos fatores de risco que possam estar associados com a transmissão vertical do HIV podem contribuir, sobremaneira, na elaboração de estratégias para conter o avanço da epidemia na população pediátrica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo realizar uma avaliação anatomopatológica das taxas de transmissão vertical do HIV e de co-infecções nas gestantes soropositivas atendidas no HC-UFPR durante o período de 2004 e 2005, através da pesquisa de HIV e de outros agentes infecciosos (herpes simples e CMV) em amostras parafinadas de placentas de histologia normal; bem como investigar alterações anatomopatológicas mínimas possivelmente presentes nestas placentas.

A hipótese principal é de que a transmissão vertical é influenciada por co-infecções que auxiliam na quebra da barreira feto-placentária, mesmo na ausência de processo inflamatório. Esta hipótese baseia-se em evidências de que a placenta e sua respectiva função de barreira, quando íntegra, desempenham importante papel na prevenção da transmissão vertical do HIV.

Para avaliar alterações morfológicas mínimas, mesmo na ausência de processos inflamatórios e infecciosos, utilizaremos a morfometria. Para avaliar as taxas de transmissão vertical do ponto de vista anatomopatológico utilizaremos a imunohistoquímica através do anticorpo primário anti-p24. Para avaliar o risco de co-infecções nestas pacientes utilizaremos a imunohistoquímica através dos anticorpos anti-herpes e anti-cmv. Os resultados serão comparados com os do grupo controle e com dados clínicos de transmissão vertical, níveis sorológicos de CD4/CD8 e carga viral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar as alterações anatomopatológicas morfométricas nas vilosidades placentárias de gestantes soropositivas com aquelas do grupo controle (gestantes soronegativas), a fim de investigar alterações morfológicas mínimas.

2. Avaliar a taxa de transmissão vertical anatomopatológica determinando quantas gestantes HIV soropositivas apresentam positividade imunohistoquímica para o p24 em tecidos placentários parafinados

comparando estes dados com o número de gestantes HIV soropositivas que não apresentam esta positividade.

3. Avaliar as taxas de co-infecções anatomopatológicas determinando quantas gestantes HIV soropositivas apresentam positividade imunohistoquímica em amostras parafinadas de placenta para os vírus CMV e/ou Herpes Simples, comparando estes dados com aqueles do grupo controle (gestantes HIV soronegativas)

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HIV E TRANSMISSÃO VERTICAL – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Em Curitiba, onde os primeiros casos registrados de AIDS são de 1984, observam-se importantes avanços nas estratégias de abordagem desta epidemia. Hoje os testes para detecção do HIV são ofertados em todas as Unidades Básicas de Saúde para as gestantes, assim como para a população em geral. A análise dos resultados das sorologias para o HIV, realizadas pelo Laboratório Municipal de Curitiba, apresentou uma taxa de positividade de 2,12%, sendo encontrado 0,26% de gestantes positivas (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE CURITIBA, 2006, 1), índice bem abaixo dos dados do estudo “Sentinela Parturiente” do Ministério da Saúde, que estima que cerca de 0,6% das gestantes sejam infectadas (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE AIDS 2001, 2002). A notificação da gestante HIV e da criança exposta ao vírus foi implantada em Curitiba em 1999 e nacionalmente em 2002. O total de casos de AIDS notificados em Curitiba até o ano de 2005 foi de 6.762 pacientes. Da mesma forma como se tem observado em outros países, tem ocorrido a feminilização da epidemia, sendo que nos últimos 5 anos a taxa foi de 2 homens soropositivos para cada mulher. Com relação à faixa etária, observa-se que a população mais afetada está entre 20 e 40 anos, cerca 67% dos casos (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE CURITIBA, 2006, 1). Ao observar esta concentração de casos em jovens e, principalmente em mulheres, surge a preocupação com a transmissão vertical do HIV. A transmissão vertical, ou materno-infantil, é a principal via de infecção pelo HIV em crianças. No Brasil ela é responsável por mais de 80% dos casos de HIV em menores de 13 anos e pela quase totalidade dos casos diagnosticados atualmente. Até junho de 2004 foram notificados 9.162 casos de HIV por transmissão vertical, representando 2,5% de todos os casos de AIDS notificados no país (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE AIDS 2004). Na cidade de Curitiba a taxa de transmissão vertical do HIV estava se mantendo em torno de 4%. Com a implantação de medidas de prevenção (Programa Mãe Curitiba), observou-se que, no triênio 2003 a 2005, houve uma redução para 0,31% (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE CURITIBA, 2006, 1).

Nos últimos 5 anos, um total de 386 gestantes soropositivas foram cadastradas no ambulatório de gestantes do Hospital de Clínicas. Atualmente o serviço de pediatria acompanha cerca de 150 crianças infectadas pelo HIV, em sua maioria de Curitiba e Região Metropolitana, além de pacientes do interior do estado do Paraná. Nesse ambulatório de pediatria são atendidos os recém-nascidos expostos ao HIV e demais doenças infecciosas, encaminhados pela Maternidade do Hospital de Clínicas, além de atender ainda crianças encaminhadas de outras Maternidades ou Unidades Básicas de Saúde de Curitiba e Região Metropolitana. Tanto Curitiba, como a Região Metropolitana, compreendem uma área geográfica formada por 26 municípios, sendo que estes estão agrupados em cinco microrregiões, totalizando 3.595.662 habitantes, segundo estimativas do ano de 2006.

3.2 O EXAME ANATOMOPATOLÓGICO DAS PLACENTAS DE GESTANTES HIV SOROPOSITIVAS

A importância do exame anatomopatológico dos anexos fetais (placenta, cordão umbilical e membranas) em mães portadoras do HIV vem sendo reconhecida por profissionais da área há vários anos. Isto por que contribui para o diagnóstico de várias doenças e também por que pode fornecer informações e dados estatísticos a serem somados aos já existentes (BRASILEIRO FILHO, 2000, 563).

O exame anatomopatológico de rotina geralmente encontra apenas alterações discretas em pacientes apenas portadoras do vírus HIV, tais como o aumento da celularidade do estroma vilositário por macrófagos e linfócitos T e o espessamento da parede da membrana basal de seus vasos. O mesmo exame anatomopatológico de placentas de gestantes HIV soropositivas pode ainda revelar, ocasionalmente, focos de necrose e vasculite aguda nos vilos placentários. Estas alterações são mais comuns em pacientes com AIDS, que podem apresentar as mesmas alterações já citadas, porém em maior intensidade, além de corioamnionites, onfalites, deciduites e intervilosites agudas, freqüentemente relacionadas às infecções recorrentes oportunistas ou não (BRASILEIRO FILHO, 1993, 568). Contudo, um estudo concluiu que

mulheres soropositivas têm risco aumentado para lesões inflamatórias placentárias (SCHWARTZ *et al.*, 2000, 1652). BHOOPAT *et al.*, (2005), afirma em seu estudo que os abortos precoces não são um fator considerável em placentas infectadas por HIV, pois o número dos mesmos parece ser maior em mulheres soronegativas. Não houve diferença significativa entre as placentas dos dois grupos, com exceção da presença de coroamnionite, sinais de fibrose, necrose tecidual e maturação anormal. O estudo conclui, ainda, que há uma significativa associação entre a transmissão do HIV para o feto e os achados histológicos da coroamnionite e células necróticas.

3.3 O EXAME IMUNOHISTOQUÍMICO DAS PLACENTAS DE GESTANTES HIV SOROPositivas

Em geral, mães apenas portadoras do vírus HIV possuem placenta de aspecto macroscópico e microscópico normal ou muito pouco alterado. (BRASILEIRO FILHO, 1993, 570). Porém, amostras submetidas à análise, mostram diferentes reações imunohistoquímicas quando expostas a alguns anticorpos para vírus (VILLEGAS-CASTREJON *et al.*, 1996, 173).

BRUCH *et al.* (1992), concluiu em seu estudo que o exame imunohistoquímico pôde revelar a presença de proteínas ou de alguns antígenos específicos do vírus, mesmo na ausência de lesões histológicas, assim como na ausência do vírus replicado, além disso, o estudo afirma que o exame placentário em casos de infecções virais é fundamental.

É fato que algumas infecções ocorrem mais freqüentemente e de maneira mais severa nas gestantes, como infecções por CMV, herpes e papiloma vírus humano. Além disso, as co-infecções pré-natais em gestantes portadoras de HIV devem ser consideradas como um dos fatores de risco para a transmissão vertical do mesmo, além dos já citados anteriormente como amamentação, via de parto e ausência de terapia antiretroviral (BIEDERMANN *et al.* 1995, 191).

O citomegalovírus (CMV) se transmite ao feto em 30-40% das mães com infecção primária. Na placenta visualiza-se infiltrado linfoplasmocitário nas vilosidades, necrose e trombose de vasos fetais e fibrose do estroma viloso,

sendo que o vírus pode ser detectado em cortes histológicos através da imunohistoquímica ou da hibridação *in situ*. O diagnóstico apenas é confirmado à visualização de inclusões virais características, presença de material antigênico ou seqüências genômicas do CMV em células endoteliais de vasos associados a capilarite (BRASILEIRO FILHO, 2000, 569).

Nos Estados Unidos, aproximadamente 1500-2000 casos da infecção neonatal pelo herpes simples (HSV) ocorrem todos os anos, e o risco da morte ou de seqüelas sérias são pelo menos de 50%. A maioria dos casos é adquirida no período perinatal. A transmissão transplacentária, tendo por resultado infecção congênita pelo HSV, ocorre muito menos freqüentemente. A infecção congênita pelo HSV, cuja transmissão se dá durante os primeiros dois trimestres pode estar associada com as anomalias fetais, incluindo microcefalia, calcificação intracranial e coriorretinite. Esta baixa freqüência do HSV-1 e 2 congênito pode ser atribuída a diversos fatores, incluindo: 1) a prevalência em mulheres em idade reprodutiva de anticorpos anti-HSV; 2) o fato de que a viremia não é uma característica das infecções pelo HSV; e 3) a possibilidade da placenta funcionar como uma barreira física que impede a transmissão vertical de HSV da mãe à circulação fetal. Entretanto, as infecções maternas pelo HSV-1 e 2 são comuns durante a gravidez e são associadas com um risco aumentado de aborto, presumidamente em consequência da disfunção placentária. Estas observações sugerem que a placenta está exposta ao HSV-1 e 2 em algumas mulheres, mas que a mesma impede geralmente a transmissão vertical do vírus. Infelizmente, os mecanismos por que a placenta resiste ou permite a transmissão de HSV e de outros vírus da mãe à circulação fetal são ainda pouco conhecidos (KOI *et al.*, 2002, 1572).

Como as afecções em imunocomprometidos se manifestam por meio de quadros clínicos e respostas imunitárias atípicas, tornam-se necessários exames complementares utilizando-se métodos diagnósticos mais precisos. As técnicas de imunohistoquímica, por exemplo, têm importante papel no diagnóstico de agentes infecciosos ou de seus produtos antigênicos, sendo também essenciais para a caracterização fenotípica das células envolvidas na resposta tecidual e das citocinas produzidas localmente. As técnicas de biologia molecular também apresentam grande aplicabilidade nas doenças infecciosas.

Ao buscar evidências de que a co-infecção viral persistente atua como importante fator para a progressão da imunodeficiência humana pelo HIV-1 observou-se que a citomegalovirose possui efeito na progressão do HIV no sentido de acelerar a transmissão vertical do mesmo (NORTHFIELD, 2005, 5). Não é improvável que o mesmo ocorra com outros tipos de infecções virais como o HSV.

Ao analisar as interações entre o HIV-1 e o CMV em células sinciciotrofoblásticas a termo, cultivadas *in vitro*, demonstrou-se que a replicação do HIV-1 foi potencializada pelo CMV quando ambos os vírus foram adicionados simultaneamente. As células já infectadas pelo CMV que foram superinfectadas pelo HIV-1 demonstraram o efeito estimulador do CMV sobre a replicação do HIV-1 (devido à produção de IL-6 induzida pelo CMV). Além disso, a infecção prévia das células sinciciotrofoblásticas com HIV-1 converteu a infecção pelo CMV para uma infecção ativa. (TOTH *et al.*, 1995, 2225 e KILANI *et al.*, 1997, 6365).

3.4 O EXAME MORFOMÉTRICO DAS PLACENTAS DE GESTANTES HIV SOROPositivas

O estudo de diferentes parâmetros morfométricos em placentas coletadas entre 22 e 40 semanas de gestação tem mostrado que no meio da gestação a termo, dois estágios são claramente distintos no desenvolvimento da placenta humana. O primeiro estágio do desenvolvimento, que termina em aproximadamente 36 semanas de gestação, é caracterizado por aumento nos componentes do parênquima. O segundo estágio que se estende da 36ª semana até o final é chamado de estágio de maturação, porque é caracterizado por um substancial crescimento do feto, mas sem qualquer aumento funcional nos tecidos placentários (TEASDALE, 1979).

O desenvolvimento morfológico das vilosidades das placentas acontece no primeiro e segundo trimestre da gravidez. De acordo com dados atuais, o desenvolvimento e a diferenciação das vilosidades placentárias estão completos na 28ª semana de gestação. Métodos morfométricos já têm sido aplicados para placentas insuficientes, sendo que a maior descoberta é um

retardo do desenvolvimento das vilosidades. Enormes vilosidades predominam na gravidez precoce. A presença de um satisfatório número de pequenas vilosidades, de qualquer modo, cria uma considerável variação no tamanho das vilosidades durante a 12^a semana. Subsequentemente, a variação do tamanho das vilosidades diminui também devido a um aumento da diferenciação ou pela seleção natural de vilosidades derivadas da periferia da placenta (STOZ, *et al.*, 1988).

Não foram encontrados na literatura revisada trabalhos que relatem dados sobre análise morfométrica de placentas de gestantes HIV positivas.

3.5 A DETECÇÃO DO HIV EM PLACENTAS DE GESTANTES SOROPOSITIVAS

Ao analisar placentas humanas infectadas pelo HIV *in útero* e *in vitro*, por meio de PCR, verificou-se que o vírus se distribui de maneira similar em ambos os grupos, localizando-se principalmente nos sinciciotrofoblastos e nos histiócitos de Hofbauer (SHEIKH, 2000, 210). Além disso, as seqüências do RNA do HIV-1 foram detectadas tanto nas vilosidades coriônicas como nas células trofoblásticas de todas as placentas analisadas no estudo, indicando que estas seqüências estão sempre presentes em placentas de mulheres soropositivas (MENU *et al.*, 1999, 48).

O anticorpo p24, através da imunohistoquímica, também mostra células com citoplasma reativo nas vilosidades de placenta de mulheres soropositivas, células estas que são compatíveis com histiócitos de Hofbauer (MATTERN *et al.*, 1992).

O exame imunohistoquímico realizado com o anticorpo gp41 em amostras de placentas de gestantes HIV soropositivas sem qualquer tratamento antiretroviral revela células do estroma e da superfície vilositária reativas, indicando que o vírus pode estar presente em qualquer parte da vilosidade coriônica. O mesmo exame, em amostras de pacientes em tratamento com AZT e ddI, não revela a presença do vírus. (VILLEGAS-CASTREJON *et al.*, 1996, 172)

Apesar de terem sido detectadas seqüências HIV-gag por RT-PCR em células placentárias de mulheres HIV soropositivas (LEE *et al.*, 1997, 3631),

placentas obtidas de mulheres HIV soropositivas fazendo uso de terapia antiretroviral não apresentaram nenhuma anormalidade macroscópica ou histológica e o exame imunohistoquímico não detectou os antígenos p24 e gp120 do HIV-1. Além disso, não foram encontrados por PCR o DNA e RNA do HIV nos trofoblastos purificados. Isto pode indicar que a barreira trofoblástica nas placentas a termo pode impedir a transmissão vertical do HIV (TSCHERNING-CASPER *et al.*, 1999, 9673).

BHOOPAT *et al.* (2005), ao comparar placentas de mulheres soropositivas sem tratamento antiretroviral com as soronegativas, obtidas com 6 a 23 semanas de gestação, por meio de imunohistoquímica e PCR, verificou que a presença de corioamnionite, decíduite e necrose de células deciduais estão diretamente relacionadas à transmissão vertical do HIV para o feto. O exame imunohistoquímico realizado com o anticorpo p24 em amostras de placenta de pacientes HIV soropositivas com corioamnionite revela que estas alterações podem estar relacionadas à presença do vírus (CHANDWANI *et al.*, 1991, 1137).

