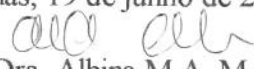


PRISCILA BIANCHI JULIANO

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas da aluna Priscila Bianchi Juliano.

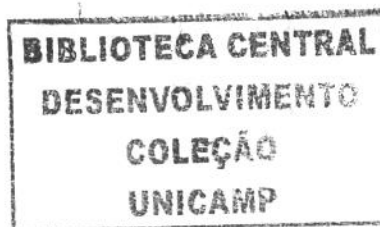
Campinas, 19 de junho de 2006.


Prof. Dra. Albina M.A. M. Altemani
Orientadora

**O PAPEL DE ICAM-1 NA BARREIRA TROFOBLÁSTICA
E NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
EM PLACENTITES**

CAMPINAS

2006



PRISCILA BIANCHI JULIANO

**O PAPEL DE ICAM-1 NA BARREIRA TROFOBLÁSTICA
E NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
EM PLACENTITES**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ALBINA M. A. MILANI ALTEMANI

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	J942p
V	EX
TOMBO	BC/ 69831
PROC.	6.123-06
C	☐
D	☒
PREÇO	41,00
DATA	30-8-06

J942p

Juliano, Priscila Bianchi

O papel de ICAM-1 na barreira trofoblástica e na modulação da resposta inflamatória em placentites / Priscila Bianchi Juliano. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Albina Messias de Almeida Milani Altemani
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Placenta. 2. Vilosidades coriônicas. I. Altemani, Albina Messias de Almeida Milani. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Slp/fcm

Título em ingles : The role of ICAM-1 in trophoblastic barrier and in modulation of inflammatory response in placentitis

Keywords: • Placenta
• Chorionic Villi

Área de concentração : Ciências Biomédicas

Titulação: Mestrado em Ciências Médicas

**Banca examinadora: Profa. Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani
Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos
Profa. Dra. Francys Reis da Silva Patrício**

Data da defesa: 19-06-2006

BIB ID: 385785

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa.Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani

MEMBROS:

1. Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

2. Profa. Dra. Francly Reis da Silva Patrício

3. Profa. Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani

200619727

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data:

19/06/2006

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, os maiores mestres da minha vida;

Ao Alexandre Wolf Jannini, meu grande companheiro;

À Dra. Albina Altemani, amiga e profissional competente;

Dedico este trabalho.

À Profa. Dra. Albina Altemani, pela confiança depositada em mim, pela oportunidade de trabalho, pela amizade, compreensão e, pelo despertar do meu interesse em patologia;

Aos meus familiares, em especial aos meus pais, Natal Antônio Bianchi Juliano e Ana Maria Bevilacqua Juliano, pelo apoio e carinho;

Ao meu namorado, Alexandre Wolf Jannini, pelo incentivo e compreensão;

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Patologia Experimental -LAPE/ UNICAMP- pelas valiosas discussões e auxílios na técnica de imunoistoquímica;

À Profa. Dra. Maria Heloísa Blotta, pelo auxílio neste trabalho e pelos ensinamentos em imunologia e, seus alunos Ronei Mamoni, Rômulo Dias Tadeu e Cláudia Tres Corvino pelo apreço e amizade;

À Erika P. M. Neworal e Ainah Corrêa por me apresentarem a técnica de imunoistoquímica;

Ao Prof. Dr. Luciano de Souza Queiroz, sempre prestativo, pelo auxílio na composição do artigo resultante desta dissertação de mestrado;

Aos professores, funcionários, residentes e pós-graduandos do Departamento de Anatomia Patológica FCM/ UNICAMP, pela amizade, apoio, paciência e dedicação.

*" Nem mesmo toda a ciência do homem
lhe bastaria para conhecer a extensão de
sua ignorância"*

LEONI KASEFF

	PÁG.
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1- INTRODUÇÃO.....	14
1.1- O vilo placentário.....	15
1.2- Aspectos gerais das vilosites.....	15
1.2.1- Prevalência.....	16
1.2.2- Aspectos clínicos da vilosite.....	17
1.2.3- Aspectos microscópicos da vilosite.....	17
1.2.4- Caracterização do infiltrado inflamatório.....	19
1.3- Infecção placentária por <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.....	20
1.4- Mecanismos de transmigração celular e o papel de ICAM-1.....	20
1.5- A barreira trofoblástica e o papel de ICAM-1.....	23
2- OBJETIVOS.....	25
3- ARTIGO.....	27
4- DISCUSSÃO.....	50
5- CONCLUSÃO.....	57
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

VED	Vilosite de etiologia desconhecida
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>P. brasiliensis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
CD	Conjunto de diferenciação
ICAM-1	Molécula 1 de adesão intercelular
VUE	Villitis of unknown etiology
IgM	Imunoglobulina M
CMV	Citomegalovírus
Células NK	Células natural killer
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
LFA-1	Antígeno linfocitário função-associado 1
TNFα	Fator de necrose tumoral alpha
IL-1	Interleucina 1
IFNγ	Interferon gamma
HLA	Antígeno leucocitário humano

	<i>PÁG.</i>
Figura 1 Transmigração leucocitária em vênula pós-capilar em um sítio inflamado.....	22
Figura 2 Expressão de ICAM-1 na vilosite.....	55
Figura 3 Expressão de ICAM-1 na intervilosite.....	56

RESUMO

A participação da barreira trofoblástica na patogênese da vilosite placentária tem sido abordada somente em raros estudos realizados em cultura de tecidos, os quais demonstram que a expressão de ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) por células do trofoblasto viloso poderia permitir o influxo de células maternas para dentro da vilosidade. Para investigar a expressão de ICAM-1 pelo trofoblasto viloso, sua relação com ruptura da barreira trofoblástica e influxo de células imunes para dentro da vilosidade, foram analisadas 18 placentas com placentites (5 causada por *T. gondii*, 3 por *T. cruzi*, 2 por *P. brasiliensis* e 8 de etiologia desconhecida – VED) e 8 sem inflamação. Todas foram analisadas através da técnica de imunoistoquímica, em secções de parafina, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD45RO, anti-CD20, MAC 387, HAM 56, anti-CD15, anti-hNK e anti-ICAM-1. Nas vilosites, o infiltrado intraviloso era composto principalmente por macrófagos HAM 56+ e linfócitos T UCHL-1+, enquanto que no espaço interviloso as células eram predominantemente monócitos MAC 387+. Na intervilosite por *P. brasiliensis*, não havia célula inflamatória dentro da vilosidade, enquanto que o infiltrado do espaço interviloso era composto principalmente por monócitos MAC 387+ e neutrófilos CD15+. Todos os casos com placentite, exceto um, mostraram aumento da expressão de ICAM-1 nas vilosidades inflamadas, a qual estava localizada, quase que exclusivamente, próxima às áreas de ruptura trofoblástica. Nestas, foram observados leucócitos aderidos, apenas nos casos com vilosite. Quando a reação inflamatória ocorria somente no espaço interviloso (infecção por *P. brasiliensis*) apesar da ruptura trofoblástica e aumento da expressão de ICAM-1, não se observou influxo de leucócitos em direção ao estroma viloso. Nenhuma das placentas sem inflamação mostrou expressão de ICAM-1. Concluindo, o aumento da expressão de ICAM-1 pelo trofoblasto viloso ocorre durante placentites com acúmulo de leucócitos tanto no estroma viloso como no espaço interviloso e, provavelmente, desempenha um importante papel na ruptura da barreira trofoblástica. O influxo de células imunes para o vilo placentário, aparentemente, é mediado por ICAM-1, mas a localização do antígeno no interior da vilosidade é certamente um fator crucial para que isso ocorra.

ABSTRACT

Although an in vitro study has hypothesized that expression of ICAM-1 by villous trophoblasts could be important for the influx of maternal immune cells in villitis, it remains to be shown whether the same phenomenon occurs in human villitis. To investigate the expression of ICAM-1 by villous trophoblasts, its relationship with rupture of the trophoblastic barrier and influx of immune cells into the villi, we analyzed 18 paraffin-embedded placentas with placentitis (5 by *T. gondii*, 3 by *T. cruzi*, 2 by *P. brasiliensis* and 8 of unknown aetiology - VUE) and 8 control placentas by immunohistochemistry using the monoclonal antibodies anti-CD45RO, anti-CD20, MAC 387, HAM 56, anti-CD15, anti-HNK and anti-ICAM-1. In all villitis cases, the inflammatory infiltrate within the villous stroma was composed mainly of HAM 56+ macrophages and UCHL-1 T lymphocytes, but in the intervillous space, the cells were mainly MAC 387+ monocytes. Otherwise, intervillitis caused by *P. brasiliensis* showed mainly MAC 387+ monocytes, CD15+ granulocytes and none inflammatory cell within the villi. All cases but one of placentitis showed trophoblast overexpression of ICAM-1 in the inflamed villi, located almost exclusively next to the areas of trophoblastic rupture. The villitis cases (caused by *T. cruzi*, *T. gondii* and VUE) presented leukocyte adherence in the areas of trophoblastic rupture. When the inflammatory reaction was situated in the intervillous space (placentitis by *P. brasiliensis*), in spite of the trophoblastic rupture and ICAM-1 overexpression there was no leukocyte influx into villi. None of the control placentas showed ICAM-1 expression. We concluded that overexpression of ICAM-1 by villous trophoblasts occurs during placentitis characterized by accumulation of leukocytes in the villous or intervillous space and probably plays an important role in the rupture of the trophoblastic barrier. The influx of immune cells into the villi appears to be mediated by ICAM-1 but the location of the antigen within villous stroma is certainly a crucial factor for its occurrence.

1- INTRODUÇÃO

1.1- A vilosidade placentária

A placenta é formada por vilosidades que partem da placa coriônica e são conhecidas por vilosidades primárias. Estas se dividem em vilosidades secundárias, terciárias e terminais, formando a árvore vilosa (Fox, 1997). Cada vilosidade é basicamente formada pelo trofoblasto viloso - sincício e citotrofoblasto-, membrana basal, estroma viloso e vasos fetais (Fox, 1997).

1.2- Aspectos gerais das vilosites

A presença de infiltrado inflamatório no estroma da vilosidade placentária é conhecida como vilosite e é classificada quanto à etiologia em conhecida e desconhecida (Fox, 1997).

A vilosite de etiologia conhecida representa uma pequena proporção dos casos e é caracterizada por infecção hematogênica causada por vírus, bactérias, parasitas, protozoários e fungos (Gersell e Kraus, 2000; Fox, 1997; Russell, 1995; Bernirschke e Kaufmann, 1985; Altshuler e Russell, 1975).

Na maioria dos casos, a vilosite é idiopática (vilosite de etiologia desconhecida – VED), pois não são evidenciados microorganismos na placenta e não há sintomas ou sinais de infecção materna (Gersell e Kraus, 2000; Russell, 1995; Bernirschke e Kaufmann, 1985; Knox e Fox, 1984; Altshuler e Russell, 1975).

As principais hipóteses propostas para explicar a VED são: **a)** infecciosa, na qual o agente não é detectado por métodos diagnósticos usuais (Fox, 1997) e **b)** agressão imunológica materna contra os tecidos placentários (Labarrere et al., 1990; Labarrere et al., 1986; Labarrere, et al., 1982). Aqueles que defendem a primeira hipótese argumentam que o aspecto morfológico de certas vilosites virais assemelha-se ao observado na VED (Altshuler, 1973). Além disso, argumentam também que a VED poderia ser a consequência de uma infecção endometrial pois, se verifica muitas vezes, a associação com vilosite basal e decíduite (Bernirschke et al., 1999; Bernirschke e Kaufman, 1995; Russell,

1980; Altshuler e Russell, 1975). Por outro lado, a hipótese da origem imunológica da VED tem sido reforçada pela ausência de níveis elevados de IgM fetal neste tipo de vilosite (Altemani et al., 1989; Mortimer et al., 1985) e pela participação de células imunes maternas no infiltrado inflamatório intraviloso da VED (Labarrere e Faulk, 1995; Redline e Patterson, 1993).

