

## PERFIL DA EXPRESSÃO DE CD68 EM VILOSITES DE ETIOLOGIA DESCONHECIDA DE PLACENTAS HUMANAS

**Palavras-chave:** Placenta; Macrófagos placentários; Vilosite de etiologia desconhecida;

**Wellington Lima Sabino**, João Figueira Scarini, Reydson Alcides de Lima Souza, Albina Altemani, Erika Said Abu Egal e Fernanda Viviane Mariano

**Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas**

## INTRODUÇÃO

A vilosite de etiologia desconhecida (VED) é uma lesão placentária inflamatória relativamente comum, caracterizada pela infiltração de linfócitos T maternos nas vilosidades coriônicas (KIM et al., 2015; REDLINE, 2007). Histologicamente, as vilosidades acometidas por VED possuem infiltrado inflamatório misto composto de além linfócitos, macrófagos de origem fetal e materna. Muitos estudos consideram as causas da VED incertas, propondo a reação imune materna aos tecidos fetais e a infecção não diagnosticada com prováveis fatores causais (ALTEMANI; GONZATTI, 2003; REDLINE, 2007). Dessa maneira, tais descobertas apontam que distúrbios do sistema imune materno são fatores mais prováveis para o desenvolvimento da VED, sendo necessário um melhor entendimento da dinâmica imunológica dessa patologia.

## OBJETIVOS DA PESQUISA

### Objetivos Gerais

Avaliar a expressão de CD68 na Vilosite de Etiologia Desconhecida da placenta.

### Objetivos Específicos

Analisar a expressão de CD68 na população de macrófagos na Vilosite de Etiologia Desconhecida da placenta;

Comparar a expressão de CD68 no compartimento intra e extra-viloso;

Comparar a expressão de CD68 em vilosites leves, moderadas e intensas.

## METODOLOGIA E RESULTADOS

### Normas éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (Número do parecer: 169.409).

### Amostras

Para o estudo, foram utilizadas lâminas e blocos de parafina que foram arquivados no Hospital da Universidade Estadual de Campina (UNICAMP), os blocos foram preparados a partir de placenta a termo (ou próximas do termo) e corados com hematoxilina e eosina (HE) oriundos de 16 pacientes diagnosticadas com vilosite crônica, sem etiologia identificada. Três placentas saudáveis foram incluídas como controle para o estudo.

### Reação imunoistoquímica

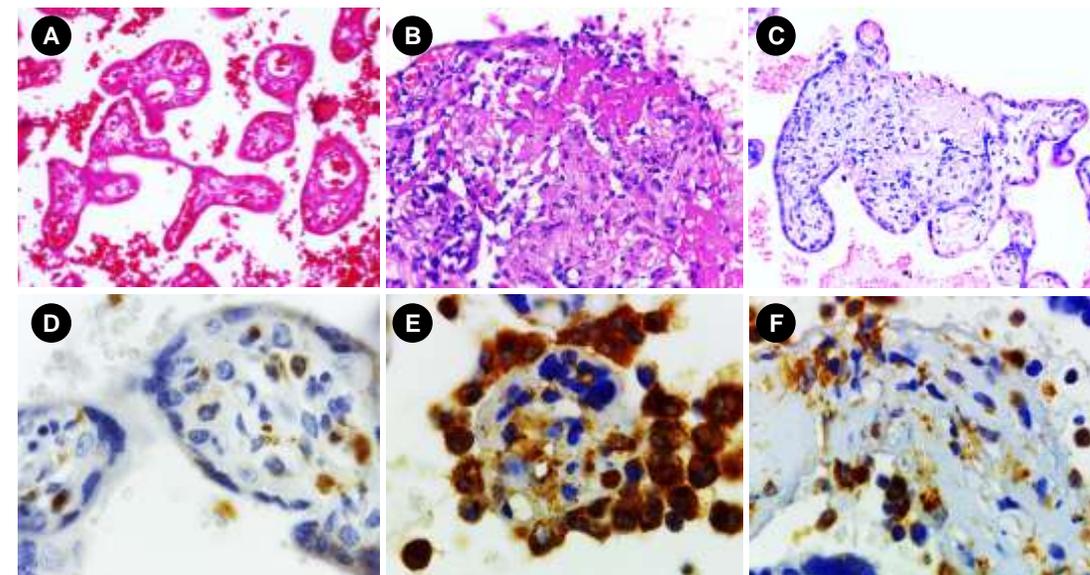
Foram selecionados blocos/lâminas de parafina (um de cada caso) e cortes seriados foram realizados para a avaliação por imunohistoquímica, os quais foram submetidos à desparafinação, à hidratação e à imersão em peróxido de hidrogênio 10%, visando a inativação da enzima peroxidase. Em seguida, para a recuperação antigênica, os preparados foram submetidos a temperatura de 95°C em citrato, então, resfriados e incubados a 4°C com o anticorpos primário anti-CD68 durante uma noite (overnight). Posteriormente, as lâminas foram incubadas por 1h a 37°C com o polímero EnVision® e coradas com 3,3'- diaminobenzidina e contra coradas por hematoxilina.