A disseminação do vírus HIV-1 no tecido placentário e a sua passagem através da barreira trofoblástica dependem de ações sinérgicas de vários fatores placentários solúveis. Alguns destes fatores têm papel na limitação da disseminação do HIV na placenta, como as quimiocinas RANTES e MIP-1 beta e a citocina fator inibidor de leucemia, que exibem uma potente atividade anti HIV-1 impedindo a infecção das células trofoblásticas (DERRIEN *et al.*, 2005). Em outro estudo foi demonstrado que é estabelecido um limite para a infecção dos trofoblastos pelo HIV-1, no que diz respeito à produção e ao desenvolvimento de vírions, devido à expressão de doses fisiológicas de TNF-alfa e interleucina 1 (VIDRICAIRE, 2003). Ao analisar culturas de tecidos placentários, nos quais fragmentos de vilosidades coriônicas foram infectados com HIV-1, verificou-se que a expressão do vírus é significativamente aumentada quando se adiciona TNF-alfa, fato este que pode facilitar a transmissão vertical do HIV, particularmente em contexto inflamatório (KFUTWAH *et al.*, 2006).

Em um estudo para diferenciar o tropismo e a expressão dos receptores de quimiocinas do HIV-1 em histiócitos de Hofbauer observou-se que o HIV-1 não induz efeitos citopáticos nos macrófagos placentários e nenhuma alteração

morfológica foi observada coincidente com a infecção. Porém, foi comum o achado de antígenos p24 nos macrófagos placentários para a maioria dos isolados testados (FEAR *et al.*, 1998, 1336).

Ao estudar a influência da interação entre a molécula ligante do CD40 (CD40L), expressa na superfície de linfócitos T, com seu receptor nos histiócitos, demonstrou-se que o CD40L inibe a infecção de histiócitos pelo HIV-1 de maneira dose-dependente e coincide com variadas respostas do sistema imune com expressão do RANTES e TNF-alfa e com a diminuição da expressão do CD4 (COTTER *et al.*, 2001). Foi constatado que as interações entre as células sinciciotrofoblásticas e os macrófagos placentários com HIV latente interrompem o período de latência do HIV e induzem à sua replicação nas células sinciciotrofoblásticas, sugerindo que esta interação tem papel na disseminação do HIV-1 na placenta (BACSI *et al.*, 2001, 1084).

4. MÉTODO

Para este trabalho, foram utilizadas as amostras de placentas provenientes do Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC) através de convênio já firmado com a UFPR.

O SYSLAB é um software utilizado no SAP-HC-UFPR que atua como banco de dados do material armazenado no arquivo. Ele foi a ferramenta utilizada para a escolha e definição das amostras a serem analisadas bem como os livros de registro e as requisições de exame do SAP-HC-UFPR.

Foram escolhidas as amostras a partir do ano de 2003 até o de 2005 cujos laudos diagnósticos foram descritos como “normais” ou “sem alterações histopatológicas”.

As amostras foram divididas em 2 grupos (controle e experimento) conforme os seguintes critérios de inclusão:

- placentas normais de gestantes HIV soronegativas (controle);
- placentas normais de gestantes HIV soropositivas (experimento).

Antes de definir a população de estudo, todas as lâminas coradas em hematoxilina e eosina (H.E) contendo cortes histológicos de placentas caracterizadas como “normais” ou “sem alterações” dos dois grupos, foram separadas e revisadas pelo patologista a fim de confirmar o laudo inicial de normalidade.

Para ambos os grupos foram utilizados os seguintes critérios de exclusão: pacientes portadoras de hipertensão, diabetes, infecções, doenças prévias, AIDS, fator Rh negativo e casos cujos artefatos técnicos não permitiram a análise morfológica e imunohistoquímica.

A amostra total foi composta por 116 casos, sendo 56 soropositivas para HIV e 60 soronegativas, todas consideradas de histologia normal. As amostras dos dois grupos foram pareadas por idade gestacional e idade da mãe. A idade gestacional variou entre 25 e 42 semanas e a idade da mãe entre 13 e 42 anos.

Dados sorológicos e terapêuticos das gestantes e seus conceitos foram pesquisados em prontuários tais como carga viral, níveis de CD4 e CD8 e tipo de terapia antiretroviral, além do peso de bebê e estado sorológico atual do bebê – se HIV soropositivo ou HIV soronegativo – para posterior discussão com os dados morfológicos e imunohistoquímicos.

Os dados referentes a cada paciente foram compilados em planilha Excel, contendo as seguintes informações:

- ano do exame
- número do exame anatomopatológico
- número de registro do prontuário das gestantes
- idade das gestantes em anos
- idade gestacional do bebê em semanas
- peso do bebê em gramas
- carga viral da gestante e do bebê em número de cópias virais
- tipo de terapia antiretroviral das gestantes
- relação CD4/CD8 da gestante e do bebê
- estado sorológico do bebê em relação ao HIV
- tratamentos feitos no bebê.

No presente trabalho, foram feitos os estudos morfológico e morfométrico, além de realização de provas imunohistoquímicas.

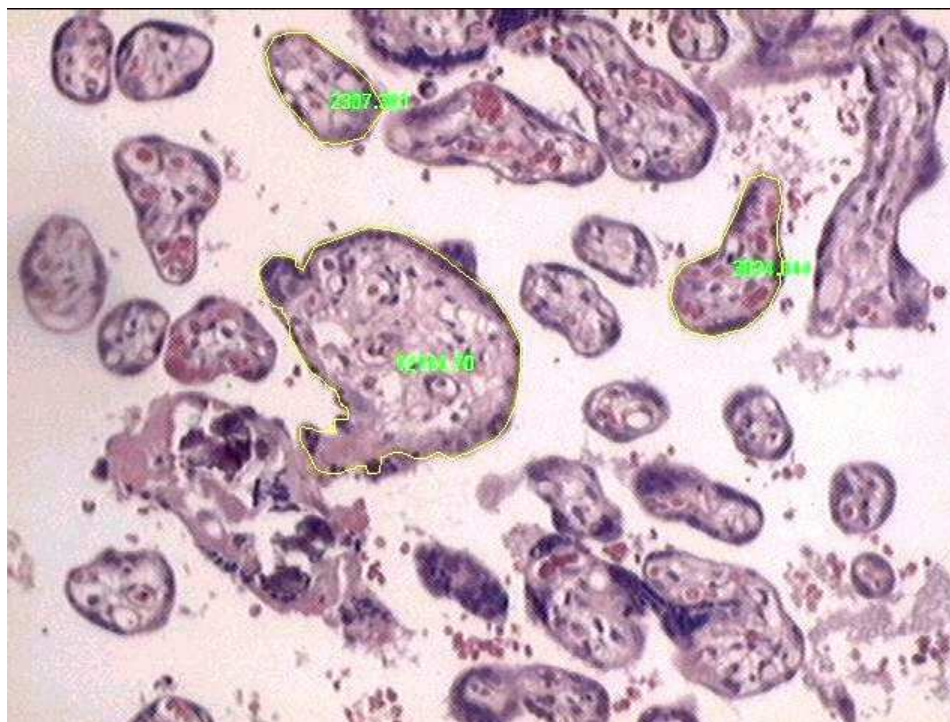
4.1 TESTES MORFOMÉTRICOS

O material de todos os casos do estudo (blocos em parafina e lâminas coradas em H.E) armazenados na Unidade de Patologia Pediátrica do SAP-HC-UFPR foram encaminhados para o Laboratório de Patologia Experimental (LPE) da PUCPR para confecção de novas lâminas histológicas coradas em H.E.

As novas lâminas histológicas coradas em H.E. foram avaliadas por microscopia óptica, utilizando-se microscópio binocular marca Olympus® modelo BX50 acoplado a computador marca DELL® onde se encontra instalado o software Image Pro Plus® para realização da análise morfométrica das vilosidades.

A morfometria consistiu em medidas lineares das vilosidades em desenho livre, tendo estas vilosidades, seus limites contornados, tomando-se o seu perímetro e a sua área, sendo que estas medidas foram tomadas após calibragem do software com régua micrometrada.

Figura 1- Ilustração do método de morfometria. Placenta de gestante HIV soropositiva mostrando vilosidades placentárias com áreas e perímetros demonstrados em amarelo. Medidas morfométricas foram realizadas automaticamente pelo software Image Pro Plus ® (em verde) após os contornos em amarelo terem sido realizados.



Cinco casos de cada grupo foram submetidos a esta técnica de morfometria das vilosidades, sendo medidas as áreas e perímetros em vinte vilosidades de cada caso. Estes dez casos foram submetidos à análise estatística para cálculo do erro amostral. Com este cálculo ficou determinado que teriam que ser realizadas 100 medidas de vilosidades em cada caso do estudo a fim de se obter diferenças estatisticamente significativas (quadro 1).

Quadro 1 - Análise estatística para cálculo de erro amostral para a morfometria

Grupo	Número de leituras	Erro percentual (amostral)
Controle	40	21,82% (78,18%)
	60	17,81% (82,19%)
	80	15,43% (84,57%)
	100	13,79% (86,21%)
Estudo	40	20,14% (79,86%)
	60	16,44% (83,56%)
	80	14,24% (85,76%)
	100	12,73% (87,27%)

A partir do cálculo de erro amostral para a morfometria determinamos que com 100 leituras de vilosidades placentárias de cada caso do estudo (n=116) configurando 11.600 leituras, teríamos mais de chance de obter dados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os dois grupos.

4.2 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Os mesmos casos submetidos à análise morfométrica foram, em seguida, analisados pela imunohistoquímica.

Os blocos dos casos deste projeto (n=116) foram recortados a 4 μ (micrômetros) sendo retirados 6 cortes de cada bloco para realização de imunohistoquímica pelo processo da imunoperoxidase.

Este processo passou por 2 fases distintas: padronização da técnica de pesquisa de antígenos virais (CMV, HSV e p24) em controles conhecidos e recomendados pela bula e prova do funcionamento da técnica padronizada nas placentas.

O anticorpo Anti-Herpes Simplex (HSV) Tipo 2 (MS) de coelho, marca DAKOCytomation®, reage com antígenos específicos do HSV Tipo 2 e com antígenos comuns ao HSV Tipos 1 e 2. O anticorpo reage com todas as principais glicoproteínas presentes no envelope viral e com pelo menos uma proteína do core viral, como determinado por imunoeletroforese cruzada. O

Anti-Herpes Simplex Tipo 2 é um anticorpo policlonal e adequado para a detecção do HSV em material celular humano, obtido a partir de lesões superficiais ou biópsias, e para a identificação do HSV em cultura de tecidos infectados. Como controle positivo para este anticorpo, usamos lâminas citológicas com cultura de HSV em células de carcinoma nasofaríngeo, preparadas pelo Laboratório de Virologia – HC – UFPR, o material de cultura e seu sobrenadante foi centrifugado em citospin marca Shandom®, sendo preparadas um total de 11 lâminas. A diluição recomendada pela bula do anticorpo é de 1:100, após sua padronização, determinamos que a diluição usada seria de 1:300 com a qual se obteve menos fundo (background) e melhores resultados de detecção viral, principalmente por se tratar de anticorpo policlonal.

O anticorpo monoclonal anti-citomegalovirus de camundongo, marca Zymed®, reconhece as proteínas 43kD e 76kD da glicina extraída do antígeno do citomegalovírus. Este anticorpo é usado para marcar células infectadas pelo CMV com reatividade nuclear. Num estágio tardio de infecção a reatividade poderá ser nuclear e citoplasmática. O anticorpo anti-citomegalovirus é apropriado para tecidos fixados em formalina ou cortes histológicos de congelação, mesmo sendo pré-diluído, após os testes, padronizamos a diluição em 1:10 obtendo, assim, melhores resultados. Como controle positivo usamos lâminas com corte histológico de intestino grosso de paciente transplantado de medula óssea com CMV disseminado.

O anticorpo monoclonal Anti-Humano Imunodeficiência Vírus de camundongo (p24), marca Dakocytomation®, é recomendado para o uso em imunohistoquímica. O HIV-1 é um retrovírus caracterizado pelo RNA genômico que é transcrito para o DNA pela transcriptase reversa. O anticorpo é usado para estudar a expressão da proteína p24 nas células infectadas pelo HIV-1. A p24 é uma proteína viral do capsídeo do HIV-1 e fica situada no núcleo do vírus, é inicialmente expressa como parte da proteína p55 (gag). Para tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina a diluição recomendada pelo fabricante é de 1:5 e como controle positivo da reação recomenda-se cortes histológicos de amígdalas de humanos infectados pelo HIV -1. Após os testes para padronização do anticorpo p24, utilizamos a diluição de 1:10 e como controle positivo usamos cortes histológicos de cérebro de pacientes sabidamente

infectados pelo HIV-1 com AIDS, níveis baixos de CD4/CD8 e carga viral acima de 150.000 cópias.

Para a demonstração de antígenos em tecidos, através da imunohistoquímica, a obtenção de uma coloração ideal depende da diluição correta do anticorpo primário. Todos os anticorpos foram diluídos com diluente de anticorpos Dakocytomation®, que consiste em um tampão Tris-HCL 0.05M contendo 0,1% de Tween, proteína transportadora, para reduzir a coloração de fundo (background) e Azida Sódica 15mM.

Como anticorpo secundário utilizamos o EnVision®+Dual Link/Peroxidase, marca Dakocytomation®. Este reagente contém imunoglobulinas de cabra anti-coelho e anti-camundongo, conjugadas a um polímero marcado com peroxidase, em tampão Tris-HCL, contendo proteína carreadora e um agente anti-microbiano.

Utilizamos como cromógeno, para revelar as reações, o 3,3'-diaminobenzidina ou DAB; Sistema Substrato-Cromógeno, marca Dakocytomation®. Este substrato-cromógeno é um sistema DAB de alta sensibilidade adequado para a utilização em imunohistoquímica, baseada na peroxidase e nos métodos de coloração por hibridização *in situ*. Na oxidação, o DAB forma um produto final marrom no sítio do antígeno ou ácido nucléico alvo. Na preparação do reagente adicionamos 1ml de substrato tamponado para cada gota de DAB cromógeno.

Etapas 1 – Padronização da técnica de imunoperoxidase para pesquisa de antígenos virais em material parafinado em controles conhecidos

Foi realizada a desparafinização com xilol quente (37°C), a desidratação com banhos sucessivos de álcool e a rehidratação com água. Todos os anticorpos foram testados utilizando-se a diluição recomendada pelo fabricante e mais duas diluições, duas vezes (2x) e quatro vezes (4x) a diluição recomendada pela bula do anticorpo, utilizando-se uma lâmina como controle negativo. Utilizou-se álcool metílico e H₂O₂ para o primeiro bloqueio da peroxidase endógena e a água destilada e H₂O₂ para o segundo bloqueio. Para recuperação antigênica, utilizou-se immunoretriever com citrato marca BioSB® em banho-maria a 99°C por 40 minutos. Procedeu-se com a incubação

com anticorpo primário overnight e com anticorpo secundário associado ao polímero de dextrana durante 30 minutos. Para a revelação, foi adicionado complexo DAB + substrato sobre as lâminas e a contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris, seguida de desidratação com banhos de álcool etílico 100% e da clarificação com xilol. Para a montagem das lâminas utilizou-se Entellan®. Após esta fase chegou-se a conclusão que as melhores diluições para cada anticorpo foram:

Quadro 2 – Diluições utilizadas após padronização

Anticorpo	Diluição recomendada	Diluição utilizada
CMV	Pré-diluído (uso direto)	1:10
P24	1:5	1:10
HSV	1:100	1:300