1.2.1- Prevalência

A vilosite, independente da etiologia, pode ser encontrada em 6-68% das placentas dependendo da população, quantidade de material submetido ao exame histológico e critérios utilizados para o diagnóstico de vilosite (Becroft et al., 2005; Altemani et al., 2003; Labarrere et al., 1982; Russell, 1980; Altshuler e Russell, 1975). Segundo Altemani et al. (2003), a análise de seis blocos de parafina por placenta resulta em uma probabilidade de 85% para detectar 95% de todos os casos de vilosite. A adoção deste procedimento poderia diminuir a discrepância na prevalência desta lesão, permitindo compará-la em diferentes áreas geográficas.

No Brasil, a frequência de vilosite de etiologia desconhecida varia de 18,9 a 41,8% das placentas analisadas (Altemani et al., 2003; Altemani et al., 1989, Altemani et al., 1982).

Dentre as vilosites de etiologia conhecida, as que são causadas por *T. gondii* e *T. cruzi* são de importância epidemiológica no Brasil (Bittencourt, 1995).

As vilosites causadas por *Toxoplasma gondii* correspondem a 3% das placentas examinadas, ou seja, 12,5% dos casos de vilosites na região de Campinas, São Paulo (Altemani et al., 1982).

Por outro lado, atualmente sabe-se que, no Brasil, a vilosite causada por *T. cruzi* ocorre entre 0,75% - 2,7% das placentas analisadas conforme a região estudada (Bitterncourt et al., 1992; Altemani et al., 1982).

1.2.2- Aspectos clínicos da vilosite

Clinicamente, as vilosites de etiologia conhecida podem estar associadas a aborto, natimorto, baixo peso ao nascimento, prematuridade e infecções sistêmicas no recém nascido, com conseqüências graves, tais como, distúrbios neurológicos, cegueira, surdez, malformações congênitas (Brecroft et al., 2005; Redline e O'Riordan, 2000; Redline e Patterson, 1993; Altemani et al., 1989; Redline e Abramowsky, 1985; Altemani et al., 1982; Russell, 1979).

Dependendo da etiologia, pode haver correlação direta entre a intensidade da vilosite e a gravidade do quadro clínico. Isto ocorre, por exemplo, na infecção por *T. cruzi* onde, natimortos estão relacionados com uma vilosite difusa e intensa, com freqüente necrose do trofoblasto, numerosos parasitas e reação granulomatosa intervillosa. Por outro lado, nativos apresentam uma vilosite focal, com escassos parasitas e necrose do trofoblasto rara ou ausente (Altemani et al., 2000).

Entretanto, em outras vilosites de causa infecciosa, a intensidade do comprometimento fetal parece estar mais relacionada ao efeito direto da infecção no feto ou na mãe, do que com a intensidade da lesão placentária (Fox, 1997).

Na VED, a alteração neonatal mais freqüente é o baixo peso do recém-nascido, seguido por aborto recorrente (Russell, 1995; Redline e Abramowsky, 1985; Russel, 1980). Diferentemente da vilosite de etiologia conhecida, ainda se questiona se há relação entre a intensidade de VED com os sintomas clínicos fetais (Brecroft et al., 2005; Russel, 1980).

1.2.3- Aspectos microscópicos da vilosite

Na maioria dos casos a vilosite é um processo focal e o infiltrado inflamatório não é característico, constituído predominantemente por linfócitos e histiócitos (Brito et al., 2005; Altemani, 1992).

Apesar do padrão não característico das vilosites, algumas particularidades podem ser observadas relacionadas com certos agentes etiológicos, como é o caso das vilosites por *Citomegalovirus* (CMV) onde se observam inclusões virais características, das vilosites por bactérias piogênicas ou *Listeria monocytogenes* que apresentam um infiltrado purulento e, das vilosites por sífilis com maior proporção de plasmócitos (Fox, 1997). Além disso, os infiltrados predominantemente histiocíticos podem caracterizar o tipo granulomatoso como ocorre algumas vezes, na vilosite por *T. cruzi* e *T. gondii* (Brito et al., 2005; Yavuz et al., 2005)

A vilosite pode ser subdividida de acordo com a natureza deste infiltrado (aguda ou crônica), a distribuição das lesões (focal, difusa, basal) e o grau de acometimento (leve, moderado, intenso) (Gersell e Kraus, 2000; Russell, 1995).

A classificação de vilosite proposta por Altshuler & Russel (1975), está fundamentada na evolução da vilosite desde um estágio inicial inflamatório até um estágio final fibrótico. e pode ser classificada em:

- **Vilosite proliferativa:** presença de infiltrado inflamatório crônico no estroma viloso, sem necrose concomitante;
- **Vilosite necrosante:** infiltrado inflamatório acompanhado de necrose vilosa;
- **Vilosite reparativa:** presença de tecido de granulação e fibrose;
- **Fibrose estromal:** as vilosidades são fibróticas, com pouca ou nenhuma evidência de processo inflamatório ativo.

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

Nas vilosites de etiologia conhecida, ainda é possível observar o agente etiológico na placenta, como é o caso do *T. gondii*, usualmente identificado nas formas encistadas localizadas no tecido conjuntivo do âmnio e córion, estroma viloso, células

trofoblásticas, decídua e, raramente, cordão umbilical (Gersell e Kraus, 2000; Russell, 1995). O mesmo ocorre nas infecções pelo *T. cruzi*, cujos parasitas podem ser vistos no interior de histiócitos, livres ou agrupados em ninhos no estroma vilositário, troncos vilosos, membranas extraplacentárias, cordão umbilical e decídua (Bittencourt, 1992; Altemani et al., 1982).

1.2.4- Caracterização do infiltrado inflamatório

Vários estudos foram propostos para a caracterização do infiltrado inflamatório em vilosites crônicas. Eles demonstraram que há um predomínio de macrófagos e linfócitos T, cuja localização está muitas vezes associada às áreas de necrose do trofoblasto viloso (Kapur et al., 2004; Nakamura et al., 1994; Altemani, 1992; Labarrere et al., 1990).

Dentre os linfócitos T, há predomínio do número de linfócitos T CD8+ sobre os linfócitos T CD4+. Monócitos MAC 387+ também estão presentes, agregando-se nos locais de ruptura do trofoblasto, em quantidades que variam de 20 a 90% das células inflamatórias nestas áreas (Brito et al., 2005). Os linfócitos B são praticamente ausentes (Kapur et al., 2004; Altemani, 1992). Brito et al. (2005) também verificaram que o infiltrado pode exibir uma pequena quantidade de células NK, granulócitos e células positivas para S-100. Além disso, a maioria das células com morfologia para macrófagos, linfócitos T e monócitos expressam em sua superfície moléculas de MHC classe II (Altemani, 1992; Labarrere et al., 1990).

A origem destas células inflamatórias na vilosite tem sido questionada. Redline & Patterson (1993), utilizando técnicas de hibridização "*in situ*" e imunoistoquímica, demonstraram que 50% a 75% do infiltrado inflamatório, na VED, era constituído por células de origem materna. Este estudo foi corroborado por Kapur et al. (2004) que também verificaram, através da técnica de hibridização "*in situ*" com sondas fluorescentes para cromossomos sexuais, que a população de células inflamatórias intravilositárias era predominantemente de origem materna, tanto na VED quanto na vilosite causada por sífilis, levando a crer que essas duas condições possuem uma via imunopatogênica semelhante.

1.3- Infecção placentária por *Paracoccidioides brasiliensis*

A paracoccidioidomicose é uma doença endêmica em várias regiões da América Latina, inclusive no Brasil. Ela é causada por um fungo dimórfico e apresenta duas formas clínicas: aguda ou subaguda (tipo juvenil) e crônica (tipo adulto). A primeira afeta ambos os sexos com a mesma frequência e compromete, predominantemente, o sistema retículo-endotelial. A forma crônica acomete, principalmente, homens e caracteriza-se por um comprometimento pulmonar, mucocutâneo e linfático, de forma isolada ou combinada (Franco et al., 1989; Carvalho e Montenegro, 1999).

A infecção placentária por *P. brasiliensis* é um evento raro, sem a passagem do fungo para a circulação fetal. Nestes casos, os fungos podem ser identificados apenas no espaço intervilo, circundados por uma reação inflamatória histiocítica MAC 387+ com células gigantes multinucleadas, neutrófilos e depósito de fibrina. Observa-se também a perda do trofoblasto e espessamento da membrana basal trofoblástica, mas sem qualquer sinal de fungos ou células inflamatórias no interior das vilosidades (Braga et al., 1989; Blotta et al., 1993).

Como a infecção placentária causada por este agente permanece no espaço intervilo, mas existem áreas de necrose do trofoblasto, este tipo de infecção torna-se um ótimo modelo comparativo no estudo do papel da barreira trofoblástica na vilosite.

1.4- A transmigração celular e a molécula de ICAM-1

A resposta imunológica é desencadeada através do reconhecimento de antígenos que são considerados estranhos pelos linfócitos T. A partir daí, ocorre produção e expressão de diversas substâncias inflamatórias que auxiliam a ativação e função efetora de diversos tipos de leucócitos com o objetivo de destruir o antígeno em questão (Abbas e Lichtman., 2003).

Quimiocinas são moléculas responsáveis pela quimioatração destas células até o sítio de inflamação mas, para que elas possam alcançar o estroma onde o antígeno se encontra, é necessário atravessar o endotélio das vênulas pós-capilares da região inflamada

(Imhof e Aurrand-Lions, 2004; Abbas e Lichtman, 2003). Este fenômeno, conhecido como emigração leucocitária ou transmigração leucocitária, é um processo ativo que envolve diversas moléculas (Engelhardt e Wolburg, 2004).

Inicialmente, uma adesão fraca é formada por receptores conhecidos como selectinas, que são especializados em se ligar rapidamente a moléculas contendo oligossacarídeos (Adrian e Macay, 2000). Dentre as selectinas existem aquelas que são encontradas em plaquetas e células endoteliais (P-selectinas), somente no endotélio (E-selectinas) ou aquelas encontradas nos leucócitos (L-selectinas) (Ley e Kansas, 2004; Andrian e Macay, 2000). Como a ligação mediada pelas selectinas é fraca, ocorre sua dissociação, permitindo que aconteçam novas ligações mediadas por selectinas. Este fenômeno permite que o leucócito, presente na corrente sanguínea, perca velocidade e role sobre o endotélio (Ley e Kansas, 2004; Andrian e Macay, 2000).

O rolamento do leucócito sobre o endotélio favorece a ligação mediada pelas integrinas que leva a uma adesão forte entre leucócito e célula endotelial. O rolamento leucocitário, aliado à presença de quimiocinas, ocasiona a ativação das integrinas, que através de uma mudança conformacional se ligam com uma maior avidéz pelo seu ligante (Imhof e Aurrand-Lions, 2004; Andrian e Macay, 2000). Esta ligação permite que o leucócito pare de rolar e chegue à junção endotelial, onde através de diapedese, ele atravessara o endotélio (Schenkel et al., 2004; Muller, 2003; Andrian e Macay, 2000).

Integrinas são glicoproteínas heterodiméricas compostas de 2 cadeias polipeptídicas transmembranas, denominadas cadeias α e β . A subfamília das integrinas $\beta 2$ (CD18) é composta por várias moléculas dentre as quais destaca-se a molécula LFA-1 composta por uma cadeia $\alpha 1$ e uma cadeia $\beta 2$ (CD11a/CD18) (Andrian e Macay, 2000). Entre as células inflamatórias, neutrófilos, monócitos, linfócitos e células NK expressam o LFA-1, que determina a ligação destas células a ICAM-1 expresso pelo endotélio (Springer, 1990), permitindo a sua transmigração pelo endotélio vascular com o objetivo de alcançar o sítio de inflamação.