### Análise de células positivas

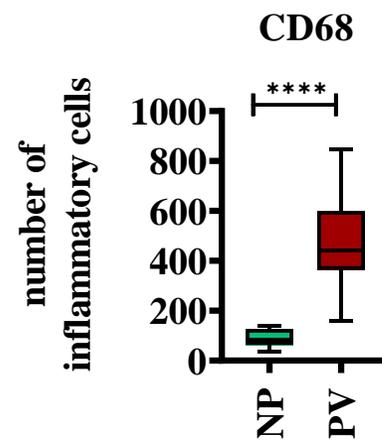
Para a avaliação quantitativa, 10 áreas com vilosite e 10 áreas normais de cada lâmina foram selecionadas e fotografadas usando a câmera AxioCam MRc (Zeiss, Alemanha), em aumento de 40×. Em seguida, as células positivas para CD68 nas vilosites e áreas normais foram quantificadas especificamente de acordo com sua localização: dentro e fora das vilosidades. Finalmente, a quantificação celular foi realizada com o uso do software ImageJ (NIH).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os casos de VED envolveram vilosidades terminais e tronco. Um número variável de vilosidades apresentou áreas de necrose trofoblástica. O infiltrado inflamatório apresentado nas vilosidades era composto por células mononucleares (**Figura 1A, B e C**). As células CD68 positivas eram as células mais abundantes nas vilosidades e estavam principalmente presentes no espaço intraviloso ( $p < 0.0001$ ) (**Figura 1D, E e F; Figura 2**). Quando comparamos diferentes intensidades de vilosidade, os macrófagos eram mais abundantes na vilosite intensa (**Figura 3**). Além disso, uma grande quantidade destas células foi observada em redor das áreas onde a ruptura trofoblástica estava presente.

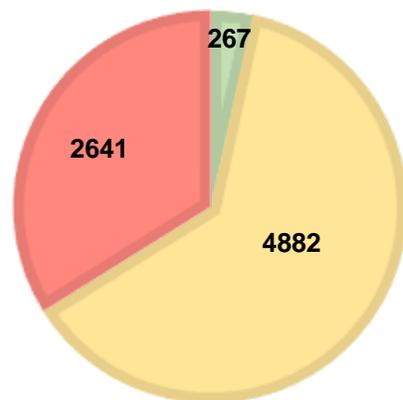


**Figure 1** – A, Placenta normal (20X). B e C, Vilosite. Presença de células inflamatórias fora (40X) e dentro (20X) da vilosidade. D, Placenta Normal: Expressão imunohistoquímica de CD68 (100x). E e F, Vilosite: Presença de CD68+ no interior das vilosidades e formação de agregados no espaço intervilloso (100X).



**Figure 2** – Diferença significativa entre a expressão imunohistoquímica de CD68 na vilosidade normal e na vilosite. Mann Whitney Test, \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

■ Leve ■ Moderado ■ Intenso



**Figure 3** – Contagem de macrófagos CD68 + encontrados em 16 casos com vilosites – 1 caso com vilosite leve (verde), 10 casos com vilosite moderada (amarelo) e 5 casos com vilosites intensa (vermelho).