Figura 2 – Controle negativo para as reações de IHQ

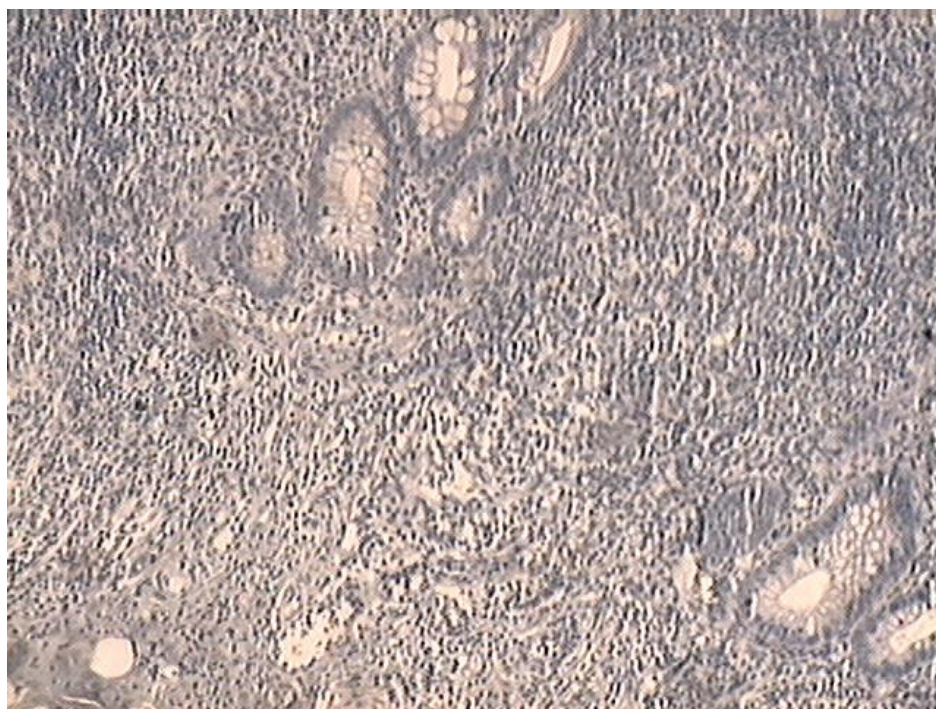


Figura 3 – Controle positivo para CMV

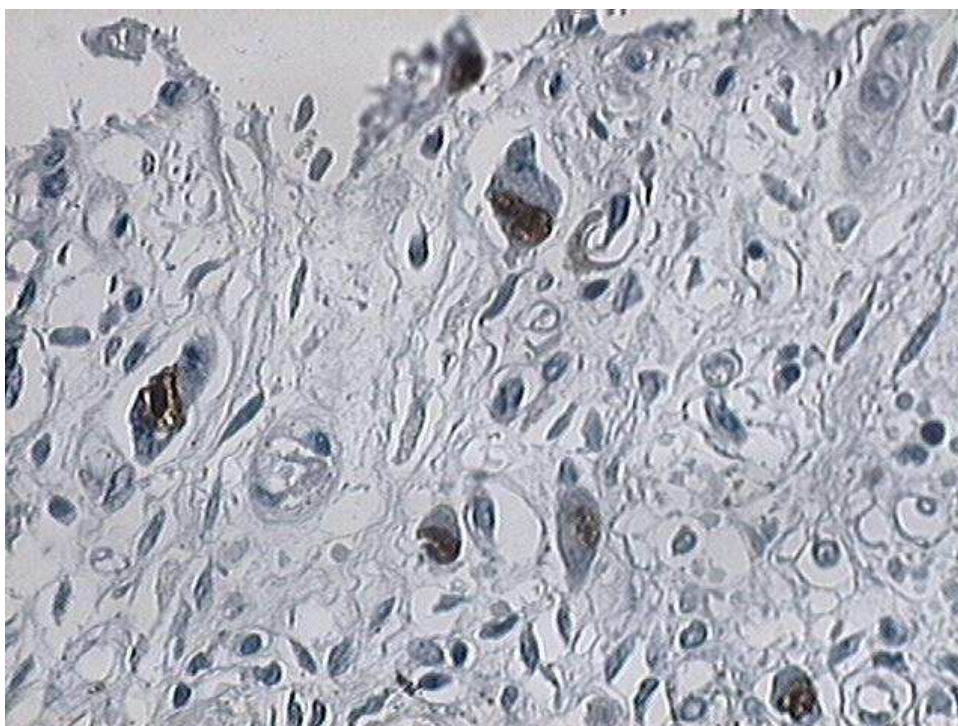


Figura 4 – Controle positivo para p24 (HIV)

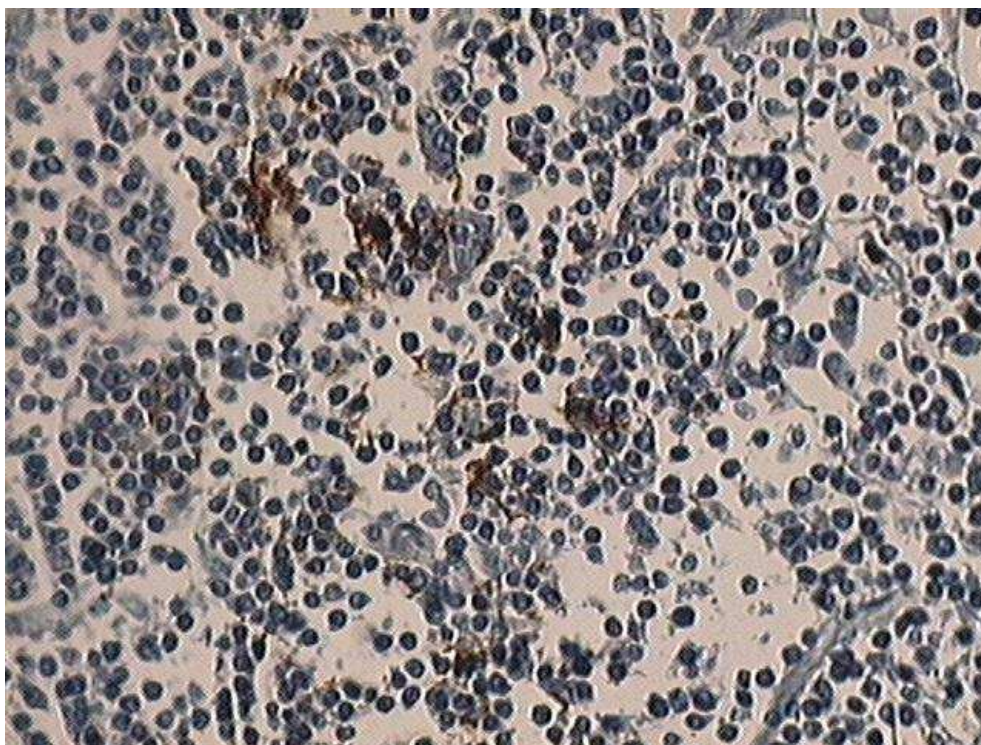
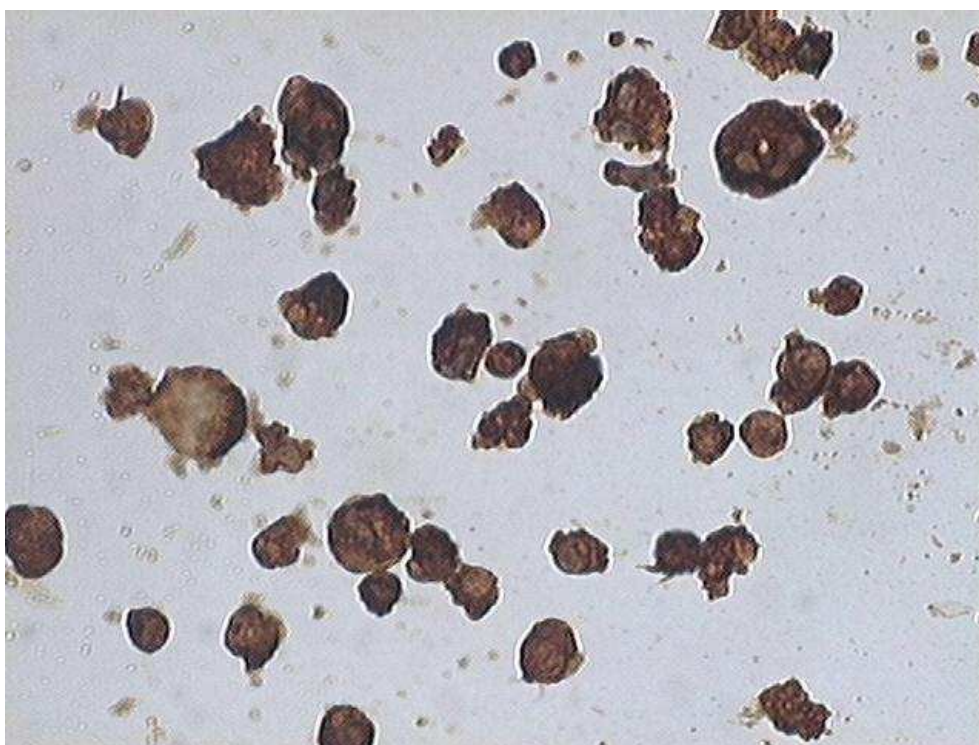


Figura 5 – Controle positivo para HSV



Etapa 2 – Aplicação do protocolo padronizado

Após a passagem pela etapa de padronização o protocolo foi aplicado aos casos selecionados para o estudo (n=116). Foram testados 56 casos do grupo experimento e 60 casos do grupo controle para o anticorpo anti-herpes, 56 casos do grupo experimento e 60 do grupo controle para o anti-p24 e 10 casos para o anti-CMV de ambos os grupos. As amostras para a realização dos testes do anti-CMV foram reduzidas pela pouca disponibilidade de anticorpos.

4.3 MÉTODO ESTATÍSTICO

4.3.1 Método estatístico para a morfometria

Para a análise estatística foram calculados os intervalos de 95% de confiança para a média. A comparação de pacientes HIV soropositivas com pacientes HIV soronegativas em relação à área e perímetro foi feita usando-se

o teste t de Student para amostras independentes, levando-se em consideração a homogeneidade das variâncias. Esta comparação, considerando-se conjuntamente a área e perímetro, foi feita usando-se a estatística de Rao. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Na análise dos dados quanto à sua distribuição de freqüências, foram encontrados 5 casos (3 soronegativas - grupo controle e 2 soropositivas - grupo experimento) com valores de área e/ou perímetro maiores do que o 3º quartil mais três vezes a amplitude interquartílica. Esses casos foram considerados outliers e retirados da análise, pois continham artefatos graves que prejudicariam os resultados morfométricos, permanecendo 57 casos de pacientes HIV soronegativas e 54 pacientes HIV soropositivas ($n=111$) para um total de 60 soronegativas e 56 soropositivas ($n=116$).

4.3.2 Método estatístico para a IHQ e dados clínicos

Neste estudo foram incluídas um total de 116 placentas, sendo 60 de pacientes HIV soronegativas e 56 de pacientes HIV soropositivas. As variáveis consideradas na análise foram: área e perímetro (morfometria), idade da mãe, idade gestacional e peso do bebê (variáveis clínicas) e imuno VSH, imuno P24 e imuno CMV (viral). O objetivo da análise foi descrever e comparar pacientes HIV soropositivos com pacientes HIV soronegativas em relação a estas variáveis.

Os resultados obtidos no estudo foram descritos por médias, desvios padrões, medianas, valores mínimos e máximos. Para as variáveis área e perímetro foram construídos os intervalos de 95% de confiança para a média. A comparação de pacientes HIV soropositivas com pacientes HIV soronegativas em relação às variáveis quantitativas foi feita usando-se o teste t de Student para amostras independentes ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, quando apropriado. Esta mesma comparação em relação a variáveis nominais dicotômicas foi feita usando-se o teste exato de Fisher. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

4.4 ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

A dissertação de mestrado intitulada “Análise morfométrica e imunohistoquímica em amostras parafinadas da placenta de gestantes HIV soropositivas”, a qual já tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR (Nº601), utilizou uma população de 56 gestantes HIV soropositivas e 60 gestantes HIV soronegativas que foram testadas com o anticorpo anti p24 para o HIV, além de anti-CMV e anti-herpes. Este trabalho será encaminhado para publicação ainda este ano.

O exame anatomopatológico da placenta de gestantes HIV soropositivas, bem como de outras gestantes de risco, já é realizado como rotina diagnóstica no Serviço de Anatomia Patológica-HC-UFPR. Os testes sorológicos e laboratoriais, pesquisados em prontuários, também são realizados, rotineiramente, em gestantes HIV soropositivas e seus recém-nascidos, atendidos pela maternidade e pela infectologia pediátrica do HC-UFPR. Os testes imunohistoquímicos já fazem parte de uma rotina investigativa do Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da PUCPR, sendo que vários dos anticorpos propostos já foram testados em outros projetos de pesquisa, com sucesso.

Por se tratar de um estudo retrospectivo - em que foi analisado material armazenado em arquivo do banco de dados do Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFPR e em prontuário de pacientes atendidos nesta instituição - foi encaminhado ao Comitê de Ética de Pesquisa do HC-UFPR a solicitação de autorização da utilização destas informações, respeitando as regras determinadas por este, para a proteção dos pacientes envolvidos na pesquisa. As pesquisas em amostras teciduais de blocos parafinados são seguras, sem risco de contaminação, uma vez que este material já foi processado anteriormente. Além disso, no caso de pesquisa em prontuários e em amostras já estocadas, fica dispensado o termo de consentimento informado das pacientes estudadas.

5. RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DA MORFOMETRIA:

Nas tabelas e gráficos 1 a 4 são expressos os resultados dos testes de distribuição de freqüências.

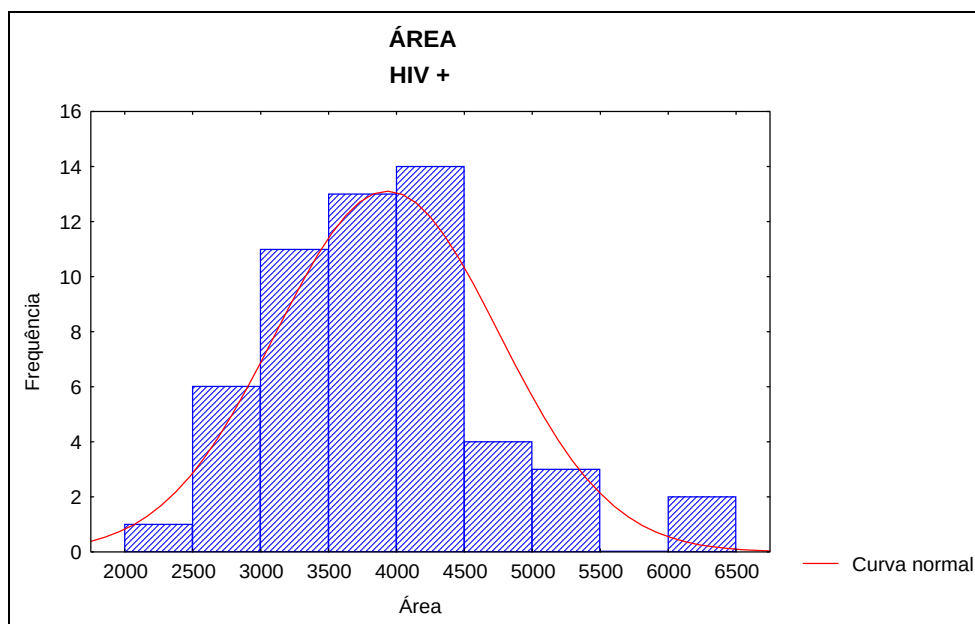
Para esta primeira análise estatística foram retirados 2 casos do grupo HIV soropositivo – outliers que apresentavam artefatos de fixação e processamento e 3 casos do grupo HIV soronegativo – outliers (artefatos).

Tabela 1 – Distribuições de freqüências de área de vilosidades placentárias para gestantes HIV soropositivas

Área	Freqüência	Percentual
2000,1 a 2500 μm	1	1,85
2500,1 a 3000 μm	6	11,11
3000,1 a 3500 μm	11	20,37
3500,1 a 4000 μm	13	24,07
4000,1 a 4500 μm	14	25,93
4500,1 a 5000 μm	4	7,41
5000,1 a 5500 μm	3	5,56
5500,1 a 6000 μm	0	0,00
6000,1 a 6500 μm	2	3,70
Total	54	100,00

Legenda: μm - micrômetro

Gráfico 1 - Distribuições de freqüências de área de vilosidades placentárias para gestantes HIV soropositivas



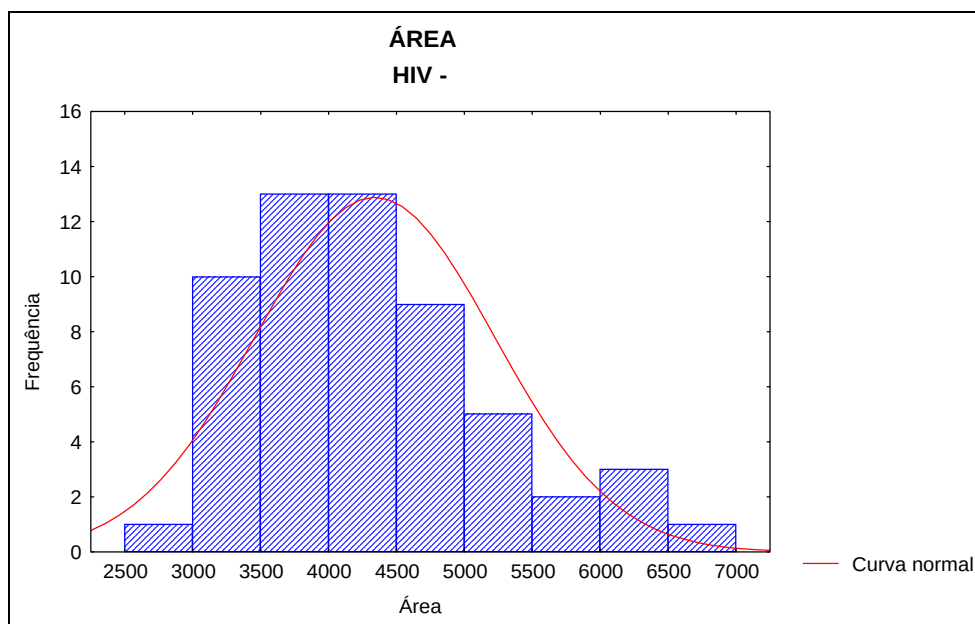
Legendas - HIV + : gestantes soropositivas

Tabela 2 - Distribuições de freqüências de área de vilosidades placentárias para gestantes HIV soronegativas