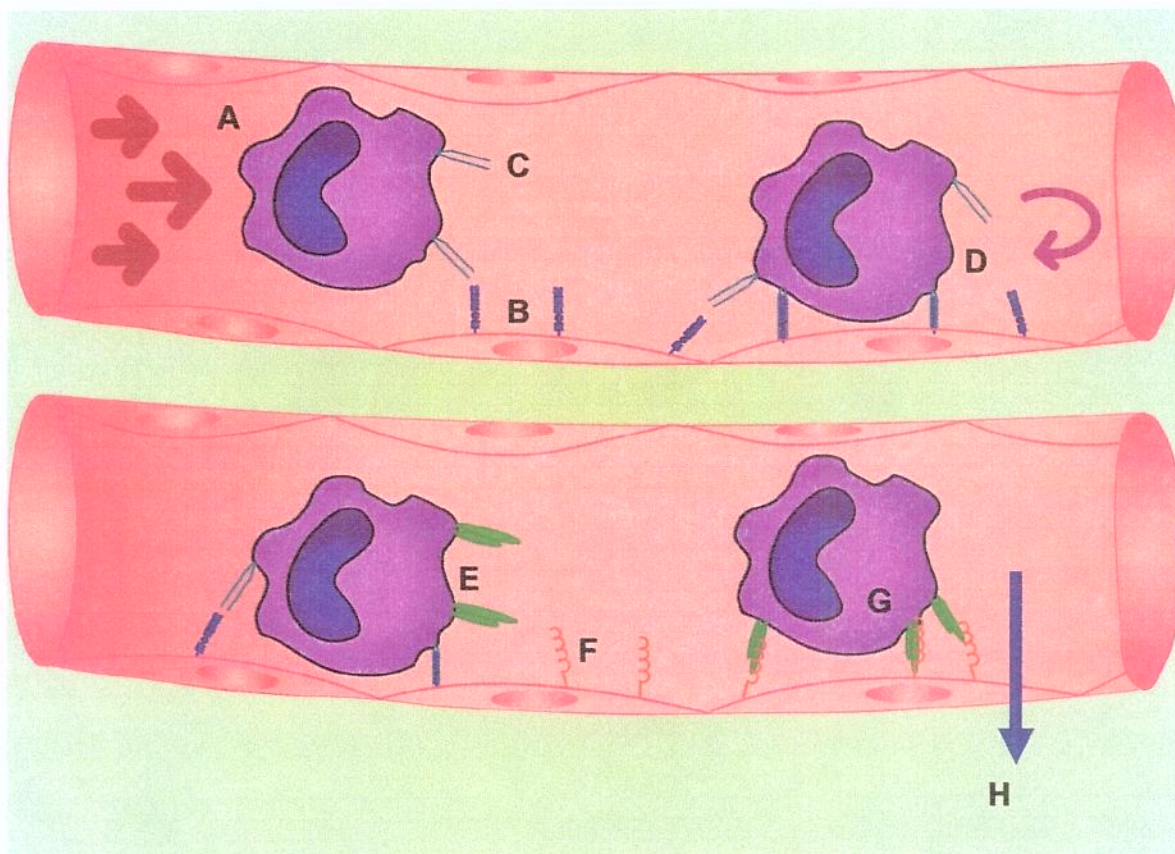


Figura 1- Transmigração leucocitária em vênula pós-capilar em um sítio inflamado. (A) O leucócito presente no vaso sofre a ação da corrente sanguínea. A E-selectina presente no endotélio (B) encontra seu ligante na superfície do leucócito (C). Esta ligação é fraca e logo ocorre a dissociação entre essas duas moléculas. Ocorrem novas ligações mediadas por selectinas, que também sofrem dissociações, fazendo com que o leucócito role sobre o endotélio (D). Este rolamento permite que ocorram as ligações mediadas pelas integrinas. O leucócito expressa a integrina LFA-1 (E) que se liga ao ICAM-1 (F) na superfície do endotélio. Esta ligação é forte (G) fazendo com que o leucócito pare de rolar. A partir de então, o leucócito alcança a junção endotelial onde inicia o processo de diapedese (H).

ICAM-1 (CD54) é uma glicoproteína usualmente ligada à membrana celular, citocina-induzível, expressa normalmente em células de múltiplas linhagens em sítios inflamados (Springer, 1990) e tipicamente encontrada em baixos níveis em células endoteliais não estimuladas (Bevilacqua, 1993). Entretanto, após algumas horas de estimulação com citocinas pró-inflamatórias, como o $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ e IL-1, ICAM-1 torna-se expressa em abundância no endotélio vascular (Bevilacqua, 1993). Além disso, ICAM-1 pode ser expressa por outros tipos celulares como linfócitos B, linfócitos T, monócitos/ macrófagos e células dendríticas onde, além da adesão, provavelmente desempenha um papel importante no processo de apresentação de antígenos (Lebedeva et al., 2005; Patarroyo et al., 1990).

1.5- A barreira trofoblástica e o papel de ICAM-1

O trofoblasto que reveste as vilosidades, por não expressar antígenos HLA clássicos, forma uma barreira que impede o reconhecimento imune materno dos antígenos HLA fetais, presentes no estroma viloso e nas células de Hofbauer (Fox, 1997). Além de proteger a vilosidade do ataque imunológico materno, o trofoblasto é a primeira barreira fetal encontrada pelo agente infeccioso, que alcança a placenta por via hematogênica materna.

As células de origem materna localizam-se no espaço interviloso e, para compor a maioria das células inflamatórias da vilosite, elas devem ultrapassar a barreira trofoblástica (Labarrere e Faulk, 1995; Redline e Patterson, 1993).

Estudos sobre a participação da barreira trofoblástica na patogênese da vilosite placentária são raros e realizados principalmente em cultura de tecidos (Garcia-Lloret et al., 2000; Xiao et al., 1997). Estes trabalhos experimentais mostraram que monócitos maternos ativados e aderidos ao sinciciotrofoblasto via ICAM-1 produzem e liberam $\text{TNF}\alpha$ que o lesa através da indução de apoptose. Tem sido proposto que a perda do sinciciotrofoblasto, por esse mecanismo, seria um processo importante para o início da vilosite placentária, pois permitiria a entrada de células maternas para o interior das vilosidades coriais

(Garcia-Lloret et al., 2000). Em trabalhos anteriores sobre vilosite placentária observou-se que, justamente nas áreas de ruptura trofoblástica havia maior acúmulo de células inflamatórias, sendo que monócitos e linfócitos constituíam boa parte destas células (Altemani et al., 2000; Altemani, 1992; Labarrere et al., 1990).

A análise da importância da barreira trofoblástica na modulação da reação inflamatória na vilosite de etiologia desconhecida, de etiologia conhecida e intervilosite, permite compreender mecanismos que podem estar envolvidos no influxo de células maternas para o compartimento fetal, a transmissão vertical de infecções durante a gravidez, além de ajudar a compreender o funcionamento da barreira placentária.

2- OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a expressão de ICAM-1 (molécula 1 de adesão intercelular) no trofoblasto viloso, sua relação com ruptura trofoblástica, aderência de leucócitos, e influxo de células imunes para o estroma viloso em placentas humanas com placentites.

Objetivos específicos

- a) Determinar se em vilosite de etiologia conhecida, desconhecida e intervilosite ocorre expressão anormal de ICAM-1 na superfície do sinciciotrofoblasto da vilosidade inflamada.
- b) Determinar se a expressão aumentada de ICAM-1 no sinciciotrofoblasto está relacionada às áreas de ruptura trofoblástica e à aderência de leucócitos.
- c) Determinar se há relação entre expressão de ICAM-1 com sinciciotrofoblasto e influxo de células inflamatórias maternas para o estroma viloso.

3- ARTIGO

ICAM-1 is overexpressed by villous trophoblasts in placentitis

Juliano, P.B.¹; Blotta, M.H.S.L.²; Altemani, A.M.A.¹

¹ Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas,
São Paulo, Brazil

² Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, São
Paulo, Brazil

Correspondence: Albina Altemani M.D. - Department of Pathology, Faculty of Medicine,
State University of Campinas (UNICAMP), 13084-971 Campinas, SP, Brazil.
P.O. box 6111

Juliano PB, Blotta MHSL, Altemani AMA. ICAM-1 is overexpressed by villous trophoblasts in placentites. Placenta 2005; Em publicação.

Summary

Although an *in vitro* study has hypothesized that expression of ICAM-1 by villous trophoblasts could be important for the influx of maternal immune cells in villitis, it remains to be shown whether the same phenomenon occurs in human villitis. To investigate the expression of ICAM-1 by villous trophoblasts, its relationship with rupture of the trophoblastic barrier and influx of immune cells into the villi, we analyzed 18 paraffin-embedded placentas with placentitis (5 by *T. gondii*, 3 by *T. cruzi*, 2 by *P. brasiliensis* and 8 of unknown aetiology - VUE) and 8 control placentas for detection of ICAM-1 by immunohistochemistry. All cases but one of placentitis showed trophoblast overexpression of ICAM-1 in the inflamed villi, located almost exclusively next to the areas of trophoblastic rupture. The villitis cases (caused by *T. cruzi*, *T. gondii* and VUE) presented leukocyte adherence in the areas of trophoblastic rupture. When the inflammatory reaction was situated in the intervillous space (placentitis by *P. brasiliensis*), in spite of the trophoblastic rupture and ICAM-1 overexpression there was no leukocyte influx into villi. None of the control placentas showed ICAM-1 expression. We concluded that overexpression of ICAM-1 by villous trophoblasts occurs during placentitis characterized by accumulation of leukocytes in the villous or intervillous space and probably plays an important role in the rupture of the trophoblastic barrier. The influx of immune cells into the villi appears to be mediated by ICAM-1 but the location of the antigen within villous stroma is certainly a crucial factor for its occurrence.

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

Introduction

Chronic villitis may be associated with foetal infections, foetal growth restrictions or, in less severe cases, it may be asymptomatic. The lesion is characterized by an inflammatory infiltrate within the substance of the chorionic villi ^{1, 2} due to specific maternal infections, e.g. rubella, toxoplasmosis, Chagas' disease etc, but in the majority of cases it is of unknown aetiology (VUE) ³. In both types of villitis (infectious and of unknown aetiology) it has been demonstrated that most of the immunological cells, composed mainly of macrophages/ monocytes and T lymphocytes within inflamed villi are of maternal origin, suggesting that these cells have the capacity to migrate across the trophoblastic barrier into foetal tissues ^{4, 5, 6, 7}. However, the mechanisms involved in the maternal leukocyte transmigration across this barrier have not been thoroughly investigated.

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a member of the immunoglobulin superfamily that is inducible in a variety of cell types, including endothelial cells ⁸. Endothelial cell surface ICAM-1 appears to contribute to the adhesion and transmigration of leukocytes that express its ligand molecule LFA-1 (leukocyte function-associated antigen-1), such as neutrophils, monocytes, lymphocytes and natural killer cells ^{9, 10}. The syncytiotrophoblast (ST), which delimits the villous stroma, has an endothelial function that enables it to regulate maternal-foetal exchange ¹. Aberrant expression of ICAM-1 has been described in cultured syncytiotrophoblast (ST) pretreated with inflammatory cytokines, which also have the property of increasing the adhesion of monocytes to ST ¹¹. In addition, it has also been shown that monocytes adhering by LFA-1 to placental ST induce TNF alpha dependent apoptosis accompanied by focal disruption of the trophoblast culture ¹². Based on these findings, it has been suggested that focal damage of the placental barrier could be a route for maternal leukocyte infiltration into the villi and a possible mechanism of villitis onset ¹². However, it has yet to be demonstrated whether the same phenomena occur in human villitis.

To investigate the expression of ICAM-1 in the villous trophoblasts, its relationship with rupture of the trophoblastic barrier and influx of immune cells into the villi, we examined human placentitis with inflammatory infiltrate located within the

chorionic villi (villitis) and in the intervillous space (intervillositis) by immunohistochemistry in paraffin sections.