O microambiente placentário comporta-se de maneira dinâmica e transcende a complexidade imunológica de co-existir células imunológicas de duas origens diferentes (fetais e maternas). Desse modo, ambos os tipos de células devem trabalhar em uma sintonia a tolerar os antígenos paternos e a mediar respostas adequadas nos processos infecciosos ao longo da gestação (ZHANG et al., 2020). O sucesso no crescimento e no desenvolvimento fetal estão atrelados a esse equilíbrio imunológico, assim, cascatas de mediadores químicos emitidos pela mãe e pelo feto promovem a modularidade dessas células de defesas. O mecanismo PD-1 e seu ligante PD-L1 são descritos com um importante papel nessa função indutora, em específico os macrófagos (CD68) (MA et al., 2011).

Nos processos inflamatórios agudos e crônicos os macrófagos são descritos como as primeiras células de defesa a atuarem em diversos tecidos humanos (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018). Sua capacidade plástica fenotípica confere a capacidade de se delinear a partir de diferentes estímulos, assim, podendo desenvolver a dualidade de favorecer aos processos inflamatórios (pró-inflamatórios – M1) ou desfavorecer (anti-inflamatório – M2) (SCARINI et al., 2021).

Vale ressaltar que no estado fisiológico de manutenção da gravidez é esperado uma taxa aproximada de 30% de macrófagos de todas células leucocitárias na decídua (LIU et al., 2018). Todavia, o processo de patogênese é desencadeado com a superexpressão e liberação da cascata de quimiocinas (CXCL9, CXCL10 e CXCL11) através dos macrófagos. Essa condição estimula as células T maternas a infiltrar os espaço intervilloso (KIM et al., 2015). Desse modo, a polarização dos macrófagos nessas regiões implica de maneira favorável o processo inflamatório em um grau mais avançado, chegando a própria destruição da vilosidade (KIM et al., 2015) e prejudicando a troca materno-fetal. Essa condição extrema pode acarretar desordens no crescimento e desenvolvimento ou mesmo morte fetal.

## CONCLUSÕES

Nosso estudo está em concordância com a literatura. Foi encontrado um aumento significativo de macrófagos (CD68) nas vilosites de etiologia desconhecida quando comparadas com a população de macrófagos de placentas controle. Esse aumento foi maior dentro da vilosidade placentária e o maior número dessas células correlacionou-se com a ruptura do sinciotrofoblasto.

## BIBLIOGRAFIA

- ALTEMANI, A. M.; GONZATTI, A. R. Villitis of unknown etiology in placentas of pregnancies with hypertensive disorders and of small-for-gestational-age infants. *Revista da Associação Médica Brasileira* (1992), v. 49, n. 1, p. 67–71, 2003.
- ATRI, C.; GUERFALI, F. Z.; LAOUINI, D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 6, 2018.
- EGAL, E. S. A. et al. ICAM-1 expression on immune cells in chronic villitis. *Placenta*, v. 35, n. 12, p. 1021–1026, 2014.
- KIM, C. J. et al. classification, pathogenesis, and clinical significance. *The American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v. 213, n. 4, p. S53–S69, 2015.
- LIU, X. et al. Decidual macrophage M1 polarization contributes to adverse pregnancy induced by *Toxoplasma gondii* PRU strain infection. *Microbial Pathogenesis*, v. 124, p. 183–190, 2018.
- MA, C. J. et al. PD-1 negatively regulates interleukin-12 expression by limiting STAT-1 phosphorylation in monocytes/macrophages during chronic hepatitis C virus infection. *Immunology*, v. 132, n. 3, p. 421–431, 2011.
- REDLINE, R. W. Villitis of unknown etiology: noninfectious chronic villitis in the placenta. *Human Pathology*, v. 38, n. 10, p. 1439–1446, 2007.
- SCARINI, J. F. et al. M1 macrophages involved in the pathogenesis of placental chronic villitis of unknown etiology unknown etiology. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, v. 0, n. 0, p. 1–6, 2021.
- ZHANG, Y. H. et al. Trophoblast-secreted soluble-PD-L1 modulates macrophage polarization and function. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 108, n. 3, p. 983–998, 2020.