Área	Freqüência	Percentual
2500,1 a 3000 μm	1	1,75
3000,1 a 3500 μm	10	17,54
3500,1 a 4000 μm	13	22,81
4000,1 a 4500 μm	13	22,81
4500,1 a 5000 μm	9	15,79
5000,1 a 5500 μm	5	8,77
5500,1 a 6000 μm	2	3,51
6000,1 a 6500 μm	3	5,26
6500,1 a 7000 μm	1	1,75
Total	57	100,00

Legenda: μm- micrômetro

Gráfico 2 - Distribuições de freqüências de área de vilosidades placentárias para gestantes HIV soronegativas



Legendas: HIV - : gestantes soronegativas

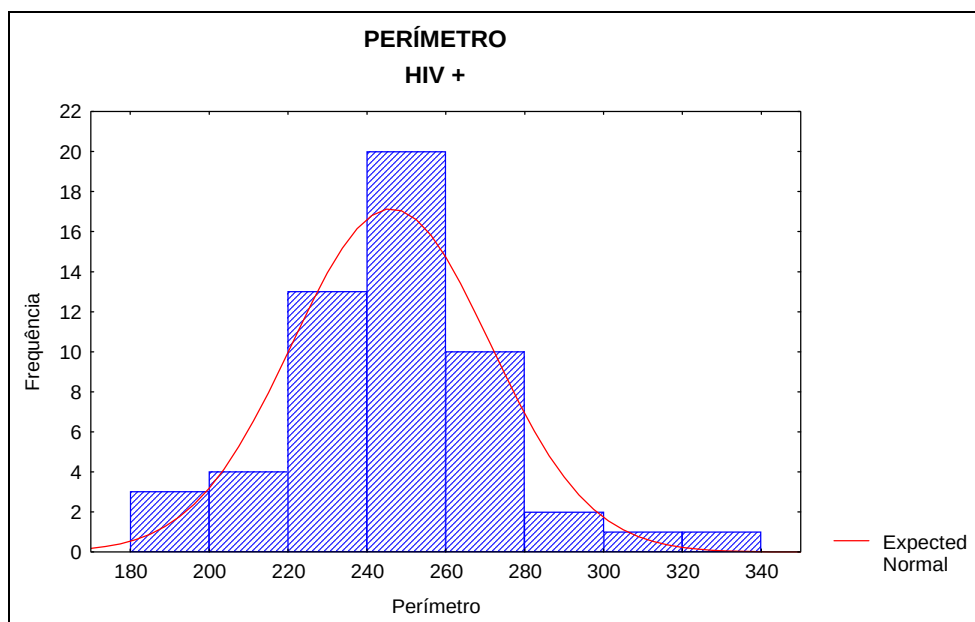
As tabelas 1 e 2 e os gráficos 1 e 2 demonstram a distribuição das freqüências de área de vilosidades placentárias das gestantes do grupo experimento (HIV+) e controle (HIV-) onde observa-se uma concentração de casos entre 3.500 e 4.500 micrômetros quadrados em ambos os grupos

Tabela 3 - Distribuições de freqüências de perímetro de vilosidades placentárias para gestantes HIV soropositivas

Perímetro	Freqüência	Percentual
180,1 a 200 μm	3	5,56
200,1 a 220 μm	4	7,41
220,1 a 240 μm	13	24,07
240,1 a 260 μm	20	37,04
260,1 a 280 μm	10	18,52
280,1 a 300 μm	2	3,70
300,1 a 320 μm	1	1,85
320,1 a 340 μm	1	1,85
Total	54	100,00

Legenda: μm- micrômetro

Gráfico 3 - Distribuições de freqüências de perímetro de vilosidades placentárias para gestantes HIV soropositivas



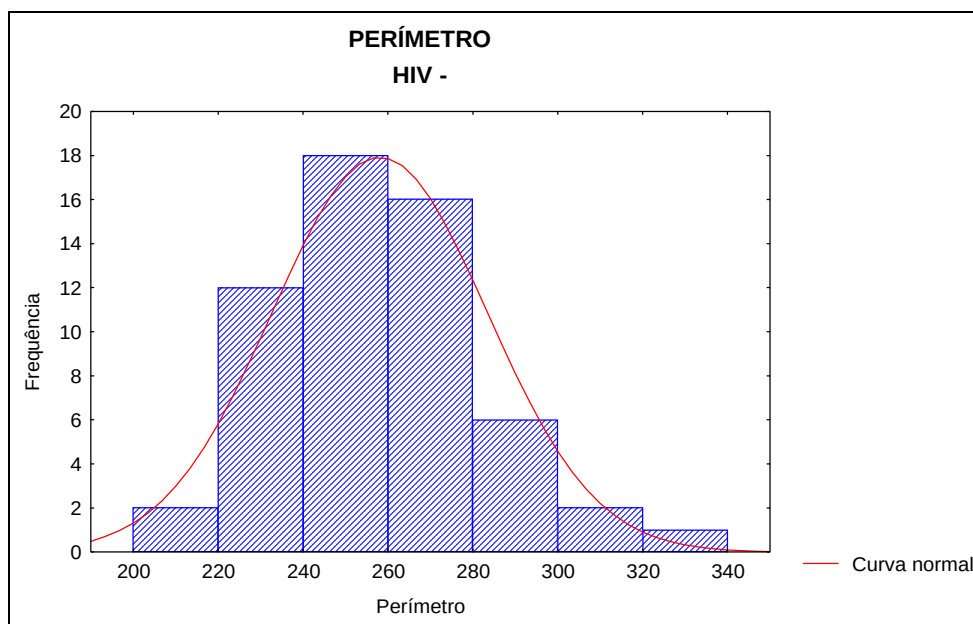
Legendas - HIV + : gestantes soropositivas

Tabela 4 - Distribuições de freqüências de perímetro de vilosidades placentárias para gestantes HIV soronegativas

Perímetro	Freqüência	Percentual
200,1 a 220 μm	2	3,51
220,1 a 240 μm	12	21,05
240,1 a 260 μm	18	31,58
260,1 a 280 μm	16	28,07
280,1 a 300 μm	6	10,53
300,1 a 320 μm	2	3,51
320,1 a 340 μm	1	1,75
Total	57	100,00

Legenda: μm- micrômetro

Gráfico 4 - Distribuições de freqüências de perímetro de vilosidades placentárias para gestantes HIV soronegativas



Legendas: HIV - : gestantes soronegativas

As tabelas 3 e 4 e os gráficos 3 e 4 demonstram a distribuição das freqüências de área e perímetro de vilosidades placentárias das gestantes do grupo experimento (HIV+) e controle (HIV-) onde se observa uma concentração de casos entre 220 e 280 micrômetros.

Para cada uma das variáveis área e perímetro, testou-se a hipótese nula de que as médias são iguais para gestantes HIV soropositivas e gestantes HIV soronegativas, versus a hipótese alternativa de médias diferentes. Na tabela 5 são apresentados os valores de médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões (dp) para área e perímetro, considerando-se os dois grupos de gestantes do estudo: HIV soropositivas (HIV+) e HIV soronegativas (HIV-).

Tabela 5 – Valores de médias, medianas, valores mínimos e máximos e dp para área e perímetro de vilosidades placentárias

Variável	Grupo	Média $\pm$ dp	Mediana (valores mínimo-máximo)	Valor de p*
Área	HIV + (n=54)	3932,94 $\pm$ 821,95	3842,37 (2483,98 - 6486,03)	0,014
	HIV – (n=57)	4339,93 $\pm$ 882,63	4231,80 (2897,87 - 6597,75)	
Perímetro	HIV + (n=54)	246,15 $\pm$ 25,14	244,60 (196,55 - 320,56)	0,015
	HIV – (n=57)	258,05 $\pm$ 25,38	255,74 (209,30 - 320,20)	

Legendas: (*) Teste t de Student para amostras independentes; dp:desvio padrão; HIV - : gestantes soronegativas; HIV + : gestantes soropositivas

Para as duas variáveis, área e perímetro, os resultados dos testes indicam a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5%. Sendo assim, podemos afirmar que existe diferença significativa entre gestantes HIV soropositivas e gestantes HIV soronegativas quanto à média da área e à média do perímetro. Na tabela 5, observa-se que para gestantes HIV soronegativas os valores de médias de área e de perímetro são maiores do que para gestantes HIV soropositivas.

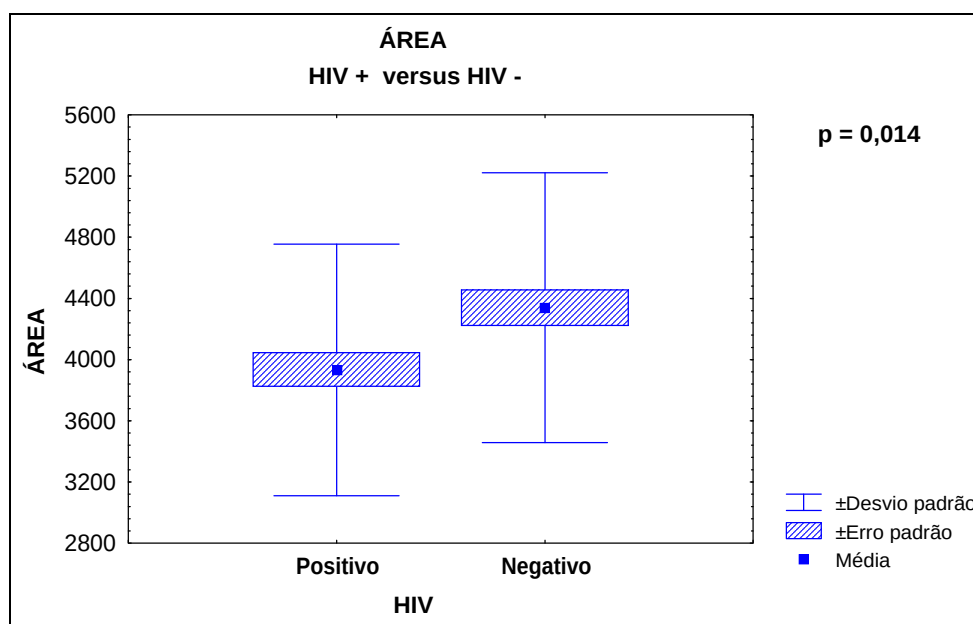
Na tabela 6 são apresentados os intervalos de 95% de confiança para a média de área e a média de perímetro, considerando-se os dois grupos de gestantes - HIV soropositivas (HIV+) e HIV soronegativas (HIV-) – onde observa-se que as gestantes soropositivas têm vilosidades menores que as gestantes soronegativas. Isto, também, observa-se nos gráficos 5 e 6.

Tabela 6 – Médias de área e perímetro de vilosidades placentárias para intervalo de 95% de confiança

Variável	Grupo	Intervalo de 95% de confiança para a média
Área	HIV + (n=54)	3708,59 - 4157,29
	HIV - (n=57)	4105,74 - 4574,13
Perímetro	HIV + (n=54)	239,29 - 253,02
	HIV - (n=57)	251,32 - 264,79

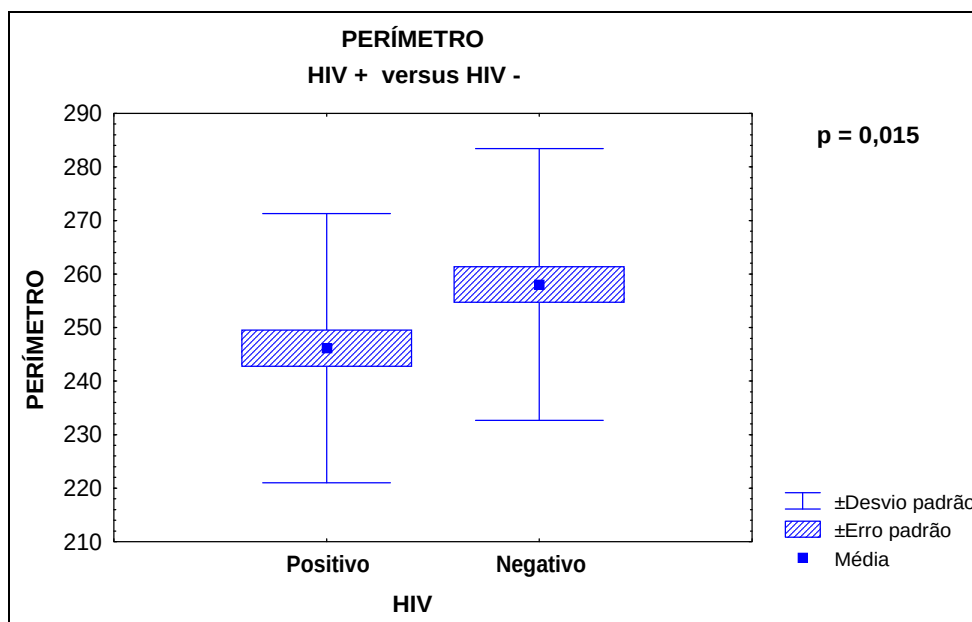
Legendas: HIV - : gestantes soronegativas; HIV + : gestantes soropositivas

Gráfico 5 - Médias de área de vilosidades placentárias para intervalo de 95% de confiança



Legendas: HIV - : gestantes soronegativas; HIV + : gestantes soropositivas

Gráfico 6 - Médias de perímetro de vilosidades placentárias para intervalo de 95% de confiança



Legendas: HIV - : gestantes soronegativas; HIV + : gestantes soropositivas

Testou-se a hipótese nula de que os vetores com componentes de médias de área e médias de perímetro são iguais para o grupo de gestantes HIV soropositivas e para o grupo de gestantes HIV soronegativas, versus a hipótese alternativa de vetores de médias diferentes. O resultado do teste indicou a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ($p = 0,047$). Sendo assim, podemos afirmar que existe diferença entre gestantes HIV soropositivas e gestantes HIV soronegativas quando comparados de forma conjunta em relação à média de área e média de perímetro das vilosidades placentárias.

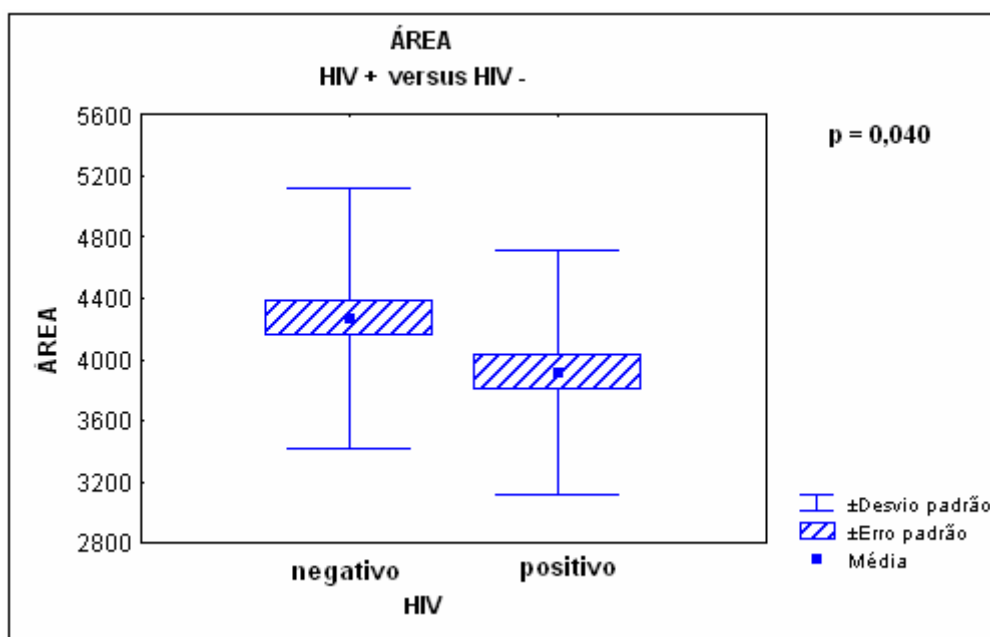
Na tabela 7, bem como, nos gráficos 7 e 8 são apresentados os intervalos de 95% de confiança para a média de área e a média de perímetro das vilosidades, considerando-se os dois grupos de gestantes: HIV soropositivas e HIV soronegativas, onde se observa que as gestantes soropositivas têm vilosidades menores que as gestantes soronegativas.