Materials and Methods

Cases

The study was performed in 26 placentas: 16 with villitis, 2 with intervillositis and 8 control placentas without inflammation. Villitis was caused by *Toxoplasma gondii* in 5 cases (3 live births and 2 stillbirths), by *Trypanosoma cruzi* in 3 (1 live birth and 2 stillbirths) while in 8 cases (all live births) the aetiology was unknown (VUE). Intervillositis was caused by *Paracoccidioides brasiliensis* in the 2 cases with this lesion (1 live birth and 1 stillbirth). In all cases of villitis by *T. cruzi* and *T. gondii* there was maternal and/or infant evidence of infection and the parasites were identified in the placentas using immunohistochemical methods. In placentas with VUE neither the mother nor the infant had clinical or serological evidence of infection by the usual agents that are investigated during pregnancy (TORCH group, Human immunodeficiency virus and hepatitis B virus). The placentas were fixed in 10 percent formalin, the blocks embedded in paraffin and histological sections stained with haematoxylin and eosin. Four of the infectious villitis cases were included in previous reports^{13, 14}.

Immunohistochemistry

The antibodies used in this study were: anti-CD45RO (IgG2a, clone UCHL-1), anti-CD20 (IgG2a, clone L26), MAC 387 (IgG1), HAM 56 (IgM), anti-CD15 (IgM, clone C3D-1), anti-human natural killer cell-like (IgM, HNK1), anti-ICAM-1 (clone 54C04) (Table 1). Isotypes-matched mouse controls (IgM clone DAK-GO8; IgG1 clone DAK-GO1 and IgG2a clone DAK-GO5 from Dakopatts S/A, Denmark) at the same concentrations were used as negative controls. The specificity of some antibodies deserves comment: UCHL-1 identifies up to 78% of normal T cells together with macrophages and myeloid cells¹⁵; L26 recognizes normal B cells and follicular dendritic reticulum cells¹⁵, anti-CD15 reacts with granulocytes and dendritic reticulum cells¹⁵, MAC 387 recognizes normal

macrophages and myeloid cells ¹⁵ and HAM 56 recognizes macrophages and monocytes. All antibodies were from Dakopatts S/A, Denmark, except for anti-ICAM-1, which was from Neomarkers Labvision (Fremont, CA, USA; IgG1, clone 54C04). A second antibody anti-ICAM-1 (IgG2a, sc- 8439, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) was used to spot check sections and the obtained results were qualitatively the same as the first.

One paraffin block from each case was chosen for the immunohistochemical study ¹⁶. Briefly, the 5µm sections were deparaffinized, hydrated and endogenous peroxidase activity was quenched by immersion of the slides in 3% hydrogen peroxide. The antigen retrieval (AR) was achieved by boiling, in a steamer, in citrate buffer (pH: 6.0) or Tris-EDTA buffer (pH: 8.9) according to the primary antibody used (Table 1). After cooling, the sections were incubated at 4°C with the primary antibody overnight and then with the EnVision polymer for 1h at 37°C. Subsequently, sections were stained for 5min at 37°C with 3.3'- diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) and counter-stained with haematoxylin.

In selected cases, double-labelling immunohistochemical staining was performed (EnVision doublestain, code K1395, DAKO, SA, Denmark.). A monoclonal antibody MAC 387 (Table 1) was applied after antigen retrieval using citrate buffer (pH: 6.0) and incubated overnight at 4°C; detection was achieved using the EnVision anti-mouse and anti-rabbit polymer HRP (Table 1) and DAB to visualize the binding of the first antibody. The sections were then incubated with an antibody against ICAM-1 (Table 1) at 4°C overnight. EnVision polymer linked to alkaline phosphatase and fast red as a substrate chromogen system were used to complete the second immunostaining. The isotype-matched negative controls did not show coloured-precipitate on the tissue, which indicates that artifactual staining was minimized.

Analysis of positive cells

Serial tissue sections were used and each of the different antibodies (anti-CD45RO, HAM 56, MAC 387, anti-CD20, anti-CD15, and anti-NK cells) was applied on a different section of the same block. Any CD45RO-positive cell was used as the criterion for villitis. The positive inflammatory cells in affected villi were then counted

in three different high-power fields. The relative numbers of stained leukocytes were considered in relation to all inflammatory cells seen for each stained section. The immunoreactivity was assessed using a five-tiered scale: 0%, 0.1%-20%, 20.1%-40%, 40.1%-60%, 60.1%-80%, and 80.1%-100%.

The reactivity of the trophoblast and endothelial cells for ICAM-1 was not analysed quantitatively since the number of positive cells was difficult to determine. For this reason any reactivity to this antibody on the villous trophoblast or foetal vessel was considered positive, independent of its extension, and its absence as negative. The same type of analysis was applied to evaluate ICAM-1 reactivity on the villous stromal cells and leukocytes since in some villi these cells coexisted which made quantitative analysis difficult.

Results

Placentas with villitis – 16 cases

The inflammatory reaction was diffuse, severe and granulomatous in four villitis cases (two caused by *T. cruzi* and two by *T. gondii*). In the remaining cases (one villitis by *T. cruzi*, three by *T. gondii* and eight of unknown aetiology) the villitis was focal and composed of non-specific chronic inflammatory infiltrate. In all placentas variable numbers of inflamed villi presented foci of trophoblastic necrosis. In the majority of these foci, mononuclear cells formed aggregates in the intervillous space around these points. Apparently they were maternal cells, which migrated to the points of trophoblastic disruption.

Immunohistochemical findings: in all cases, the inflammatory infiltrate within the villous stroma was composed mainly of HAM 56+ macrophages and UCHL-1+ T lymphocytes (Figure 1). Few NK cells and rare B-lymphocytes were also observed (Table 2). In the intervillous space, the inflammatory cells located around the sites of trophoblastic necrosis were mainly MAC 387+ monocytes (Figure 2), followed by CD15+ neutrophils and a small number of T lymphocytes. In some villi, MAC 387+ monocytes and CD15+ neutrophils also formed a collection of cells below the intact trophoblast. All the placentas with villitis, except for one case, showed a variable number of inflamed villi

with ICAM-1 expression on the apical surface of the ST (Table 4) (Figure 3). This expression was strongly associated with the sites of trophoblastic necrosis and with adherence of mononuclear cells (Figure 4). In some cases, in addition to the ST other elements located in the areas of trophoblastic rupture, such as villous stroma, lymphocytes, macrophages and monocytes also showed ICAM-1 overexpression (Figure 5). Rare villi without inflammatory infiltrate and the luminal surface of the endothelium of a few foetal vessels presented ICAM-1 expression in some villitis cases (Table 4).

Placentas with intervillitis – two cases

The two cases of intervillitis caused by *P. brasiliensis* showed fungi in the intervillous space enmeshed with leukocytes and fibrin deposits. The villi around this inflammatory reaction presented trophoblastic rupture and absence of inflammatory cells within the stroma.

Immunohistochemical study showed that the majority of the leukocytes around the fungi were MAC 387+ monocytes and CD15+ granulocytes followed by a small number of HAM 56+ macrophages and T lymphocytes (Table 3) (Figure 6). Expression of ICAM-1 was observed on the apical surface of the ST adjacent to areas of trophoblastic rupture in some villi located in the vicinity of the inflammatory reaction caused by the fungi (Table 4) (Figure 7). However, leukocytes were not found within these villi. In these cases, the areas without inflammation did not show ICAM-1 expression by the ST.

Normal Placentas – 8 cases

In the control placentas, mononuclear cells positive for UCHL-1, CD20, MAC 387 and CD15 were found in the foetal and/or maternal circulations but not in the villous stroma. Only a small number of HAM 56+ macrophages were present in the villous stroma (Table 5). None of the normal placentas showed ICAM-1 expression by the ST or in any other site.

Discussion

This study demonstrates for the first time expression of ICAM-1 by trophoblast in placental villitis using histological sections. This expression is strongly associated with loss of the trophoblastic barrier and with adherence of mononuclear cells to the denuded areas. We studied villous inflammation caused by different pathogens. In all cases, independent of the aetiology, HAM 56+ macrophages and T lymphocytes constituted the main inflammatory cells within the villous stroma, as previously described^{14, 17, 18}. Immunohistochemical ICAM-1 expression by the trophoblast was found almost exclusively in these inflamed villi and was located in the ST around the points of trophoblastic rupture. In these areas there were collections of MAC 387+ monocytes and CD15+ granulocytes, followed by few T lymphocytes. These immunomorphological findings are in agreement with the results shown by Xiao *et al* (1997)¹¹ in cultured ST, in which expression of ICAM-1 was associated with increased adhesion of monocytes and was cytokine concentration dependent.

Garcia-Lloret *et al* (2000)¹² demonstrated that monocytes adhered by LFA-1, a ligand molecule for ICAM-1, provoked focal disruption of the trophoblast culture via TNF-alpha dependent apoptosis. These authors suggested that these events could be considered as a possible mechanism for villitis onset because the focal loss of the trophoblastic barrier would be a route for maternal leukocyte infiltration into the villi.

In our series, all the cases showed villitis at an advanced stage with proliferation of inflammatory cells (HAM 56+ macrophages and T lymphocytes) within the villous stroma. In this late phase of the event, ICAM-1 expression by the trophoblast was also related to trophoblastic rupture and appearance of monocytes MAC 387+ and granulocytes in the inflammatory infiltrate within the villi. We believe that the pathogens that are able to cross the trophoblastic barrier can induce inflammatory reaction and activation of the immune cells with release of pro-inflammatory cytokines within the villous stroma. The high concentration of these cytokines at this site could lead to ICAM-1 overexpression by the trophoblast, which then also would initiate the sequence of events described by Garcia-Lloret *et al* (2000)¹², i.e., maternal monocyte adhesion and focal necrosis of the trophoblastic barrier. According to our findings, one of the consequences of

the influx of monocytes and granulocytes into the villi is the enhancement of villous inflammation, which in turn increases the destruction of the placental parenchyma. However, as all the cases studied in our series showed villitis at a late phase we cannot analyse whether ICAM-1 expression plays a role either on villitis onset or on the passage of the agent through the villous trophoblast. Two recent trophoblast culture studies involving HIV-1 and human cytomegalovirus placental infection have shown ICAM-1 trophoblastic overexpression^{19, 20} what has led to the hypothesis that trophoblast-ICAM-1 interaction could also be important for infectious agent transfer across the placental barrier¹⁹.

It also deserves comment that our cases of villitis of unknown aetiology (VUE) showed features similar to those observed in villitis of infectious origin (caused by *T. gondii* and *T. cruzi*). Two hypotheses have been considered for VUE: an unidentified infection and an immunologic reaction due to maternal rejection of paternal antigens exposed within villi^{21, 22, 23, 24}. The similarity of findings in the two studied groups (VUE and infectious villitis) could support the hypothesis that VUE may result from an infectious cause²⁴. However, we cannot exclude that an inflammation due to an immunologic reaction could also lead to ICAM-1 trophoblastic expression which then would initiate the sequence of events described by Garcia-Lloret *et al* (2000)¹².

Another interesting finding in our study was the ICAM-1 overexpression by the trophoblast in cases with intervillous inflammation provoked by *P. brasiliensis*. Apparently, the placenta is an effective barrier against this fungus¹³. The fungi remain in the intervillous space where they are surrounded mainly by macrophages / monocytes and neutrophils. Only the villi amid the intervillous inflammatory reaction showed trophoblastic necrosis and ICAM-1 overexpression by ST. Probably macrophages/ monocytes activated by the microbial products produced pro-inflammatory cytokines^{25, 26, 27, 28}, which are known to induce endothelial and trophoblastic ICAM-1 overexpression¹¹. The localized nature of the loss of the trophoblastic barrier, i.e., only in villi surrounding the cellular immune response to the fungi in the intervillous space reinforces the findings reported by Garcia-Lloret *et al* (2000)¹² in cultured ST. In that study the extent of trophoblast damage caused by adhering monocytes is a local effect that is roughly proportional to the number of cells in the area of the lesion. The absence of immune cell influx into the villi in spite of the disruption of the trophoblastic barrier is another interesting finding in these cases with

intervillositis. This fact is probably due to the high concentration of inflammatory molecules in the intervillous space, but not within the villi, as consequence of the permanence of the infectious agent in this site. Similar to the cases with placentitis by *P. brasiliensis*, *Plasmodium falciparum*-infected placentas also show histological changes in the intervillous space such as aggregates of infected erythrocytes, perivillous fibrin deposits, and massive chronic intervillositis²⁹ without influx of maternal immune cells into the villi¹. These placentas, similar to those with *P. brasiliensis* intervillositis, may show ICAM-1 overexpression by syncytiotrophoblast, monocytes, and other cells^{30,31}.