Tabela 7 - Médias de perímetro e área de vilosidades placentárias para intervalo de 95% de confiança

Variável	Grupo	Intervalo de 95% de confiança para a média
Área	HIV + (n=46)	3680,10- 4153,55
	HIV - (n=51)	4027,3- 4505,88
Perímetro	HIV + (n=46)	238,20- 253,02
	HIV - (n=51)	249,30- 263,03

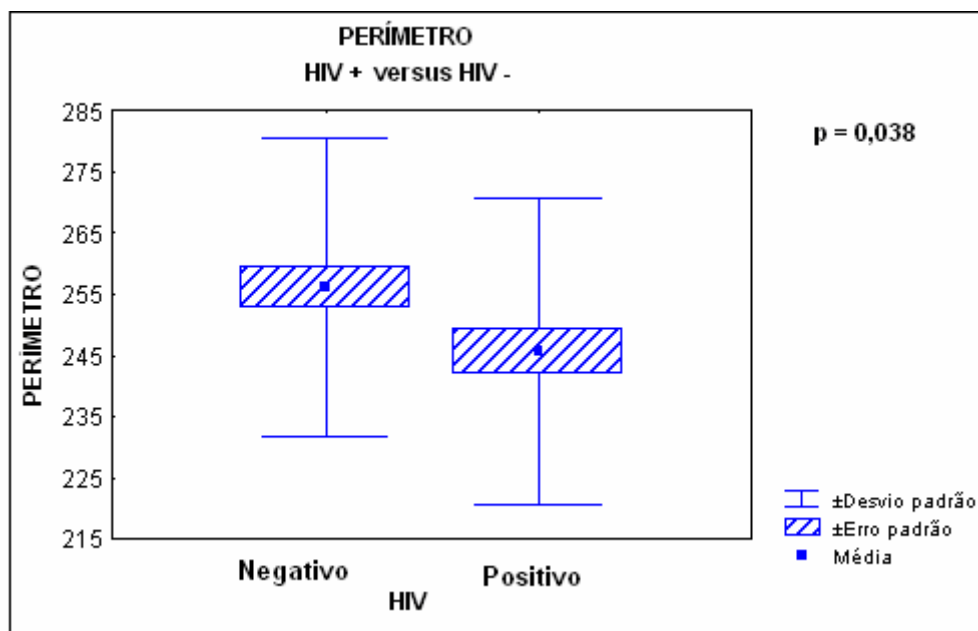
Legendas: HIV - : gestantes soronegativas; HIV + : gestantes soropositivas

Gráfico 7 - Médias de área de vilosidades placentárias para intervalo de 95% de confiança



Legendas: HIV - : gestantes soronegativas; HIV + : gestantes soropositivas

Gráfico 8 - Médias de perímetro de vilosidades placentárias para intervalo de 95% de confiança



Legendas: HIV - : gestantes soronegativas; HIV + : gestantes soropositivas

Após esta primeira análise estatística os pesquisadores fizeram uma nova análise morfológica das lâminas histológicas coradas em H.E., a fim de detectar alterações mínimas que, porventura, não tinham sido detectadas na primeira revisão. Nestas novas avaliações foram observados alguns casos com alterações mínimas, sendo feita uma nova análise estatística.

Para esta nova análise estatística foram retirados 10 casos do grupo HIV soropositivo – 2 outliers que apresentavam artefatos de fixação e processamento e mais 8 com algumas alterações mínimas (discreto aumento de celularidade do estroma viloso) que poderiam alterar os testes morfométricos. Também foram retirados 9 casos do grupo HIV soronegativo – 3 outliers (artefatos) e mais 6 casos com alterações mínimas. Para cada uma das variáveis área e perímetro de vilosidades placentárias, testou-se a hipótese nula de que as médias são iguais para gestantes HIV soropositivas e gestantes HIV soronegativas, versus a hipótese alternativa de médias diferentes. Na tabela 8 abaixo são apresentados os valores de médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões (dp) das variáveis analisadas, considerando-se os dois grupos de gestantes do estudo: HIV soropositivas e HIV soronegativas.

Tabela 8 - Valores de médias, medianas, valores mínimos e máximos e dp das variáveis

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Área	HIV +	46	3916,81	3847,28	2483,98	6486,03	797,22	0,040
	HIV-	51	4266,59	4177,72	2897,87	6597,75	850,80	
Perímetro	HIV +	46	245,61	244,60	196,55	320,56	24,94	0,038
	HIV-	51	256,16	254,50	209,30	317,55	24,42	

Legendas: (*) Teste t de Student para amostras independentes; dp:desvio padrão; HIV - : gestantes soronegativas; HIV + : gestantes soropositivas

Para as variáveis, área e perímetro, de vilosidades placentárias, os resultados dos testes indicam a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5%. Sendo assim, podemos afirmar que existe diferença significativa entre gestantes HIV soropositivas e gestantes HIV soronegativas quanto à média da área e à média do perímetro de vilosidades placentárias. Na tabela 8, observa-se que para gestantes HIV soronegativas os valores de médias de área e de perímetro de vilosidades placentárias são maiores do que para gestantes HIV soropositivas.

5.2 RESULTADOS DA IMUNOHISTOQUÍMICA:

Tabela 9 – Resultados imunohistoquímicos obtidos com os anticorpos anti CMV, anti HSV e anti-p24 nas placentas de gestantes HIV soropositivas e HIV soronegativas.

Anticorpo	soropositivas	soronegativas
HSV+	8	12
HSV-	48	48
P24 +	01	00
P24-	55	60
CMV+	0	0
CMV-	*10	*10

Legendas - HSV+ : positivo para anticorpo anti-herpes; HSV - : negativo para anticorpo anti-herpes; P24+ : positivo para anticorpo anti-HIV; P24 - : negativo para anticorpo anti-HIV; CMV+ : positivo para anticorpo anti-CMV; CMV - : negativo para anticorpo anti-CMV; (*) Foram testados somente 10 casos para este anticorpo.

Para cada uma das variáveis imunohistoquímicas, testou-se a hipótese nula de que a proporção de casos com resultado positivo é igual para gestantes HIV soropositivas e para gestantes HIV soronegativas, versus a hipótese alternativa de proporções diferentes. Nas tabelas 10, 11 e 12 abaixo são apresentados os resultados obtidos no estudo.

Tabela 10 – Teste de hipótese para os resultados imunohistoquímicos com o anticorpo anti herpes nos grupos de gestantes HIV soropositivas e soronegativas

Imuno-HSV	HIV	
	Negativo	Positivo
Positivo	12 20%	8 14%
Negativo	48 80%	48 86%
Total	60	56

Valor de p: 1

Tabela 11 – Teste de hipótese para os resultados imunohistoquímicos com o anticorpo p24 nos grupos de gestantes HIV soropositivas e soronegativas

Imuno-P24	HIV	
	Negativo	Positivo
Positivo	0 0%	1 1,79%
Negativo	60 100%	55 98,21%
Total	60	56

Valor de p: 1

Tabela 12 - Teste de hipótese para os resultados imunohistoquímicos com o anticorpo anti CMV nos grupos de gestantes HIV soropositivas e soronegativas

Imuno-CMV	HIV	
	Negativo	Positivo
Positivo	0 0%	0 0%
Negativo	10 100%	10 100%
Total	10*	10*

Valor de p: 1

(*) Foram testados somente 10 casos para este anticorpo

Observamos nas tabelas 9, 10, 11 e 12 que não foram encontradas diferenças significativas entre gestantes HIV soropositivas e gestantes HIV soronegativas em relação às variáveis imunohistoquímicas.

5.2.1 Comparação entre os grupos de gestantes HIV soropositivas e HIV soronegativas em relação às variáveis idade da mãe, idade gestacional e peso do bebê.

Para as variáveis idade da mãe e peso do bebê, testou-se a hipótese nula de que as médias são iguais para gestantes HIV soropositivas e para gestantes HIV soronegativas, versus a hipótese alternativa de médias diferentes. Para a variável idade gestacional, testou-se a hipótese nula de que os resultados para gestantes HIV soropositivas são iguais aos resultados para gestantes HIV soronegativas, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na tabela 13 abaixo são apresentados os valores de médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões (dp) das variáveis analisadas, considerando-se os dois grupos de gestantes do estudo: HIV soropositivas e HIV soronegativas.

Tabela 13 - Valores de médias, medianas, valores mínimos e máximos e dp das variáveis

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Idade da mãe	HIV +	50	26,68	26	13	42	6,66	0,694
	HIV-	44	26,11	25	15	42	7,25	
Idade gestacional	HIV +	41	36,95	38	25	40	3,63	0,714**
	HIV-	47	36,38	38	25	40	4,16	
Peso do bebê	HIV +	16	2830,63	2832,5	2260	3690	378,60	0,166
	HIV-	33	3071,52	2960	1530	5305	818,64	

Legendas : (*) Teste t de Student para amostras independentes; (**) Teste não-paramétrico de Mann-Whitney; Dp- desvio padrão; HIV - : gestantes soronegativas; HIV + : gestantes soropositivas

Não foram encontradas diferenças significativas entre gestantes HIV soropositivas e gestantes HIV soronegativas em relação às variáveis idade da mãe, idade gestacional e peso do bebê.

A média da relação de CD4/CD8 pouco antes do parto, neste estudo, foi de 0,7 e carga viral média foi de 4.248,83 cópias. Somente 9 gestantes, das 56 HIV soropositivas, não realizaram terapia antiretroviral. A taxa clínica de transmissão vertical do HIV confirmado pelo exame sorológico do recém-nascido foi de 3 casos em 56 neste estudo, sendo que os três bebês já foram a óbito, antes do término deste estudo (taxa de transmissão vertical do HIV neste estudo = 5,35%).

6. DISCUSSÃO

Neste estudo analisamos placentas obtidas de gestantes HIV soropositivas, cujo exame histológico não revelou alterações anatomopatológicas comparando com os casos do grupo controle, ou seja, placentas de gestantes HIV soronegativas com exame anatomopatológico normal. Isto porque, apesar do aspecto normal do tecido placentário, não se pode afirmar que não existam alterações anatomopatológicas mínimas não detectadas no exame de rotina para os casos HIV soropositivos. Estas alterações poderiam se tornar evidentes utilizando-se métodos diagnósticos mais específicos ou sensíveis tais como a morfometria e a imunohistoquímica.

O exame anatomopatológico da placenta de gestantes portadoras do HIV, embora geralmente sem alterações, é de suma importância por que pode contribuir para o diagnóstico de várias doenças, além de fornecer informações e dados estatísticos adicionais a serem somados aos já existentes na literatura (BRASILEIRO FILHO, 2000, 563). Nestes casos, o exame anatomopatológico mais detalhado pode encontrar alterações placentárias discretas, tais como o aumento da celularidade do estroma vilositário e o espessamento da membrana basal de vasos. O mesmo exame anatomopatológico também pode ainda revelar, ocasionalmente, focos de necrose e vasculite aguda nos vilos placentários. Estas últimas alterações são raras em gestantes apenas soropositivas, entretanto são mais comuns em pacientes com AIDS. As gestantes com AIDS podem apresentar ainda corioamnionites, onfalites, deciduites e intervilosites agudas, freqüentemente relacionadas às infecções recorrentes oportunistas, lesões estas geralmente não encontradas em gestantes apenas portadoras do HIV (BRASILEIRO FILHO, 1993, 568). Schwartz e colaboradores (2000) concluíram em seu estudo com placentas de mulheres apenas soropositivas que as mesmas podem ter um risco aumentado para lesões inflamatórias placentárias tais como corioamnionites e onfalites. Em outro estudo que analisou o número de abortos de primeiro trimestre em gestantes soropositivas, os autores concluíram que estes eventos podem não estar relacionados a infecção pelo HIV, desde que o número dos mesmos parece ser maior em mulheres soronegativas. O mesmo estudo ainda conclui que há uma significativa associação entre a transmissão do HIV para o feto e os achados histológicos da corioamnionite e células necróticas (BHOOPAT *et al.*, 2005).

O nosso estudo não analisou as placentas das gestantes soropositivas com lesão, isto é, com corioamnionites, deciduites entre outras infecções e inflamações. Estes casos foram excluídos já no início do projeto, bem como os casos de gestantes com AIDS. Em vista disso, não podemos determinar a influência destas lesões nas taxas de transmissão vertical do HIV, uma vez que este não era o objetivo deste estudo. Este estudo teve como objetivo realizar uma avaliação das taxas de transmissão vertical do HIV e de co-infecções nas gestantes soropositivas em amostras parafinadas de placentas de histologia normal. A hipótese principal deste estudo foi de que a transmissão vertical seria influenciada por co-infecções que auxiliam na quebra da barreira feto-placentária, mesmo na ausência de processo inflamatório. Esta hipótese baseia-se em evidências de que a placenta e sua respectiva função de barreira, quando íntegra, desempenham importante papel na prevenção da transmissão vertical do HIV e que os agentes infecciosos, principalmente os agentes virais, podem ter um efeito de quebra de barreira quando associados ao HIV.

Alguns fatos já conhecidos na literatura suportam esta hipótese: por exemplo, sabe-se que algumas infecções ocorrem de maneira mais severa nas gestantes, principalmente nas soropositivas, como infecções por CMV, herpes e papiloma vírus humano. Além disso, as co-infecções pré-natais em gestantes soropositivas, mesmo que apenas portadoras de HIV, são consideradas como fator de risco para a transmissão do mesmo ao conceito associadas ou não a via de parto e ao aleitamento, mesmo na presença de terapia antiretroviral (BIEDERMANN *et al.* 1995, 191). Além disso, alguns autores puderam observar que a citomegalovirose possui um efeito somatório na progressão do HIV no sentido de acelerar a transmissão do mesmo. Ao analisar as interações entre o HIV-1 e o CMV em células sinciciotrofoblásticas a termo, cultivadas *in vitro*, demonstrou-se que a replicação do HIV-1 foi potencializada pelo CMV quando ambos os vírus foram adicionados simultaneamente. As células já infectadas pelo CMV que foram superinfectadas pelo HIV-1 demonstraram o efeito estimulador do CMV sobre a replicação do HIV-1. Além disso, a infecção prévia das células sinciciotrofoblásticas com HIV-1 converteu a infecção pelo CMV para uma infecção ativa (NORTHFIELD, 2005, 5; TOTH *et al.*, 1995, 2225 e KILANI *et al.*, 1997, 6365). Outro fato interessante acerca das infecções virais

é que as infecções maternas pelo HSV-1 e 2 são muito comuns durante a gravidez e estão associadas com um risco aumentado de aborto, entretanto, a transmissão feto-placentária do HSV é rara. Estas observações sugerem que a placenta está muito exposta ao HSV-1 e 2, mas que a mesma impede geralmente a transmissão vertical do vírus. Infelizmente, os mecanismos por que a placenta resiste ou permite a transmissão de HSV e de outros vírus da mãe à circulação fetal são ainda pouco conhecidos e, mais ainda, os mecanismos pelo qual o HIV pode influenciar neste delicado equilíbrio da barreira placentária estão pouco elucidados até o momento (KOI *et al.*, 2002, 1572).

A morfometria foi utilizada neste estudo no sentido de detectar mínimas alterações de tamanho nas vilosidades placentárias de gestantes soropositivas, que porventura não tenham sido detectadas nos exames de rotina e na revisão das lâminas, realizada antes da inclusão dos casos neste estudo. Isto é, apesar do aspecto anatomopatológico ser compatível com a normalidade, levantou-se a hipótese de que a morfometria poderia ser útil em detectar mínimas alterações na forma e no tamanho destas.

Após a primeira análise estatística, os achados morfométricos deste estudo revelaram alterações do diâmetro e do perímetro de vilosidades placentárias de gestantes HIV soropositivas. Porém, depois de uma nova revisão de lâminas, alguns casos tiveram que ser excluídos desta análise estatística. Estes casos apresentavam exame anatomopatológico com discretas alterações relacionadas ao aumento da celularidade do estroma vilositário. Em vista disso, a fim de respeitar o objetivo principal deste estudo que seria uma análise de casos totalmente normais, estas amostras foram excluídas e uma nova análise estatística foi realizada. Novamente, os achados morfométricos revelaram alterações do diâmetro e do perímetro de vilosidades placentárias, sugerindo alterações de maturação, que poderiam ser causadas pela própria infecção viral e/ou até mesmo pelo uso de drogas antiretrovirais, uma vez que a grande maioria das pacientes realizou este tipo de profilaxia. Evidências indicam que, geralmente, as infecções virais costumam causar retardo na maturação das vilosidades placentárias (BRASILEIRO FILHO, 2000, 569), nos causando surpresa este achado de provável aceleração da maturação. Por este motivo acreditamos que esta aceleração pode não estar

relacionada à infecção pelo HIV e sim pelo uso de medicamentos antiretrovirais e talvez pelo próprio grupo de risco à que estas pacientes pertencem, tal como drogadição, por exemplo. Quase todos os medicamentos podem causar aceleração da maturação das vilosidades (BRASILEIRO FILHO, 2000, 569) bem como o uso de drogas ilícitas e o tabagismo. A idade gestacional das gestantes foi pareada, portanto este fato não poderia estar influenciando na alteração de maturação encontrada. Não foi possível comparar nossos dados com os dados de literatura, uma vez que não encontramos trabalhos que utilizaram morfometria de vilosidades em gestantes soropositivas. Serão necessários outros desenhos de estudo, englobando a análise de grupos de risco para o HIV e análise de grupos que não utilizaram terapia antiretroviral, entre outros, para que se possa chegar a alguma conclusão acerca da causa desta aceleração de maturação, encontrada nas gestantes soropositivas deste estudo.

As técnicas de imunohistoquímica, aplicadas em amostras parafinadas de qualquer tipo tecidual, são muito úteis na detecção de agentes infecciosos em geral. Em gestantes, as infecções crônicas perinatais mais típicas tais como a rubéola, citomegalovirose, herpes e toxoplasmose podem ser detectadas por métodos imunohistoquímicos. O CMV, por exemplo, é um vírus que pode ser detectado em cortes histológicos através da imunohistoquímica ou da hibridação *in situ*. O diagnóstico é confirmado à visualização de inclusões virais características, presença de material antigênico ou seqüências genômicas do CMV em células endoteliais de vasos associados a capilarite (BRASILEIRO FILHO, 2000, 569). O mesmo acontece com o grupo HSV.

As afecções em imunocomprometidos se manifestam por meio de quadros clínicos e anatomopatológicos geralmente atípicos. Em vista disso, tornam-se necessários exames complementares utilizando-se métodos diagnósticos mais precisos a fim de detectar os agentes infecciosos. As técnicas de imunohistoquímica, por exemplo, têm importante papel no diagnóstico de agentes infecciosos ou de seus produtos antigênicos.

Em geral, como já foi relatado, mães apenas portadoras do vírus HIV possuem placenta de aspecto normal, porém, amostras submetidas à análise imunohistoquímica, mostram reações positivas quando expostas a alguns anticorpos para vírus (VILLEGAS-CASTREJON *et al*, 1996, 173).

BRUCH *et al.* (1992), relata que o exame imunohistoquímico pôde revelar a presença de alguns antígenos específicos do HIV, mesmo na ausência de lesões histológicas, assim como na ausência do vírus replicado, além disso, o estudo afirma que o exame placentário detalhado em casos de infecções virais é fundamental.

No nosso estudo, a frequência dos achados de positividade imunohistoquímica para vírus causadores de infecções intra-uterinas, tais como CMV e Herpes Simples, em placentas normais de gestantes HIV soropositivas, não foi diferente daquela encontrada no grupo controle. Este achado pode ser explicado por diversos fatores: 1 – quase todas as pacientes deste estudo realizaram terapia antiretroviral (somente 9 do 56 casos não realizam tratamento); 2 – a carga viral média no período peri-parto das 56 pacientes estudadas foi muito baixa e 3 – a relação CD4/CD8 destas pacientes no período peri-parto esteve muito próxima de 1. Em vista disso, podemos supor que do ponto de vista imunológico estas pacientes são muito semelhantes as do grupo controle, isto é, elas não são imunossuprimidas. Por este motivo, a incidência de co-infecções virais nestas 56 gestantes soropositivas (CMV e herpes) poderia ser semelhante a incidência vista em gestantes não HIV soropositivas. No entanto, deve-se levar em consideração que testamos somente 10 casos para o CMV.

Quando analisamos os achados de literatura sobre a detecção do HIV em tecidos placentários não fixados de gestantes soropositivas através de métodos moleculares (PCR), observamos que placentas humanas infectadas pelo HIV apresentam o vírus, o qual se localiza principalmente nos sinciciotrofoblastos e nos macrófagos ou histiócitos de Hofbauer (SHEIKH, 2000, 210 e MENU *et al.*, 1999, 48). Porém, quando estudamos a detecção do HIV em amostras fixadas em formol e embebidas em parafina pudemos observar que o método mais adequado seria através da técnica de imunohistoquímica, porém ainda com pouca sensibilidade quando se utilizam amostras de gestantes soropositivas em uso de terapia antiretroviral. Isto se deve provavelmente ao fato de que estas pacientes geralmente têm carga viral muito baixa a níveis de CD4 e CD8 próximos do normal, o que minimiza a disseminação do HIV em tecido placentários. Há diversos anticorpos disponíveis comercialmente contra antígenos do HIV, tais como o anti-p24,

anti-gp120 e anti-gp41, entre outros. O anticorpo anti-p24, através da imunohistoquímica, mostra geralmente positividade citoplasmática em células das vilosidades de placentas de mulheres soropositivas sem terapia antiretroviral, células estas que são compatíveis com macrófagos ou histiócitos de Hofbauer (MATTERN *et al.*, 1992). O exame imunohistoquímico realizado com o anticorpo anti-gp41 em amostras de placentas de gestantes HIV soropositivas sem qualquer tratamento antiretroviral também revela células do estroma e da superfície vilositária reativas, indicando que o vírus pode estar presente em qualquer parte da vilosidade coriônica (VILLEGAS-CASTREJON *et al.*, 1996, 172). As placentas obtidas de mulheres HIV soropositivas fazendo uso de terapia antiretroviral freqüentemente não apresentaram nenhuma anormalidade macroscópica ou histológica, e o exame imunohistoquímico geralmente não detecta os antígenos anti-p24, anti-gp41 e anti-gp120 do HIV-1. Além disso, não foram encontrados, por PCR, o DNA e RNA do HIV nos trofoblastos. Isto pode indicar que a barreira trofoblástica nas placentas a termo pode impedir a transmissão do HIV (LEE *et al.*, 1997, 3631 e TSCHERNING-CASPER *et al.*, 1999, 9673). Entretanto, quando se estudam placentas com anormalidades macro e microscópica, tais como a corioamnionite a decíduite, o exame imunohistoquímico realizado com o anticorpo anti-p24 demonstra que estas alterações podem estar relacionadas à presença do vírus (CHANDWANI *et al.*, 1991, 1137 e BHOOPAT *et al.*, 2005).

Todos os dados dos estudos apresentados acima vêm corroborar achados desse trabalho onde apenas uma paciente apresentou positividade para o p24 em amostra parafinada de placenta, sendo que a paciente em questão não realizou terapia antiretroviral e o seu bebê faleceu de AIDS antes de um ano de vida. Os baixos índices de detecção do p24 neste estudo podem ser devidos à presença de terapia antiretroviral em quase a totalidade das pacientes, bem como carga viral baixa e boa relação CD4/CD8. Além disso, a taxa de transmissão vertical clínica foi baixa neste estudo (3 em 56), isto é, somente 3 pacientes tiveram confirmadas a TV do HIV para o conceito, portanto seriam candidatas a positividade do P24.

A limitação da disseminação do vírus HIV-1 no tecido placentário e da sua passagem através da barreira trofoblástica dependem de ações sinérgicas de vários fatores tais como as quimiocinas RANTES e MIP-1 beta e a citocina

fator inibidor de leucemia, que exibem atividade anti HIV-1 impedindo a infecção das células trofoblásticas (DERRIEN *et al.*, 2005). O TNF-alfa e interleucina 1 também parecem ter papel limitante na progressão da infecção pelo HIV em doses fisiológicas, uma vez que atuam diminuindo a produção e o desenvolvimento de vírions (VIDRICAIRE, 2003). Já quando a secreção destes dois últimos fatores está elevada, a expressão do vírus também é significativamente aumentada, fato este que pode facilitar a transmissão do HIV, particularmente em contexto inflamatório. Isto pode explicar o aumento das taxas de transmissão feto-placentária do HIV associada à presença de co-infecções perinatais e, conseqüentemente, de processos inflamatórios com maior secreção de quimiocinas e TNF (KFUTWAH *et al.*, 2006). No que diz respeito ao papel das células inflamatórias envolvidas nas respostas imunes associadas a presença do HIV bem como a presença co-infecções perinatais, pudemos observar que o macrófago fixo da vilosidade placentária ou histiócito de Hofbauer parece ter um importante papel de apresentação de antígeno e de progressão da doença. Parece que o HIV-1 não induz efeitos citopáticos nos macrófagos placentários e nenhuma alteração morfológica é observada coincidente com a infecção. Porém, é comum o achado de antígenos p24 nos macrófagos placentários (FEAR *et al.*, 1998, 1336). Além disso, foi constatado que as interações entre as células sinciciotrofoblásticas e os macrófagos placentários com HIV latente interrompem o período de latência do HIV e induzem a sua replicação nas células sinciciotrofoblásticas, sugerindo que esta interação tem papel na disseminação do HIV-1 na placenta e conseqüentemente no aumento das taxas de transmissão vertical. Além disso, a presença de co-infecções pode ativar sobremaneira os macrófagos, aumentando as interações entre estas células e as células sinciciotrofoblásticas, facilitando assim a progressão do HIV (BACSI *et al.*, 2001, 1084).

A taxa de transmissão vertical neste estudo, entre os anos de 2004 e 2005 foi de 5,35%, ficando bem abaixo dos 13%, valor mínimo estimado quando não há profilaxia antiretroviral, porém muito acima dos valores de 1 a 2,5%, meta a ser alcançada pelo governo brasileiro com a distribuição gratuita de medicamentos antiretrovirais.

Os dados gerados por este estudo, são interessantes e nortearam os pesquisadores a ampliar a amostra de pacientes gestantes HIV soropositivas, bem como os testes a serem realizados a fim de obter resultados mais consistentes e que possam nortear as ações de saúde pública em relação à transmissão vertical do HIV.

7.CONCLUSÕES

1. A taxa clínica de transmissão vertical neste estudo, entre os anos de 2004 e 2005, foi de 5,35%;

2. No nosso estudo apenas uma das 3 pacientes que apresentaram TV clínica apresentou positividade para o p24 em amostra parafinada de placenta (taxa de transmissão anatomopatológica);

3. Os achados morfométricos deste estudo revelam diferenças de diâmetro e de perímetro de vilosidades placentárias de gestantes HIV soropositivas, as quais são menores que aquelas do grupo controle, sugerindo alterações de maturação;

4. A frequência dos achados de positividade imunohistoquímica para vírus causadores de infecções intra-uterinas (CMV e Herpes Simples) em placentas de gestantes HIV soropositivas não foi diferente daquela encontrada no grupo controle.

8. REFERÊNCIAS

1. BACSI, A; CSOMA, E; BECK, Z; ANDIRKO, I; KONYA, J; GERGELY, L; TOTH, FD. **Induction of HIV-1 replication in latently infected syncytiotrophoblast cells by contact with placental macrophages: role of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha.** J Interferon Cytokine Res, 21: 1079-88. dec 2001.
2. BARTLETT JG, GALLANT JE. **Tratamento clínico da infecção pelo HIV.** Baltimore: Johns Hopkins University; 2001-2002.
3. BHOOPAT L; KHUNAMORN PONG S; SIRIVATANAPA P; RITHAPORN T; LERDSRIMONGKOL P; THORNER PS; BHOOPAT T. **Corioamnionitis is associated with placental transmission of human immunodeficiency virus-1 subtype E in the early gestational period.** Mod Pathol, 18 (10): 1357-64. oct 2005.
4. BIEDERMANN, K; FLEPP, M; FIERZ, W; JOLLER-JEMELKA, H; KLEIHUES, P. **Pregnancy, immunodepression and reactivation of latent toxoplasmosis.** J Perinat Med, 23 (3): 191-203. 1995.
5. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE AIDS 2001/2002. **Ministério da Saúde**
6. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE AIDS 2004. **Ministério da Saúde.** Ano XVII, 25 a 52 Semanas Epidemiológicas, julho-dezembro, 2004.
7. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE CURITIBA. **Secretaria Municipal de Saúde, 1, 2006.** Publicação eletrônica [mensagem pessoal]. Disponível em: www.curitiba.pr.gov.br/saude/BoletimEpidemiologico/boletim_2006. Acesso em: maio 2007.
8. BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia geral.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993; 568-569
9. BRASILEIRO FILHO G. **Bogliolo patologia geral.** 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 563-71;1145-46.

10. BRUCH, J.Fr; NESSMANN, C; **Development of the placenta and viral infections.** Path Biol, 1992, 40, n° 7, 679-684.

11. BULTERS, M. **HIV during pregnancy: preventing vertical HIV transmission in the year 2000: progress and prospects – a review.** Placenta, 22(SA): S5-S12, 2001.

12. CHANDWANI, D; GRECO, MA; MITTAL, K; ANTOINE, C; KRASINSKI, K; BORKOWSKI, W. **Pathology and human immunodeficiency virus expression in placentas of seropositive women.** J Infect Dis, 163 (5):1134-8. may 1991.

13. COTTER, RL; ZHENG, J; CHE, M; NIEMAN, D; LIU, Y; HE, J; THOMAS, E; GENDELMAN HE. **Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infection, beta-chemokine production, and CCR5 expression in CD40L-stimulated macrophages: immune control of viral entry.** J Virol. 75 (9): 4308-20. may 2001.

14. DERRIEN, M; FAYE, A; DOLCINI, G; CHAOUAT, G; BARRE-SINOUESSI, F; MENU E. **Impact of placental cytokine-chemokine balance on regulation of cell-cell contact-induced human immunodeficiency virus type 1 translocation across a trophoblastic barrier in vitro.** J. Virol., 79 (19): 12304-10. oct 2005.

15. EKPINI, ER; WIKTOR, SZ; SATTEN, GA; ADJORLOLO-JOHNSON, GT; SIBAILLY, TS; OU, C-Y; KARON, JM; BRATTEGAARD, K; WHITAKER, JP; GNAORE, E; DE COCK, KM; GREENBERG, AE. **Late postnatal mother-to-child transmission of HIV-1 in Abidjan, Côte d'Ivoire.** Lancet.1997; 349

16. FEAR, WR; KESSON, AM; NAIF, H; LYNCH, GW; CUNNINGHAM, AL. **Differential tropism and chemokine receptor expression of human immunodeficiency virus type 1 in neonatal monocytes, monocyte-derived macrophages, and placental macrophages.** J Virol, 72 (2): 1334-44. feb 1998.

17. GUEDES C. **Avaliação dos Recém-nascidos Expostos ao HIV atendidos entre 1999 e 2004.** Monografia de Conclusão de Residência Médica. Universidade Federal do Paraná, 2005.

18. HACKER, MA et al. **Reconstructing the AIDS epidemic among injection drug use in Brazil.** Caderno de Saúde Pública 22(4): 751-60, 2006

19. KFUTWAH, AK; MARY, JY; NICOLA, MA; BLAISE-BOISSEAU, S; BARRE-SINOUSI, F; AYOUBA, A; MENU F. **Tumor necrosis factor-alpha stimulates hiv-1 replication in single-cycle infection of human term placental villi fragments in a time, viral dose and envelope dependent manner.** Retrovirology, 23 (3): 36. jun 2006.

20. KILANI, RT; CHANG, LJ; GARCIA-LLORET, MI; HEMMINGS, D; WINKLER-LOWEN, B; GUILBERT, LJ. **Placental trophoblasts resist infection by multiple human immunodeficiency virus (HIV) type 1 variants even with cytomegalovirus coinfection but suport HIV replication after provirus transfection.** J Virol, 71 (9): 6359-72. sep 1997.

21. KOI, H; ZHANG, J; MAKRIGIANNAKIS, A; GETSIOS, S; MACCALMAN, CD; STRAUSS, JF; PARRY, S; **Syncytiotrophoblast is a barrier to maternal-fetal transmission of herpes simplex virus.** Biol reprod, 67 (5); 1572-9, Nov 2002.

22. LEE, BN; ORDONES, N; POPEK, EJ; LU, J; HELFGOTT, A; ERIKSEN N; HAMMIL, H; KOZINETZ, C; DOYLE, M; KLINE, M; LANGSTON, C; SHEARER, WT; REUBEN, JM. **Inflammatory cytokine expression is correlated with the level of human immunodeficiency virus (HIV) transcripts in HIV-infected placental trophoblastic cells.** J Virol, 71 (5): 3628-35. may 1997.

23. LINDEGREN, ML; STEINBERG, S; BYERS JR, RH. **Epidemilogy of HIV/AIDS in children.** Pediatr Clin North Am. 2000; 47(1): 1-20.

24. MATTERN, CFT; MURRAY, K; JENSEN, A; FARZADEGAN, H; PANG, J; MODLIN JF. **Localization of human immunodeficiency virus core antigen in term human placentas.** *Pediatrics*, 89 (2): 207-9. feb 1992.

25. MENU, E; MBOPI-KEOU, FX; LAGAYE, S; PISSARD, S; MAUCLÈRE, P; SCARLATTI, G; MARTIN, J; GOOSSENS, M; CHAOUAT, G; BARRÉ-SINOUSSE, F. **Selection of maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in human placenta.** *J Infect Dis*, 179 (1): 44-51. jan 1999.

26. NISHIMOTO TMI, ELUF NETO J, ROZMAN MA. **Transmissão materno-infantil do vírus da imunodeficiência humana: avaliação de medidas de controle no município de Santos.** *Rev. Assoc. Med. Brás.* 2005, 51(1).

27. NORTHFIELD, JW; HARCOURT, G; LUCAS, M; KLENERMAN, P. **Immunology of viral co-infections with HIV.** *Arch Immunol Ther Exp*, 53 (1): 3-12. jan-feb 2005.

28. ORTIGÃO, MB. **AIDS em Crianças: Considerações Sobre a Transmissão Vertical.** *Cad. Saúde Pública.* 1995; 11(1).

29. READ JS. **Mode of delivery and vertical transmission of HIV 1: a meta-analysis from fifteen prospective cohort studies.** Abstracts of the 12th World AIDS Conference; 1998 Jun 28-Jul 3; Geneva, Switzerland; 1998. p.23603.