Finally, in our series we did not find ICAM-1 overexpression in the trophoblasts of normal placentas. These findings are in agreement with other studies using immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded placentas^{30, 32}. However, studies using other approaches have shown weak ICAM-1 expression in the ST^{33, 34}. These discrepancies may be due to differences in the sensitivity of the methods used.

In conclusion, overexpression of ICAM-1 by villous trophoblasts occurs during placentitis characterized by accumulation of leukocytes in the villous or intervillous space and probably plays an important role in the rupture of the trophoblastic barrier. The influx of immune cells into the villi appears to be mediated by ICAM-1 but the localization of the antigen within the villous stroma is certainly a crucial factor for its occurrence.

Supported by FAPESP (process number 02/00755-7).

Table 1: Details of the antibodies used for immunohistochemistry.

Specificity	Clone	Isotype	Dilution	Source	Buffer (AR)	Polymer
CD45RO (T cells)	UCHL1	IgG2a	1:100	Dako	Citrate	EnVision anti-mouse/anti-rabbit*
CD20 (B cells)	L26	IgG2a	1:50	Dako	Citrate	EnVision anti-mouse/anti-rabbit
CD15 (neutrophils)	C3D-1	IgM	1:50	Dako	Tris-EDTA	EnVision+ (Plus) anti-mouse†
CD54 (ICAM-1)	54C04	IgG1	1:10	Labvision	Citrate	EnVision anti-mouse/anti-rabbit
Macrophages	HAM 56	IgM	1:50	Dako	Citrate	EnVision anti-mouse/anti-rabbit
Monocytes	MAC 387	IgG1	1:100	Dako	Citrate	EnVision anti-mouse/anti-rabbit
NK cells	NK1	IgM	1:50	Dako	Tris-EDTA	EnVision+ (Plus) anti-mouse

*EnVision polymer HRP, code K4016, DAKO, SA, Denmark.

†EnVision+ polymer HRP, code K4003, DAKO, SA, Denmark.

Table 2: Distribution of cases with villitis (caused by *T. cruzi*, *T. gondii* and of unknown aetiology) according to the percentage of reactive cells to the antibodies UCHL-1, anti-CD20, HAM 56, NK1, MAC 387 and anti-CD15.

	UCHL1	Anti-CD20	HAM56	MAC 387	Anti-CD15	NK1
% of reactive cells	16 cases (%)	16 cases (%)	16 cases (%)	16 cases (%)	16 cases (%)	16 cases (%)
0%	0	14 (87.5%)	0	5(31.25%)	9 (56.25%)	1 (6.25%)
0.1-20%	0	2 (12.5%)	1 (6.25%)	6 (37.5%)	4 (25%)	12 (75%)
20.1-40%	8(50%)	0	1 (6.25%)	4 (25%)	3 (18.75%)	3 (18.75%)
40.1-60%	6(37.5%)	0	5 (31.25%)	1 (6.25%)	0	0
60.1-80%	2(12.5%)	0	6 (37.5%)	0	0	0
80.1-100%	0	0	3 (18.75%)	0	0	0

Table 3: Distribution of cases with intervillitis (caused by *P. brasiliensis*) according to the percentage of reactive cells to the antibodies UCHL-1, anti-CD20, HAM 56, NK1, MAC 387 and anti-CD15.

	UCHL1	Anti-CD20	HAM56	MAC 387	Anti-CD15	NK1
% of reactive cells	2 cases (%)	2 cases (%)	2 cases (%)	2 cases (%)	2 cases (%)	2 cases (%)
0%	0	2 (100%)	0	0	0	2 (100%)
0.1-20%	2 (100%)	0	2 (100%)	1 (50%)	1 (50%)	0
20.1-40%	0	0	0	0	0	0
40.1-60%	0	0	0	0	0	0
60.1-80%	0	0	0	0	0	0
80.1-100%	0	0	0	1 (50%)	1 (50%)	0

Table 4: Distribution of villitis cases of known aetiology (caused by *T. cruzi* and *T. gondii*), villitis of unknown aetiology and intervillitis (caused by *P. brasiliensis*), according to the presence of cell reactivity to anti-ICAM-1 antibody.

Case	ICAM-1 expression			
	Trophoblast	Inflammatory cells	Stroma	Foetal Vessel
Villitis of known aetiology				
01*	+	-	+	-
02*	+	-	+	-
03*	+	-	+	+
04*	-	-	-	-
05*	+	-	-	+
06†	+	-	-	-
07†	+	-	+	-
08†	+	-	-	-
Villitis of unknown aetiology				
11	+	+	-	+
12	+	-	-	-
13	+	+	+	+
14	+	-	-	-
15	+	-	-	-
16	+	-	-	-
17	+	-	-	-
18	+	+	+	+
Intervillitis				
09	+	-	-	+
10	+	-	-	-

+ : positive reactivity

-: negative reactivity

*: villitis caused by *T. gondii*

†: villitis caused by *T. cruzi*

Table 5: Distribution of control cases according to the percentage of cells reactive to UCHL-1, anti-CD20, NK1, HAM 56, MAC 387 and anti-CD15 antibodies*.

% of reactive cells	UCHL1	Anti-CD20	HAM56	MAC 387	Anti-CD15	NK1
	8 cases (%)	8 cases (%)	7 cases (%)	8 cases (%)	8 cases (%)	8 cases (%)
0%	8 (100%)	8 (100%)	0	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)
0.1-20%	0	0	7 (100%)	0	0	0
20.1-40%	0	0	0	0	0	0
40.1-60%	0	0	0	0	0	0
60.1-80%	0	0	0	0	0	0
80.1-100%	0	0	0	0	0	0

*In control cases, positive cells for antibodies UCHL-1, anti-CD20, NK1, MAC 387 and anti-CD15 were found within the foetal and maternal circulations but not within the villous stroma.

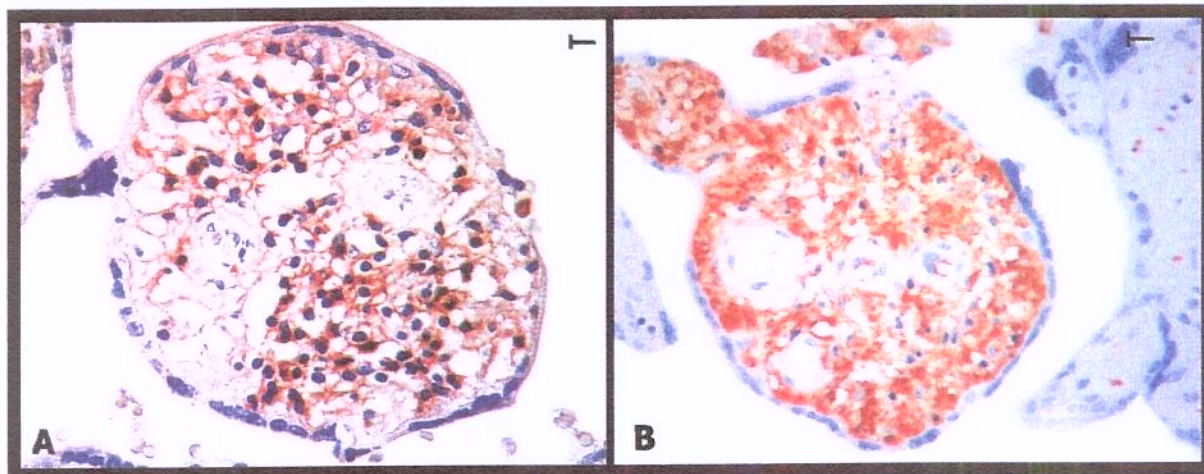


Figure 1: Villitis caused by *T. cruzi*. Note the numerous lymphocytes T UCHL-1+ (A) and macrophages HAM56+ (B) within the villous stroma. EnVision System Technique, DAKO, S.A., Denmark. Bar: 15 μ m and 20 μ m respectively.

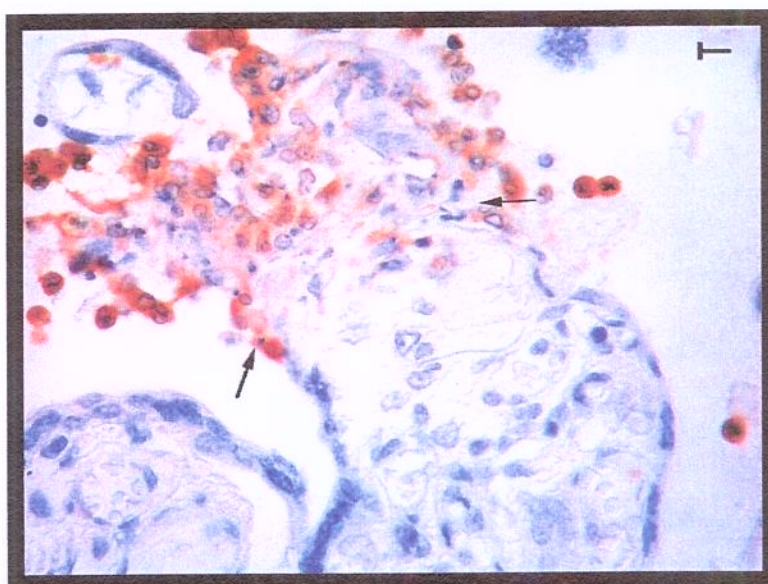


Figure 2: MAC 387+ monocytes in villitis caused by *T. gondii*. Note the trophoblastic rupture (between arrows) and the mononuclear cells (brown) forming aggregates in the intervillous space around this site. EnVision System Technique, DAKO, S.A., Denmark. Bar: 14 μ m.

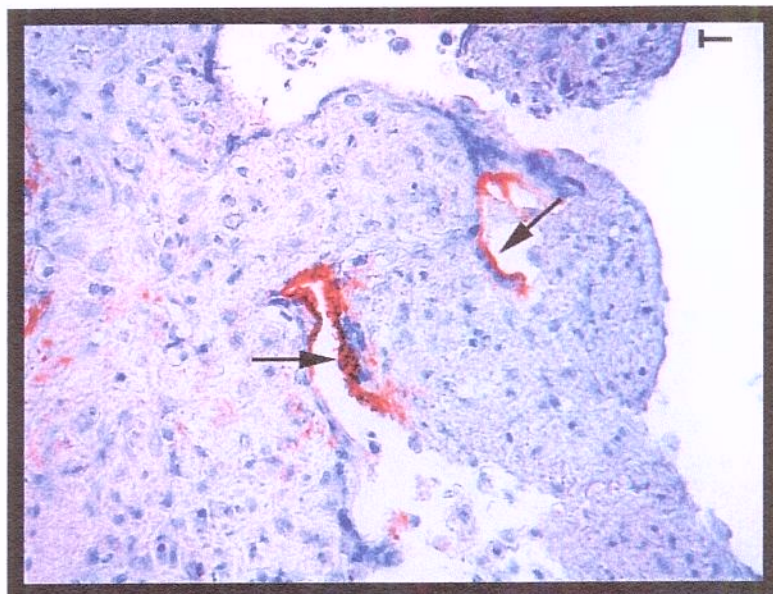


Figure 3: Villitis caused by *T. gondii*. ICAM-1 is overexpressed on the apical surface of the syncytiotrophoblast (arrow) next to the areas of trophoblastic necrosis. EnVision System Technique, DAKO, S.A., Denmark. Bar: 20 μ m.

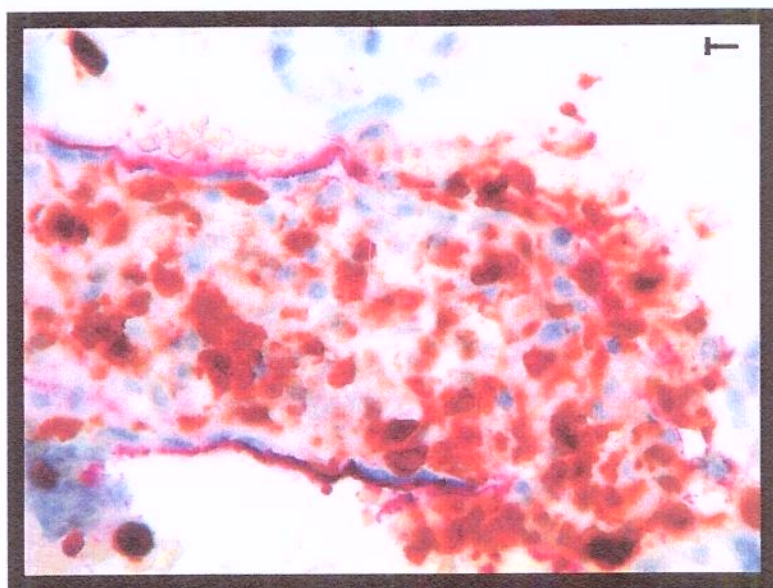


Figure 4: Villitis of unknown aetiology. Monocytes MAC 387+ (brown) are adhered to the areas of trophoblastic necrosis. Note ICAM-1 overexpression (red) on the apical surface of the ST next to this area. EnVision System Doublestain Technique, DAKO, S.A., Denmark. Bar: 12,5 μ m.

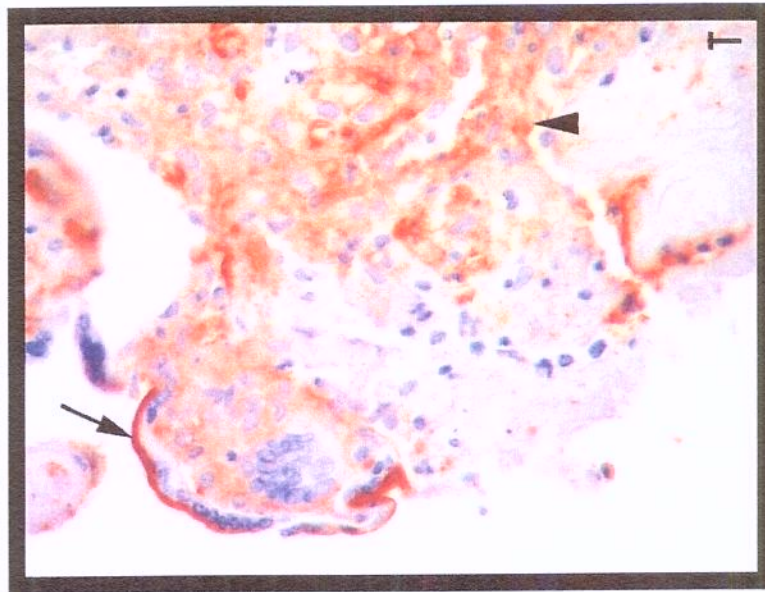


Figure 5: Villitis caused by *T. gondii*. ICAM-1 is overexpressed in inflammatory cells (arrowhead) and on apical surface of the ST (arrow), next to the area of trophoblastic rupture. EnVision System Technique, DAKO, S.A., Denmark. Bar: 15 μ m.

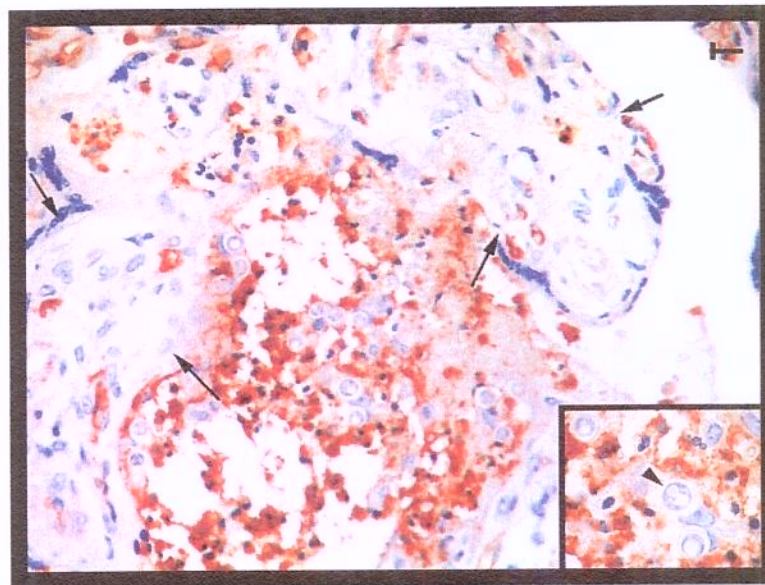


Figure 6: Intervillitis caused by *P. brasiliensis*. The CD15+ granulocytes (brown) are the most common cells found in this case. The villous stroma is delineated between arrows. The fungi (arrowhead) and granulocytes are shown in detail at bottom right. EnVision System Technique, DAKO, S.A., Denmark. Bar: 18 μ m.

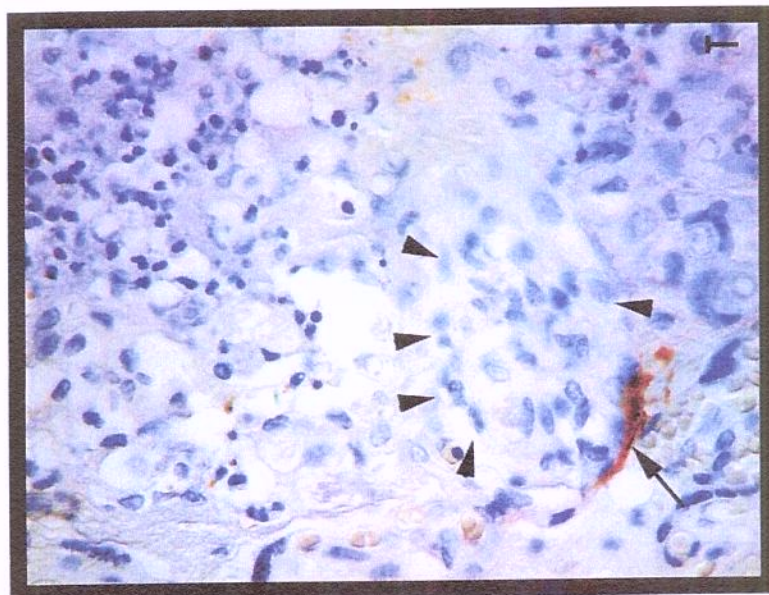


Figure 7: Intervillositis caused by *P. brasiliensis*. Expression of ICAM-1 (arrow) is observed on ST adjacent to areas of trophoblastic rupture in a villus located next to inflammatory reaction. The villous stroma is delimited by arrowheads. EnVision System Technique, DAKO, S.A., Denmark. Bar: 16 μ m.

References

- [1] **FOX H** Infections and inflammatory lesions of the placenta. In Pathology of the placenta 1997 2nd ed. FOX H, pp. 294-343. London: Saunders.
- [2] **ALTSHULER G & RUSSELL P** The human placental villitides: a review of chronic intrauterine infection. Current Topics in Pathology 1975; 60: 63-112.
- [3] **KNOX WF & FOX H** Villitis of unknown aetiology: its incidence and significance in placentae from a British population. Placenta 1984; 5: 395-402.
- [4] **LABARRERE CA, MCINTYRE JA, FAULK WP** Immunohistologic evidence that villitis in human normal term placentas is an immunologic lesion. Am J Obstet Gynecol 1990; 162: 515-522.
- [5] **LABARRERE CA & FAULK WP** Maternal Cells in chorionic villi from placentae of normal and abnormal human pregnancies. Am J Reprod Immunol 1995; 13: 54-59.
- [6] **KAPUR P, RAKHEJA D, GOMEZ AM, SHEFFIELD J, SANCHEZ P, ROGERS BB** Characterization of Inflammation in Syphilitic Villitis and in Villitis of Unknown Aetiology. Pediatr Develop Pathol 2004; 4: 453-458, 2004.
- [7] **REDLINE RW & PATTERSON P** Villitis of unknown etiology is associated with major infiltration of fetal tissue by maternal inflammatory cells. Am J Pathol 1993; 143: 473-479.
- [8] **BEVILACQUA MP** Endothelial-leukocyte adhesion molecules. Annu Rev Immunol 1993; 11: 767-804.
- [9] **SPRINGER TA** Adhesion receptors of the immune-system. Nature 1990; 346: 425-434.
- [10] **SCHENKEL AR, MAMDOUH Z, MULLER WA** Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. Nature Immunol 2004; 5 (4): 393-400.

- [11] **XIAO J, GARCIA-LLORET M, WINKLER-LOWEN B, MILLER R, SIMPSON K, GUILBERT LJ** ICAM-1-mediated adhesion of peripheral blood monocytes to the maternal surface of placental syncytiotrophoblast: implications for placental villitis. *Am J Pathol* 1997; 150: 1845-1860.
- [12] **GARCIA-LLORET M, WINKLER-LOWEN B, GUILBERT LJ** Monocytes adhering by LFA-1 to placental syncytiotrophoblasts induce local apoptosis via release of TNF-alpha. A model for hematogenous initiation of placental inflammations. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 903-908.
- [13] **BLOTTA MHSI, ALTEMANI AM, AMARAL E, SILVA LJ, CAMARGO ZP** Placental involvement in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1993; 31: 249-257.
- [14] **ALTEMANI A, BITTENCOURT AL, LANA AM** Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chagas' disease: a qualitative and quantitative analysis. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62(3): 319-324.
- [15] **NORTON AJ, ISAACSON PG** Lymphoma phenotyping in formalin-fixed and paraffin wax-embedded tissue. I. Range of antibodies and staining patterns. *Histopathology* 1989; 14 (5): 437-446.
- [16] **SABATTINI E, BISGAARD K, ASCANI S, POGGI S, PICCIOLI M, CECCARELLI C, et al** The EnVision^{TM+} system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMateTM, CSA, LABC and SABC techniques. *J Clin Pathol* 1998; 51(7): 506-511.
- [17] **ALTEMANI A** Immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate in villitis of unknown aetiology. A qualitative and quantitative analysis. *Path Res Pract* 1992; 188: 303-309.
- [18] **BRITO H, JULIANO P, ALTEMANI C, ALTEMANI A** Is the immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate helpful in distinguishing villitis of unknown aetiology from non-specific infection villitis? *Placenta; In Press*.

[19] **ARIAS RA, MUNOZ LD, MUNOZ-FERNANDES, MA** Transmission of HIV-1 infection trophoblast placental cells and T-cells take place via an LFA-1-mediated cell to cell contact. *Virology* 2003;307 (2): 266-277.

[20] **CHAN G, STINSKI MF, GUILBERT LJ** Human Cytomegalovirus-Induced Upregulation of Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 on Villous Syncytiotrophoblasts. *Biol Reprod* 2004: 797-803.

[21] **LABARRERE C, ALTHABE O, TELENTA M** Chronic villitis of unknown aetiology in placentae of idiopathic small for gestational age infants. *Placenta* 1982; 3: 309-318

[22] **LABARRERE CA, CARSON SD, FAULK SP** Tissue factor in chronic villitis of unestablished etiology. *J Reprod Immunol* 1991; 19: 225-235.

[23] **REDLINE RW, PATTERSON P** Villitis of unknown etiology is associated with major infiltration of fetal tissues by maternal inflammatory cells. *Am J Pathol* 1993, 143: 473-479.