30. SAAG MS, CRAIN MJ, DECKER WD *ET AL.* **High-level viremia in adults and children infected with human immunodeficiency virus: relation to disease stage and CD4 + lymphocyte levels.** *J Infect Dis.* 1991; 164: 72-80.

31. SCHWARTZ, DA; SUNGKARAT, S; SHAFFER, N; LAOSAKKITIBORAN, J; SUPAPOL, W; CHAROENPANICH, P; CHUANGSUWANICH, T; MASTRO, TD. **Placental abnormalities associated with human immunodeficiency virus type 1 infection and perinatal transmission in Bangkok, Thailand.** *J Infect Dis*, 182:1652-7, dec. 2000.

32. SHEIKH, AU; POLLIOTTI, BM; MILLER, RK. **Human immunodeficiency virus infection: in situ polymerase chain reaction localization in human placentas after in utero and in vitro infection.** Am J Obstet Gynecol, 182: 207-13, jan 2000.

33. SOUZA JR PRB, SZWARCOWALD CL, BARBOSA JR A, CARVALHO MF, CASTILHO EA. **Infecção pelo HIV durante a gestação: Estudo-Sentinela Parturiente, Brasil, 2002.** Rev. Saúde Pública. 2004; 38:6

34. SPERLING R, SHAPIRO D, COOMBS R, TODD J, HERMAN S, MCSHERRY G, *et al.* **Maternal viral load, ZDV treatment, and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant.** N Engl J Med. 1996; 335:1621-9.

35. STOZ, F; SCHUHMANN, R.A; SCHEBESTA, B. **The developmente of the placental villus during normal pregnancy:morphometric data base.** Arch Ginecol Obstet, 244: 23-32, 1988.

36. SUCCI R. C. M. E GRUPO DE ESTUDO BRASILEIRO DA TRANSMISSÃO MATERNO INFANTIL DO HIV. **Estudo Colaborativo Multicêntrico Brasileiro para Avaliar as Taxas de Transmissão Vertical do HIV.** 32º Congresso Brasileiro de Pediatria, 2003.

37. TEASDALE, F; **Gestacional changes in the functional structure of the human placenta in the relation to fetal growth: A morphometric study.** AM. J. Obstet.Gynecol. 137:560, 1980.

38. TOTH, FD; MOSBORG-PETERSEN, P; KISS, J; ABOAGYE-MATHIESEN, G; HAGER, H; JUHL, CB; GERGELY, L; ZDRAVKOVIC, M; ARANYOSI, J; LAMPE, L; EBBESEN, P. **Interactions between human immunodeficiency virus type 1 and human cytomegalovirus in human term syncytiotrophoblast cells coinfectd with both viruses.** J Virol, 69 (4):2223-32. abr 1995.

39. TSCHERNING-CASPER, C; PAPADOGIANNAKIS, N; ANVRET, M; STOLPE, L; LINDGREN, S; BOHLIN, AB; ALBERT, J; FENYO, EM. **The trophoblastic epithelial barrier is not infected in full-term placentae of human immunodeficiency virus-seropositive mothers undergoing antiretroviral therapy.** J Virol, 73 (11):9673-9678, nov 1999.

40. UNAIDS (2006). **Report on the global AIDS epidemic.** Geneva, UNAIDS. Disponível em:
http://data.unaids.org/pub/EpiReport/2006/2006_EpiUpdate_en.pdf. Acesso em: março 2007.

41. VIDRICAIRE, G; TARDIF, MR; TREMBLAY MJ. **The low viral production in trophoblastic cells is due to a high endocytic internalization of the human immunodeficiency virus type 1 and can be overcome by the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1.** J Biol Chem. 278 (18): 15832-41. may 2003.

42. VILLEGAS-CASTREJON, H; PAREDES-VIVAS, Y; FLORES-RIVERA, E; GORBEA-ROBLES, MC; ARREDONDO-GARCIA, JL. **Comparative study of the placenta from HIV+ mothers. Ultrastructural analysis.** Ginecol Obstet Mex, 64: 167-76, apr 1996.

43. WORLD HEALTH ORGANIZATION AND UNITED NATIONS PROGRAMME ON AIDS (1999) **HIV IN PREGNANCY: A REVIEW.** Geneva. Switzerland: WHO. Publication number WHO/CHS/RHR/99.15

9. ANEXOS

9.1 ANEXO 1 – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

ANÁLISE MORFOMÉTRICA E IMUNOHISTOQUÍMICA EM AMOSTRAS PARAFINADAS DE PLACENTA DE GESTANTES HIV SOROPOSITIVAS

Ana Paula Camargo Martins¹; Lucia Noronha²; Fernanda Leme³; Camila Deneka Arantes Souza³; Karla Abujamra³; Milton Márcio Machota³; Mônica Gabriela dos Santos⁴.

¹ Mestre em Ciências da Saúde - PUCPR

² Doutora em Patologia, Professora da Pós-Graduação - PUCPR

³ Acadêmicos de Medicina - PUCPR

⁴ Bióloga do LPE - PUCPR

Laboratório de Patologia Experimental (LPE)
Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Introdução - O exame anatomopatológico das placentas HIV soropositivas geralmente não revela alterações, porém, quando métodos mais sensíveis são aplicados, algumas alterações podem ser evidenciadas. **Objetivo** - Analisar dados morfométricos e de imunoreatividade em placentas de gestantes HIV soropositivas e compará-las com aquelas de gestantes HIV soronegativas. **Método** - Amostras de placentas sem alterações histopatológicas foram divididas em 2 grupos: HIV soronegativas (controle = C = 60) e HIV soropositivas (experimento = E = 56). A relação CD4/CD8, terapia antiretroviral, peso do bebê e taxa de transmissão vertical (TV) da população foram analisados. A imunohistoquímica para o p24 e para o herpes (Dako®) foi realizada em todos os casos e para o CMV (Zymed®) em 10 casos de cada grupo. **Resultados e Conclusões** - As vilosidades do grupo E (experimento) apresentaram área média de 3932,94µ² e perímetro de 246,15µ. Já as do C (controle) apresentaram área de 4339,93µ² e perímetro de 258,05µ, com $p < 0,05$. Sendo assim as vilosidades do grupo E são menores que o grupo C. Isto pode significar aceleração da maturação. Obtivemos um caso positivo para o p24 no grupo E e nenhum para o grupo C, 8 casos positivos para o herpes vírus no grupo E e 12 no grupo C; nenhum dos casos foi positivo para o CMV, sendo $p > 0,05$. Isto é, quando analisamos a chance de infecções congênitas tipo herpes e CMV na população E, ela é idêntica às do grupo C. Isto pode ser devido à terapia antiretroviral (47 das 56 gestantes E realizaram), relação CD4/CD8 próximas do normal (média da relação CD4/CD8 neste estudo = 0,7) e carga viral baixa (média de 4.248,83 cópias neste estudo). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos quando analisamos idade gestacional, idade materna e peso do bebê. A taxa de TV do HIV confirmado pelo exame do recém-nascido foi de 3 casos em 56 neste estudo (5,35%). (Palavras-chave: HIV, transmissão vertical, p24, placenta)

1. Introdução

No Brasil, em torno de 620.000 pessoas estão infectadas pelo HIV, compreendendo 1/3 de todas as pessoas com o vírus na América Latina²¹. Até o ano de 2004, foram notificados 114.052 casos de AIDS em mulheres entre 15 e 45 anos no país³. Como consequência disso, surge a preocupação com a transmissão vertical (TV) do HIV. Alguns estudos chegaram a estimar que 1 a 3,6% das gestantes são infectadas pelo HIV¹⁶. Se nenhum tipo de profilaxia for realizado nessas pacientes, as taxas de TV podem variar de 13% a 45%, dependendo do percentual de crianças amamentadas ao seio materno nos diferentes grupos populacionais¹¹.

A probabilidade de TV do HIV já está estabelecida, sendo evidenciado que a maioria dos casos de transmissão ocorre durante o

trabalho de parto e no parto propriamente dito (60-65%), sendo que o restante da transmissão ocorre no período intra-útero (35-40%)¹⁴.

Paralelamente, outros fatores certamente contribuem para a TV do HIV, dentre estes, a presença de co-infecções, como sífilis, toxoplasmose, hepatites B e C e infecções pelos vírus da família herpesviridae. A presença destas infecções pode ser pesquisada por testes rotineiramente realizados no pré-natal, entretanto alguns resultados podem ser comprometidos devido à desregulação imune nestas pacientes. Assim, a análise do tecido placentário das pacientes HIV positivas para a pesquisa destes agentes infecciosos pode contribuir para a detecção dos mesmos, propiciando a instituição de terapia antiretroviral mais precocemente.

A transmissão intra útero parece ser restrita a mecanismos ainda não completamente

elucidados. Alguns destes têm sido citados, como as micro-transfusões materno-fetais que podem ocorrer no início da separação da placenta durante o parto, a corioamnionite e a presença de co-infecções, como sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, vírus herpes simplex e hepatites pelos vírus B e C. Estes agentes são citados como de alta frequência neste grupo de pacientes, podendo estar envolvidos no mecanismo de quebra de barreira placentária e, consequentemente, aumentando o risco TV do HIV. Diversos estudos têm ressaltado a necessidade de pesquisas que avaliem o complexo mecanismo fisiopatológico, na placenta, que pode levar a infecção ou, mais comumente, a prevenção da infecção⁷.

A avaliação constante das taxas de TV do HIV, das características clínico-laboratoriais das mães infectadas e de seus conceitos, e a identificação dos fatores de risco que possam estar associados com a TV do HIV podem contribuir, sobremaneira, na elaboração de estratégias para conter o avanço da epidemia na população pediátrica.

Objetivo

Este estudo tem como objetivo realizar uma avaliação das taxas de transmissão vertical TV do HIV e de co-infecções nas gestantes soropositivas atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) durante o período de 2004 e 2005, através da pesquisa de HIV e de outros agentes infecciosos (CMV e Herpes Simples) em amostras parafinadas de placenta. Comparar as alterações morfológicas nas vilosidades placentárias de gestantes soropositivas com aquelas do grupo controle (gestantes soronegativas). Determinar quantas gestantes HIV soropositivas apresentam positividade imunohistoquímica em amostras parafinadas de placenta para os vírus CMV e/ou Herpes simples, comparando estes dados com aqueles do grupo controle (gestantes HIV soronegativas) e determinar a positividade imunohistoquímica para o p24 entre as gestantes HIV soropositivas.

Método

Para este trabalho, foram utilizadas as amostras de placentas entre os anos de 2004 e 2005 cujos laudos diagnósticos foram descritos como “sem alterações histopatológicas significativas”, as quais em seguida foram divididas em 2 grupos (controle e experimento) conforme os seguintes critérios de inclusão:

- placentas normais de gestantes HIV soronegativas (controle - C);
- placentas normais de gestantes HIV soropositivas (experimento - E).

Para ambos os grupos foram utilizados os seguintes critérios de exclusão: pacientes portadoras de hipertensão, diabetes, infecções, doenças prévias, AIDS e gestantes com fator Rh negativo.

A amostra total foi composta por 116 casos, sendo 56 soropositivas para HIV e 60 soronegativas. As amostras dos dois grupos foram pareadas por idade gestacional.

Dados sorológicos e terapêuticos das gestantes e seus conceitos foram pesquisados em prontuários (carga viral, níveis de CD4 e CD8, terapia antiretroviral, além do peso de bebê e estado sorológico atual do bebê – se HIV soropositivo ou HIV soronegativo) para posterior discussão com os dados morfométricos e imunohistoquímicos.

No presente trabalho foram feitos os estudos morfológicos e morfométricos, além de realização de provas imunohistoquímicas em amostras parafinadas de placentas.

Testes Morfométricos

Todos os casos do estudo foram avaliadas por microscopia óptica através de lâminas em Hematoxilina-Eosina, utilizando-se microscópio binocular marca Olympus® modelo BX50 acoplado a computador marca DELL® onde se encontra instalado o software Image Pro Plus® para realização da análise morfológica das vilosidades.

A morfometria consistiu em medidas lineares das vilosidades em desenho livre, tendo estas vilosidades, seus limites contornados, tomando-se o seu perímetro e a sua área.

Foi realizado o cálculo do erro amostral a fim de determinar o número de vilosidades a serem mensuradas, sendo que foram medidas 100 vilosidades de cada caso (n=116).

Análise Imunohistoquímica

Os mesmos casos submetidos à análise morfológica foram, em seguida, analisados pela imunohistoquímica. Este processo passou por 2 fases distintas: padronização da técnica de pesquisa de antígenos virais (CMV HSV e p24) em controles conhecidos e recomendados pela bula e prova do funcionamento da técnica padronizada nas placentas.

Para a padronização da técnica foi realizada a desparafinização com xilol quente (37°C). Utilizou-se álcool metílico e H₂O₂ para o primeiro bloqueio da peroxidase endógena e a água destilada e H₂O₂ para o segundo bloqueio. Para recuperação antigênica, utilizou-se immunoretriever com citrato marca BioSB® em

banho-maria a 99°C por 40 minutos. Procedeu-se com a incubação com anticorpo primário overnight (anti CMV na diluição de 1:10, anti p24 em 1:10 e anti HSV em 1:300) e com anticorpo secundário associado ao polímero de dextrana (EnVision®+Dual Link/Peroxidase, marca Dakocytomation®) durante 30 minutos. Para a revelação, foi adicionado complexo DAB + substrato sobre as lâminas e a contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris.

Método estatístico

Para a análise estatística foram calculados os intervalos de 95% de confiança para a média. A comparação de gestantes HIV soropositivas com gestantes HIV soronegativas em relação à área e perímetro foi feita usando-se o teste t de Student para amostras independentes, levando-se em consideração a homogeneidade das variâncias ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, quando apropriado. Esta mesma comparação em relação a variáveis nominais dicotômicas foi feita usando-se o teste exato de Fisher. Esta comparação, considerando-se conjuntamente a área e perímetro, foi feita usando-se a estatística de Rao. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

Resultados

Resultados da Morfometria

Na tabela 1 abaixo são apresentados os valores de médias e desvios padrões (dp) para área e perímetro, considerando-se os dois grupos de gestantes do estudo.

Tabela 1 – Valores de médias e dp para área e perímetro das vilosidades

Variável	Grupo	Média ± dp	Valor de p*
Área □□□	HIV + (n=54)	3932,94 ± 821,95	0,014
	HIV – (n=57)	4339,93 ± 882,63	
Perímetro □	HIV + (n=54)	246,15 ± 25,14	0,015
	HIV – (n=57)	258,05 ± 25,38	

Legendas: (*) Teste t de Student para amostras independentes; dp: desvio padrão; HIV-: gestantes soronegativas; HIV+ : gestantes soropositivas; (□) Foram retirados 5 casos (2 do grupo E e 3 do grupo C) por apresentarem resultados outliers.

Para uma nova análise estatística foram retirados 10 casos do grupo HIV soropositivo –

os 2 outliers que apresentavam artefatos de fixação e processamento e mais 8 com algumas alterações mínimas (discreto aumento de celularidade do estroma viloso) que poderiam alterar os testes morfométricos. Também foram retirados 9 casos do grupo HIV soronegativo – os 3 outliers (artefatos) e mais 6 casos com alterações mínimas.

Na tabela 2 abaixo são apresentados os novos valores de médias e desvios padrões das variáveis analisadas, considerando-se os dois grupos de gestantes do estudo.

Tabela 2 - Valores de médias e dp para área e perímetro das vilosidades

Variável	Grupo	n	Média	Desvio padrão	Valor de p*
Área □□□	HIV +	46	3916,81	797,22	0,040
	HIV-	51	4266,59	850,80	
Perímetro □	HIV +	46	245,61	24,94	0,038
	HIV-	51	256,16	24,42	

Legendas: (*) Teste t de Student para amostras independente; dp:desvio padrão; HIV - : gestantes soronegativas; HIV + : gestantes soropositivas; (□) Foram retirados 10 casos do grupo E e 9 casos do grupo C.

Existe diferença significativa entre gestantes HIV soropositivas e HIV soronegativas quanto à média da área e à média do perímetro. Nas tabelas 1 e 2 acima, observa-se que para o grupo HIV soronegativo os valores de médias de área e de perímetro são maiores do que para o grupo HIV soropositivo.

Resultados da imunohistoquímica

Na tabela 3 abaixo são apresentados os resultados imunohistoquímicos obtidos no estudo.

Tabela 3 – Resultados dos testes imunohistoquímicos anti-herpes, anti-p24 e anti-CMV nos grupos HIV soropositivo e HIV soronegativo.

HIV	Negativo	Positivo
Positivo HSV	12 20%	8 14%
Negativo HSV	48 80%	48 86%
Total	60	56
HIV	Negativo	Positivo
Positivo P24	0 0%	1 1,79%
Negativo P24	60 100%	55 98,21%
Total	60	56
HIV	Negativo	Positivo
Positivo CMV	0 0%	0 0%
Negativo CMV	10 100%	10 100%
Total	10	10

Valor de p: 1

Não foram encontradas diferenças significativas entre gestantes HIV soropositivas e gestantes HIV soronegativas em relação às variáveis imunohistoquímicas.