[24] **BENIRSCHKE K & KAUFMANN P** Infectious diseases. In *Pathology of the Human Placenta* 1997 2nd ed. Fox H, pp. 591-684. New York: Springer.

[25] **MUNDER M, MALLO M, EICHMAN K, MODOLELI M** Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med* 1998; 187: 2103-2108.

[26] **DI MARZIO P, PUDDU P, CONTI L, BELARDELLI F, GESSANI S** Interferon gamma upregulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med* 1994; 179: 1731-1736.

[27] **FULTZ MJ, BARBER SA, DIEFFENBACH CW, VOGEL SN** Induction of IFN-gamma in macrophages by lipopolysaccharide. *Int Immunol* 1993; 5: 1383-1392.

[28] **PUDDU P, FATUZZI L, BORGHI P, VARANO B, RAINALDI G, GUILLEMARD E et al** IL-12 induces IFN-gamma expression and secretion in mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 1997; 159: 3490-3497.

[29] **ORDI J, ISMAIL MR, VENTURA PJ, KAHIGWA E, HIRT R, CARDESA A, et al** Massive chronic intervillitis of the placenta associated with malarial infection. *Am J Surg Pathol* 1998; 22:1006-1011.

[30] **SARTELET H, GARRAUD O, ROGIER C, MILKO-SARTELET I, KABORET Y, MICHEL G, ROUSSILHON C, HUERRE M, GAILLARD D.** Hyperexpression of ICAM-1 and CD36 in placentas infected with *Plasmodium falciparum*: a possible role of these molecules in sequestration of infected red blood cells in placentas. *Histopathol* 2000; 36(1):62-68.

[31] **SUGIYAMA T, CUEVAS LE, BAILEY W, MAKUNDE R, KAWAMURA K, KOBAYASHI M, et al.** Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) in *Plasmodium falciparum*-infected Placenta. *Placenta* 2001; 22: 573-579.

[32] **MAUBERT B, GUILBERT LJ, DELORON P.** Cytoadherence of *Plasmodium falciparum* to Intercellular adhesion molecule 1 and chondroitin-4-sulfate expressed by the syncytiotrophoblast in the human placenta. *Infect Immun* 1997; 65 (4): 1251-1257.

[33] **MAUBERT B, FIEVET N, TAMI G, BOUDIN C, DELORON P.** Cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in the human placenta. *Parasit Immunol* 2000; 22: 191-199.

[34] **LYALL F, GREER IA, BOSWELL F, YOYNG A, MADARA LM, JERRERS MD.** Expression of cell adhesion molecules in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth retardation. *Placenta* 1995; 16: 579-587.

4- DISCUSSÃO

A vilosite caracteriza-se pela presença do infiltrado inflamatório no estroma da vilosidade placentária (Fox, 1997) e, independente da etiologia, este infiltrado é formado principalmente por um grande número de histiócitos e linfócitos T (Kapur et al., 2004; Altemani et al., 2000; Nakamura et al., 1994; Altemani, 1992; Labarrere et al., 1990).

Com relação ao subtipo de linfócito T predominante, Labarrere et al. (1990) e Nakamura et al. (1994), relataram que estes são principalmente do subtipo CD4+ (linfócitos T auxiliares). Entretanto, recentemente, contradizendo estes dados, tanto Kapur et al. (2004) trabalhando com VED como Altemani et al. (2000) estudando vilosite chagásica detectaram predomínio de linfócitos do subtipo CD8+ (linfócitos T supressores/citotóxicos) em ambos tipos de lesões.

Num trabalho anterior deste grupo, através de imunoistoquímica em placentas fixadas em formalina e embebidas em parafina, analisou-se o imunofenótipo das células inflamatórias em vilosites causadas por *T. cruzi*, *T. gondii* e de etiologia desconhecida. Verificou-se que o infiltrado inflamatório estava predominantemente constituído por histiócitos HAM 56+ e linfócitos T com um predomínio de linfócitos CD8+ em relação aos linfócitos CD4+. Os linfócitos B não foram identificados ou estavam presentes em quantidade insignificante (<2%) no infiltrado inflamatório em todos os casos de vilosite analisados. Na maioria dos casos, o infiltrado exibia ainda uma pequena quantidade de células NK, histiócitos MAC 387+, granulócitos e células positivas para a proteína S-100 (Brito et al., 2005). Nosso trabalho atual com vilosites de diversas etiologias corrobora esses dados previamente descritos além de verificar que, no espaço interviloso, a maioria das células era composta por monócitos MAC 387+ seguidos por granulócitos CD15+.

Os nossos achados confirmam que tanto vilosite infecciosa como de etiologia desconhecida podem apresentar composição imunofenotípica semelhante em relação ao infiltrado inflamatório. Acreditamos que esta semelhança poderia estar de acordo com as duas hipóteses previamente formuladas: a) a VED é também de origem infecciosa, porém o agente não é detectável pelos métodos usuais e b) na vilosite infecciosa há sobreposição de resposta imune materna, de tal modo que ela pode se tornar indistinguível da VED após curto tempo de evolução.

Alguns estudos têm sugerido que as células inflamatórias na vilosite são de origem materna (Kapur et al., 2004, Rediline e Patterson, 1993). Para que estas células alcancem o estroma viloso, elas teriam que aderir ao sinciciotrofoblasto e subsequentemente atravessá-lo, rompendo a barreira trofoblástica. Assim, o sinciciotrofoblasto estaria diretamente envolvido na adesão e migração das células maternas para o estroma viloso (Labarrere et al., 2005).

Esta possível função do sinciciotrofoblasto é semelhante à do endotélio que reveste os vasos. Nestes, sabe-se que as células inflamatórias são capazes de atravessá-lo para alcançarem o sítio de inflamação (Imhof e Aurrand-Lions, 2004; Abbas e Lichtman, 2003). Este processo é complexo e envolve a participação de diversas moléculas de adesão como selectinas e integrinas. ICAM-1 (molécula 1 de adesão intercelular), uma glicoproteína ligada à membrana, é um dos ligantes para a integrina LFA-1, encontrada em leucócitos (Springer, 1990). ICAM-1 é expressa pelas células endoteliais vasculares e contribui para uma adesão forte e, transmigração desses leucócitos para os sítios inflamados (Bevilacqua, 1993). Várias citocinas pró-inflamatórias, entre elas interleucina-1, $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ induzem a expressão de ICAM-1 em vários tipos de células (Bevilacqua, 1993). Além de proporcionar uma adesão forte entre células, a molécula de ICAM-1 origina um gradiente hapotótico, ou seja, promovem uma migração do leucócito em direção à regiões com maior concentração de ICAM-1, direcionando-o para a junção endotelial e, conseqüentemente, facilitando a diapedese (Schenkel et al., 2004).

Apesar do amplo conhecimento adquirido no processo de transmigração celular no endotélio, até então, pouco se conhecia com relação ao processo no trofoblasto viloso. Estes estudos baseavam-se em experimentos *in vitro* que demonstraram que o sinciciotrofoblasto também é capaz de expressar em ICAM-1. Xiao et al. (1997) detectaram que esta expressão estava associada ao aumento de adesão de monócitos, além de ser dependente da concentração de citocinas. Posteriormente, Garcia Loret et al. (2000) verificaram que monócitos aderidos por LFA-1, provocavam uma ruptura focal da cultura de trofoblasto através de apoptose $\text{TNF}\alpha$ -dependente. Estes autores sugeriram que estes eventos poderiam ser considerados um mecanismo possível na patogenia da vilosite, pois a perda focal da barreira trofoblástica poderia ser uma rota para a infiltração de leucócitos

para dentro da vilosidade placentária. Corroborando com esta hipótese, vilosidades não inflamadas aparentemente não expressam ou expressam em menor quantidade moléculas de ICAM-1 (Labarrere et al., 2005; Sartelet et al., 2000; Maubert et al., 2000).

Na literatura, pela primeira vez, nossos trabalhos e o de Labarrere et al (2005) mostraram quase que simultaneamente a super-expressão de ICAM-1 no sinciciotrofoblasto de vilosidades inflamadas em cortes histológicos. Nos nossos casos, a expressão de ICAM-1 ocorreu quase que exclusivamente nas vilosidades inflamadas e ela estava localizada principalmente em trechos do sinciciotrofoblasto adjacentes à perda da barreira trofoblástica e associada com aderência de células mononucleares.

A expressão de moléculas de adesão no sinciciotrofoblasto da placenta humana tem algumas implicações relevantes. Patógenos que são capazes de cruzar a barreira trofoblástica podem induzir uma reação inflamatória e ativação de células imunes com a liberação de citocinas pró-inflamatórias dentro do estroma viloso. A alta concentração destas citocinas neste local poderia levar ao aumento da expressão de ICAM-1 pelo trofoblasto permitindo uma infecção direta do trofoblasto ou a migração das células maternas infectadas para dentro do estroma viloso (Labarrere et al., 2005; Pfaff et al., 2005). A expressão de ICAM-1 pelo sinciciotrofoblasto poderia também permitir uma adesão forte dos leucócitos maternos mononucleares ao trofoblasto, o que facilitaria o seu dano, migração celular, reconhecimento alogênico ou reação de rejeição aos tecidos fetais (Labarrere et al., 2005).

De acordo com nossos achados, uma das consequências do influxo de monócitos, linfócitos e granulócitos, na vilosidade, é o aumento da inflamação vilosa, o qual, por sua vez, aumenta a destruição do parênquima placentário. Porém, como em todos os nossos casos a vilosidade estava em um estágio tardio, não nos foi possível analisar se a expressão de ICAM-1 teve participação no surgimento da vilosidade e/ ou na passagem do agente infeccioso (*T. cruzi* e *T. gondii*) através do trofoblasto viloso.

Estudos recentes com cultura de trofoblasto envolvendo infecção placentária causada por HIV-1 e citomegalovírus humano mostraram aumento da expressão de ICAM-1, sugerindo que a interação trofoblasto-ICAM-1 poderia também ser importante

para a transferência do agente infeccioso pela barreira placentária (Chan et al., 2004; Arias et al., 2002).

Outro achado interessante do nosso estudo foi que o aumento da expressão de ICAM-1 pelo trofoblasto nos casos com inflamação intervilar provocada por *P. brasiliensis*. Aparentemente, a placenta é uma barreira efetiva contra este fungo, que permanece no espaço intervilar circundado principalmente por macrófagos/ monócitos e neutrófilos, sem envolvimento do estroma viloso. Nos nossos casos, somente a vilosidade localizada próxima à reação inflamatória intervilar mostrava necrose do trofoblasto e aumento da expressão de ICAM-1 pelo sinciciotrofoblasto residual. Esses achados sugerem que macrófagos e monócitos ativados pelos fungos no espaço intervilar produzem citocinas pró-inflamatórias, as quais induziriam o aumento da expressão de ICAM-1 no sinciciotrofoblasto. A natureza localizada da perda da barreira trofoblástica, ou seja, somente na vilosidade localizada próxima a resposta inflamatória desencadeada pelo fungo no espaço intervilar reforça os achados reportados por Garcia-Lloret et al. (2000) em cultura de trofoblasto. Estes autores mostraram que o dano do trofoblasto provocado pelos monócitos aderidos é um efeito local proporcional ao número de células na área da lesão. Nos nossos casos com intervilosite por *P. brasiliensis*, a ausência de influxo de células imunes para dentro da vilosidade, apesar da ruptura da barreira trofoblástica, é um outro achado interessante, uma vez que questiona o papel do sinciciotrofoblasto como “barreira” que previne o estroma viloso da invasão de células maternas. Este fato é provavelmente devido à alta concentração de moléculas inflamatórias no espaço intervilar, mas não dentro da vilosidade, como uma consequência da infecção pelo agente neste local (Sartelet et al., 2000; Sugiyama et al., 2001).