Variáveis Clínicas

Na tabela 4 abaixo são apresentados os valores de médias e desvios padrões (dp) das variáveis analisadas, considerando-se os dois grupos de pacientes do estudo.

Tabela 4 - Valores de médias e dp das variáveis clínicas.

Variável	Grupo	n	Média	Desvio padrão	Valor de p*
Idade da mãe	HIV +	50	26,68	6,66	0,694
	HIV-	44	26,11	7,25	
Idade gestacional	HIV +	41	36,95	3,63	0,714**
	HIV-	47	36,38	4,16	
Peso do bebê	HIV +	16	2830,63	378,60	0,166
	HIV-	33	3071,52	818,64	

Legendas: (*) Teste t de Student para amostras independentes; (**) Teste não-paramétrico de Mann-Whitney; Dp - desvio padrão; HIV -: gestantes soronegativas; HIV + : gestantes soropositivas

Não foram encontradas diferenças significativas entre gestantes HIV soropositivas e gestantes HIV soronegativas em relação às variáveis: idade da mãe, idade gestacional e peso do bebê. A idade gestacional variou entre

25 e 42 semanas e a idade da mãe entre 13 e 42 anos.

A média da relação de CD4/CD8 pouco antes do parto, neste estudo, foi de 0,7 e carga viral média foi de 4.248,83 cópias. Somente 9 gestantes, das 56 HIV soropositivas, não realizaram terapia antiretroviral. A taxa de TV do HIV confirmado pelo exame do recém-nascido foi de 3 casos em 56 neste estudo, sendo que os três bebês já foram a óbito, antes do término deste estudo (taxa de TV do HIV neste estudo = 5,35%).

Discussões e Conclusões

A TV do HIV, ou materno-infantil, é a principal via de infecção pelo HIV em crianças. No Brasil ela é responsável por mais de 80% dos casos de HIV em menores de 13 anos e pela quase totalidade dos casos diagnosticados atualmente. Até junho de 2004 foram notificados 9.162 casos de HIV por TV, representando 2,5% de todos os casos de AIDS notificados no país³.

A taxa de TV neste estudo, entre os anos de 2004 e 2005 foi de 5,35%, ficando bem abaixo dos 13%, valor mínimo estimado quando não há profilaxia antiretroviral. Porém muito acima dos valores de 1 a 2,5%, meta a ser alcançada pelo governo brasileiro com a distribuição gratuita de medicamentos antiretrovirais.

A importância do exame anatomopatológico dos anexos fetais (placenta, cordão umbilical e membranas) em mães portadoras do HIV vem sendo reconhecida por profissionais da área há vários anos. Isto por que contribui para o diagnóstico de várias doenças e também por que pode fornecer informações e dados estatísticos a serem somados aos já existentes⁵.

Em geral, mães apenas portadoras do vírus HIV possuem placenta de aspecto macroscópico e microscópico normal, como as que foram selecionadas para este estudo⁴. Porém, amostras submetidas à análise, mostram diferentes reações imunohistoquímicas quando expostas a alguns anticorpos para vírus²², como o que foi observado neste estudo. Porém, a frequência dos achados de positividade imunohistoquímica para vírus causadores de infecções intra-uterinas em placentas de gestantes HIV soropositivas não foi diferente daquela encontrada no grupo controle. Entretanto, BRUCH *et al*⁶, concluiu que o exame imunohistoquímico pôde revelar a presença de proteínas ou de alguns antígenos específicos do vírus, mesmo na ausência de lesões histológicas, assim como na ausência do vírus replicado, além disso, o estudo afirma que

o exame placentário em período perinatal em casos de infecções virais é fundamental.

O exame anatomopatológico mais detalhado pode também encontrar apenas alterações discretas em pacientes portadoras do vírus HIV, tais como o aumento da celularidade do estroma vilositário por macrófagos e linfócitos T e o espessamento da parede da membrana basal de seus vasos como foi observado em alguns casos deste estudo, os quais foram excluídos da análise morfométrica para efeitos de cálculos estatísticos. Os achados morfométricos deste estudo revelam ainda alterações do diâmetro e do perímetro de vilosidades placentárias de gestantes HIV soropositivas, sugerindo alterações de maturação, que poderiam ser causadas pela própria infecção viral e/ou até mesmo pelo uso de drogas antiretrovirais, uma vez que a grande maioria das pacientes realizou este tipo de profilaxia.

Pode-se ainda encontrar, no exame destas placentas, ocasionalmente, focos de necrose e vasculite aguda nos vilos placentários, casos estes que foram excluídos completamente do estudo. Estas alterações são mais comuns em pacientes com AIDS, que podem apresentar as mesmas alterações já citadas, porém em maior intensidade, além de corioamnionites, onfalites, decíduites e intervilosites agudas, freqüentemente relacionadas às infecções recorrentes oportunistas ou não³. Contudo, um estudo concluiu que mulheres soropositivas têm risco aumentado para lesões inflamatórias placentárias¹⁷, o que não foi confirmado neste trabalho.

BHOOPAT *et al*² afirma em seu estudo que os abortos prematuros não são um fator considerável em placentas infectadas por HIV. O estudo conclui, ainda, que há uma significativa associação entre a transmissão do HIV para o feto e os achados histológicos da corioamnionite e células necróticas.

Ao analisar placentas humanas infectadas pelo HIV intra-útero e in vitro, por meio de PCR, verificou-se que o vírus HIV-1 se distribui de maneira similar em ambos os grupos, localizando-se principalmente nos sinciotrofoblastos e nos histiócitos de Hofbauer¹⁸. Além disso, as seqüências do HIV-1 foram detectadas tanto nas vilosidades coriônicas como nas células trofoblásticas de todas as placentas analisadas neste estudo, indicando que estas seqüências estão sempre presentes em placentas de mulheres soropositivas¹³.

O anticorpo p24, através da imunohistoquímica, também mostra células com citoplasma reativo nas vilosidades de placenta de mulheres soropositivas, células estas que são

compatíveis com histiócitos de Hofbauer¹². Ao exame imunohistoquímico realizado com o anticorpo gp 41, amostras de placentas de pacientes HIV soropositivas sem qualquer tratamento apresentam-se reativas, indicando que o vírus pode estar presente em qualquer parte da vilosidade coriônica. Ao mesmo exame, em amostras de pacientes em tratamento com AZT e ddI, não ocorre a detecção do vírus²². Apesar de terem sido detectadas seqüências HIV-gag por RT-PCR em células placentárias de mulheres soropositivas¹⁰, placentas obtidas de mulheres HIV soropositivas fazendo uso de terapia antiretroviral, não apresentaram nenhuma anormalidade macroscópica ou histológica e o exame imunohistoquímico não detectou os antígenos p24 e gp120 do HIV-1. Além disso, não foram encontrados por PCR o DNA e RNA do HIV nos trofoblastos purificados. Isto pode indicar que a barreira trofoblástica nas placentas a termo pode impedir a TV do HIV²⁰. No nosso estudo apenas uma paciente apresentou positividade para o p24 em amostra parafinada de placenta, sendo que o bebê desta paciente faleceu de AIDS antes de ano de vida. Os baixos índices de detecção do p24 neste estudo podem ser devidos a presença de terapia antiretroviral em quase a totalidade das pacientes, bem como carga viral baixa e boa relação CD4/CD8.

BHOOPAT *et al*² ao comparar placentas de mulheres soropositivas sem tratamento antiretroviral com as soronegativas, obtidas com 6 a 23 semanas de gestação, por meio de imunohistoquímica e PCR, verificou que a presença de corioamnionite, decíduite e necrose de células deciduais está diretamente relacionada à transmissão do HIV para o feto. O exame imunohistoquímico realizado com o anticorpo HIV p24 em amostras de placenta de pacientes HIV soropositivas com corioamnionite revela que estas alterações podem ser relacionadas à presença do vírus⁸.

Foi constatado que as interações entre as células sinciotrofoblásticas e os macrófagos placentários com HIV latente interrompem o período de latência do HIV e induzem à sua replicação nas células sinciotrofoblásticas, sugerindo que esta interação tem papel na disseminação do HIV-1 na placenta¹.

Ao buscar evidências de que a co-infecção viral persistente atua como importante fator para a progressão da imunodeficiência humana pelo HIV-1, observou-se que a hepatite C e a citomegalovirose possuem um efeito deletério na progressão do HIV¹⁵. Ao analisar as interações entre o HIV-1 e o CMV em células sinciotrofoblásticas a termo cultivadas in vitro, demonstrou-se que a replicação do HIV-1

foi potencializada pelo CMV quando ambos os vírus foram adicionados simultaneamente. As células já infectadas pelo CMV que foram superinfectadas pelo HIV-1 demonstraram o efeito estimulador do CMV sobre a replicação do HIV-1 (devido à produção de IL-6 induzida pelo CMV). Além disso, a infecção prévia das células sinciciotrofoblásticas com HIV-1 converteu a infecção pelo CMV para uma infecção ativa (induzida pelo produto do gene tat do HIV-1), sendo, contudo, este fenômeno tempo-dependente: o CMV provocou efeitos citopáticos nos primeiros 11 dias após a infecção pelo HIV-1¹⁹. Contudo, utilizando trofoblastos purificados, demonstrou-se que a co-infecção pelo CMV não resulta em infecção dos trofoblastos pelo HIV-1. Porém, ao se injetar plasmídios contidos em célula T clonada e em provirus macrofagotrópicos, foi desencadeada infecção ativa, comprovando que as células trofoblásticas não têm a capacidade de suprimir a infecção viral em estágios mais avançados⁹.

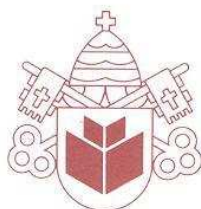
Como as afecções em imunocomprometidos se manifestam por meio de quadros clínicos e respostas imunitárias atípicas, tornam-se necessários exames complementares utilizando-se métodos diagnósticos mais precisos. As técnicas de imunohistoquímica, por exemplo, têm importante papel no diagnóstico de agentes infecciosos ou de seus produtos antigênicos, sendo também essenciais para a caracterização fenotípica das células envolvidas na resposta tecidual e das citocinas produzidas localmente.

2. REFERÊNCIAS

1. BACSI, A; CSOMA, E; BECK, Z; ANDIRKO, I; KONYA, J; GERGELY, L; TOTH, FD. **Induction of HIV-1 replication in latently infected syncytiotrophoblast cells by contact with placental macrophages: role of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha.** J Interferon Cytokine Res, 21: 1079-88. dec 2001.
2. BHOOPAT L; KHUNAMORN PONG S; SIRIVATANAPA P; RITHAPORN T; LERDSRIMONGKOL P; THORNER PS; BHOOPAT T. **Corioamnionitis is associated with placental transmission of human immunodeficiency virus-1 subtype E in the early gestational period.** Mod Pathol, 18 (10): 1357-64. oct 2005.
3. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE AIDS 2004. **Ministério da Saúde.** Ano XVII, 25 a 52 Semanas Epidemiológicas, julho-dezembro, 2004.
4. BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia geral.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993; 568-569.
5. BRASILEIRO FILHO G. **Bogliolo patologia geral.** 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 563-71;1145-46.
6. BRUCH, J.Fr; NESSMANN, C; **Development of the placenta and viral infections.** Path Biol, 1992, 40, nº 7, 679-684.
7. BULTERS, M. **HIV during pregnancy: preventing vertical HIV transmission in the year 2000: progress and prospects – a review.** Placenta, 22(SA): S5-S12, 2001.
8. CHANDWANI, D; GRECO, MA; MITTAL, K; ANTOINE, C; KRASINSKI, K; BORKOWSKI, W. **Pathology and human immunodeficiency virus expression in placentas of seropositive women.** J Infect Dis, 163 (5):1134-8. may 1991.
9. KILANI, RT; CHANG, LJ; GARCIA-LLORET, MI; HEMMINGS, D; WINKLER-LOWEN, B; GUILBERT, LJ. **Placental trophoblasts resist infection by multiple human immunodeficiency virus (HIV) type 1 variants even with cytomegalovirus coinfection but support HIV replication after provirus transfection.** J Virol, 71 (9): 6359-72. sep 1997.
10. LEE, BN; ORDONES, N; POPEK, EJ; LU, J; HELFGOTT, A; ERIKSEN N; HAMMIL, H; KOZINETZ, C; DOYLE, M; KLINE, M; LANGSTON, C; SHEARER, WT; REUBEN, JM. **Inflammatory cytokine expression is correlated with the level of human immunodeficiency virus (HIV) transcripts in HIV-infected placental trophoblastic cells.** J Virol, 71 (5): 3628-35. may 1997.

11. LINDEGREN, ML; STEINBERG, S; BYERS JR, RH. **Epidemiology of HIV/AIDS in children.** *Pediatr Clin North Am.* 2000; 47(1): 1-20.
12. MATTERN, CFT; MURRAY, K; JENSEN, A; FARZADEGAN, H; PANG, J; MODLIN JF. **Localization of human immunodeficiency virus core antigen in term human placentas.** *Pediatrics,* 89 (2): 207-9. feb 1992.
13. MENU, E; MBOPI-KEOU, FX; LAGAYE, S; PISSARD, S; MAUCLÈRE, P; SCARLATTI, G; MARTIN, J; GOOSSENS, M; CHAOUAT, G; BARRÉ-SINOUSI, F. **Selection of maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in human placenta.** *J Infect Dis,* 179 (1): 44-51. jan 1999.
14. NISHIMOTO TMI, ELUF NETO J, ROZMAN MA. **Transmissão materno-infantil do vírus da imunodeficiência humana: avaliação de medidas de controle no município de Santos.** *Rev. Assoc. Med. Brás.* 2005, 51(1).
15. NORTHFIELD, JW; HARCOURT, G; LUCAS, M; KLENERMAN, P. **Immunology of viral co-infections with HIV.** *Arch Immunol Ther Exp,* 53 (1): 3-12. jan-feb 2005.
16. ORTIGÃO, MB. **AIDS em Crianças: Considerações Sobre a Transmissão Vertical.** *Cad. Saúde Pública.* 1995; 11(1).
17. SCHWARTZ, DA; SUNGKARAT, S; SHAFFER, N; LAOSAKKITIBORAN, J; SUPAPOL, W; CHAROENPANICH, P; CHUANGSUWANICH, T; MASTRO, TD. **Placental abnormalities associated with human immunodeficiency virus type 1 infection and perinatal transmission in Bangkok, Thailand.** *J Infect Dis,* 182:1652-7, dec. 2000.
18. SHEIKH, AU; POLLIOTTI, BM; MILLER, RK. **Human immunodeficiency virus infection: in situ polymerase chain reaction localization in human placentas after in utero and in vitro infection.** *Am J Obstet Gynecol,* 182: 207-13, jan 2000.
19. TOTH, FD; MOSBORG-PETERSEN, P; KISS, J; ABOAGYE-MATHIESEN, G; HAGER, H; JUHL, CB; GERGELY, L; ZDRAVKOVIC, M; ARANYOSI, J; LAMPE, L; EBBESEN, P. **Interactions between human immunodeficiency virus type 1 and human cytomegalovirus in human term syncytiotrophoblast cells coinfecting with both viruses.** *J Virol,* 69 (4):2223-32. abr 1995.
20. TSCHERNING-CASPER, C; PAPADOGIANNAKIS, N; ANVRET, M; STOLPE, L; LINDGREN, S; BOHLIN, AB; ALBERT, J; FENYO, EM. **The trophoblastic epithelial barrier is not infected in full-term placentae of human immunodeficiency virus-seropositive mothers undergoing antiretroviral therapy.** *J Virol,* 73 (11):9673-9678, nov 1999.
21. UNAIDS (2006). Report on the global AIDS epidemic. Geneva, UNAIDS. http://data.unaids.org/pub/EpiReport/2006/2006_EpiUpdate_en.pdf
22. VILLEGAS-CASTREJON, H; PAREDES-VIVAS, Y; FLORES-RIVERA, E; GORBEA-ROBLES, MC; ARREDONDO-GARCIA, JL. **Comparative study of the placenta from HIV+ mothers. Ultrastructural analysis.** *Ginecol Obstet Mex,* 64: 167-76, apr 1996.

9.2 ANEXO 2 – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Curitiba, 08 de agosto de 2005

Of. 310/05/CEP-PUCPR

Ref. "Análise morfométrica e imunohistoquímica em amostras de pacientes HIV positivas".

Prezado (a) Pesquisador (es),

Venho por meio deste informar a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, no dia 03 de agosto do corrente ano aprovou o Projeto Intitulado "Análise morfométrica e imunohistoquímica em amostras de pacientes HIV positivas", pertencente ao Grupo III, sob o registro no CEP n° 601, e será encaminhado a CONEP para o devido cadastro. Lembro ao senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final a este CEP.

Atenciosamente,


Profª M. Sc Ana Cristina Miguez Ribeiro

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - PUCPR

Ilma Srª.

Ana Paula Camargo