À semelhança do *P. brasiliensis*, o parasita *P. falciparum* também provoca alterações no espaço intervilar (intervilosite) mas não invade o estroma das vilosidades coriais (Ordi et al., 1998). No espaço intervilar, o *P. falciparum* é circundado por agregados de eritrócitos, depósito de fibrina perivilar e macrófagos/ monócitos porém, sem influxo de células imunes maternas para dentro da vilosidade (Ordi et al., 1998). Essas placentas, do mesmo modo que aquelas com intervilosite por *P. brasiliensis*, também podem mostrar aumento da expressão de ICAM-1 no sinciciotrofoblasto, nos monócitos e em outras células (Sugiyama et al., 2001; Sartelet et al., 2000)

Baseados nos nossos achados, acreditamos que o aumento da expressão de ICAM-1 pelo trofoblasto viloso pode ser provocado pela inflamação infecciosa tanto vilosa como intervilar. Entretanto, esta super-expressão não está necessariamente associada ao influxo de células inflamatórias para o interior da vilosidade, embora provavelmente exerça um papel importante na ruptura da barreira trofoblástica. Apesar do influxo de células imunes para a vilosidade ser aparentemente mediado por ICAM-1, a localização do antígeno dentro do estroma viloso é certamente um fator crucial para que isto ocorra. As figuras 2 e 3 ilustram as nossas hipóteses:

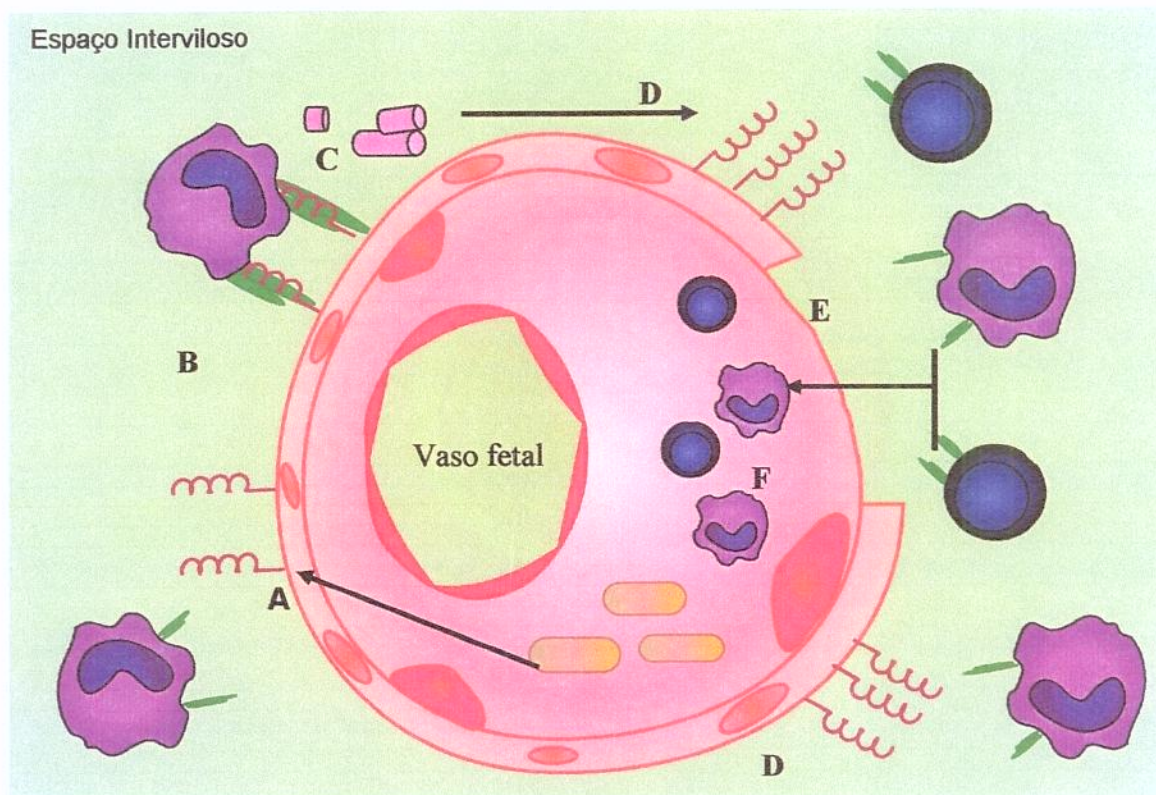


Figura 2: Expressão de ICAM-1 na vilosite: Antígenos paternos ou provenientes de microrganismos desencadeiam um processo inflamatório local que leva a expressão de ICAM-1 pelo trofoblasto (A). Células maternas (monócitos/ macrófagos) no espaço intervilar se ligam a molécula de ICAM-1 (B). Elas liberam citocinas, entre elas TNF- α (C) que aumentam ainda mais a expressão de ICAM-1 (D) e provocam necrose do trofoblasto (E). A perda da barreira trofoblástica permite que as células inflamatórias migrem, seguindo um gradiente de concentração de quimiocinas, para o estroma viloso (F).

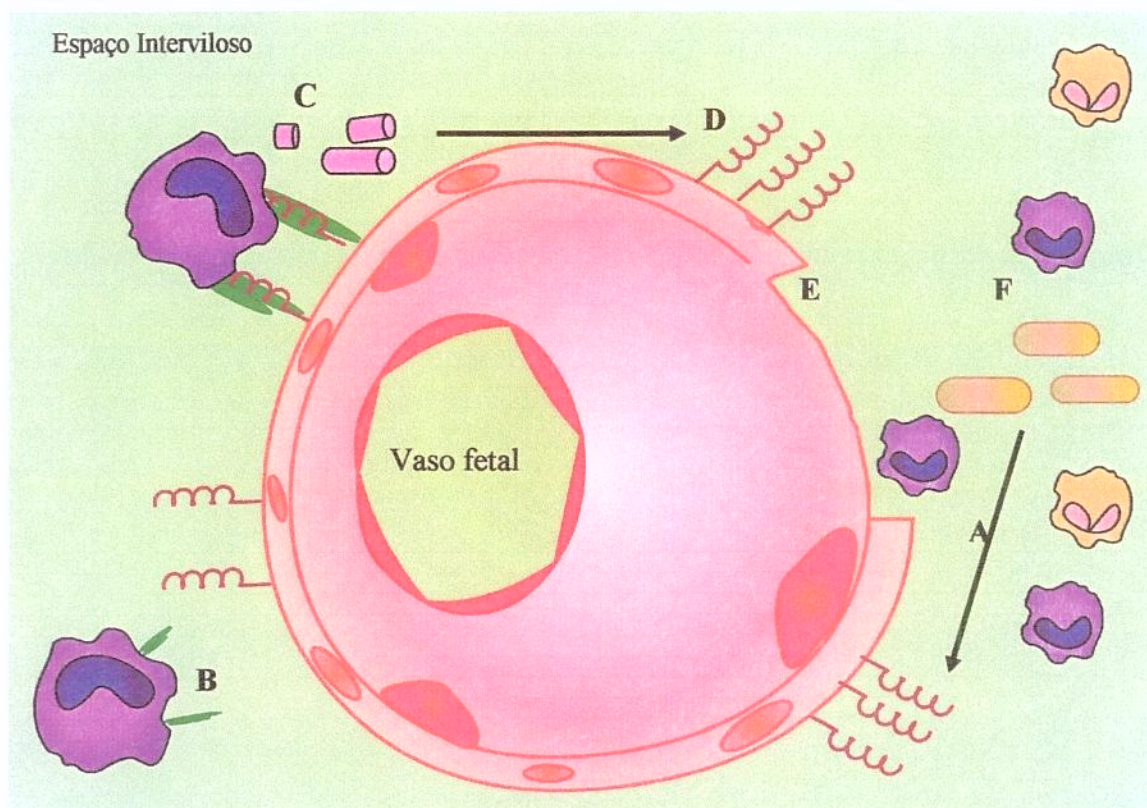


Figura 3: Expressão de ICAM-1 na intervillosite: Antígenos provenientes do *P. brasiliensis* desencadeiam um processo inflamatório intervilloso que leva a expressão de ICAM-1 pelo trofoblasto das vilosidades vizinhas (A). Os monócitos/ macrófagos maternos no espaço intervilloso se ligam a molécula de ICAM-1 (B). Estas células liberam citocinas, entre elas TNF- α (C) que levam à maior expressão de ICAM-1 (D) e necrose do trofoblasto (E). Apesar da perda da barreira trofoblástica, não há migração de células inflamatórias para o estroma viloso, uma vez que a grande concentração de quimiocinas está fora da vilosidade (F).

5- CONCLUSÃO

- (A) Tanto em vilosite de etiologia conhecida, desconhecida como intervilosite há expressão anormal de ICAM-1 na superfície do sinciciotrofoblasto da vilosidade inflamada.
- (B) A expressão anormal de ICAM-1 ocorre predominantemente em áreas adjacentes à ruptura trofoblástica e está associada à aderência de leucócitos, que são principalmente monócitos.
- (C) Apesar da expressão de ICAM-1 ocorrer em áreas de ruptura trofoblástica (tanto em vilosites como em intervilosites), a localização do antígeno é crucial para que ocorra influxo das células imunes maternas para o estroma da vilosidade inflamada, pois nos casos de intervilosite, mesmo com a perda da barreira trofoblástica, os leucócitos maternos permanecem no espaço interviloso.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. Fifth edition. Philadelphia: Saunders; 2003.

Adrian UH Von, Mackay CR. T-cell function and migration: two sides of the same coin. *New Engl J Med* 2000; 343: 1020-32.

Altemani A, Andrade LLA, Brenelli MA, Grassioto OR, Bacha AM. Vilosite placentária: correlação anatomo-clínica. *J Pediat (Rio J)* 1982; 52: 315-8.

Altemani A, Fassoni A, Marba S. Cord IgM levels in placentas with villitis of unknown etiology. *J Perinat Med* 1989; 17: 465-8.

Altemani A. Immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate in villitis of unknown etiology: a qualitative and quantitative analysis. *Pathol Res Pract* 1992; 188: 303-9.

Altemani A, Bitterncourt AL, Lana AM. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chaga's disease: a qualitative and quantitative analysis. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62: 319-24.

Altemani A, Gonzatti A, Metze K. How many paraffin blocks are necessary to detect villitis? *Placenta* 2003; 24(1): 116-7.

Altshuler G. Placental villitis of unknown etiology: harbinger os serious disease. A four month experience of nine cases. *J Reprod Med* 1973; 11: 215-22.

Altshuler G, Russel P. The human placental vilitides: a review of chronic intrauterine infection. *Curr Top Pathol* 1975; 60: 63-112.

Arias RA, Munõz LD, Fernandes AM. Transmission of HIV-1 infection between trophoblast placental cells and T-cells take place via an LFA-1 mediated cell to cell contact. *Virology* 2002; 307: 266-77.

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

Bernirschke K, Coen R, Patterson B, Key T. Villitis of known origin: varicella and toxoplasma. *Placenta* 1999; 20: 395-9.

- Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 767-804.
- Bittercourt AL. Possible risk factors for vertical transmission of chaga's disease. *Rev Inst. Med. Trop. São Paulo* 1992; 34(5): 403-8.
- Blotta MHSL, Altemani AM, Amaral E, Silva LJ, Camargo ZP. Placental involvement in Paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol* 1993; 31:249-57.
- Braga LFCO, Kasting G, Franke HJ. Placentite intervillosa paracoccidioidomicótica. *Rev. Bras. Ginecol.Obstet* 1989; 6: 117-120.
- Brecroft DM, Thompson JM, Mitchell EA. Placental villitis of unknown origin: Epidemiologic associations. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 264-71.
- Brito H, Juliano P, Altemani C, Altemani A. Is the immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate helpful in distinguish villitis of unknown etiology from non-specific infection villitis? *Placenta* 2005; 26: 839-41.
- Carvalho MGF, Montenegro MR. Experimental paracoccidioidomycosis in hamsters (*Mesocricetus auratus*): gestational interactions. *Mycopathol* 1999; 145(2): 81-87.
- Chan G, Stinski MF, Guilbert LJ. Human cytomegalovirus-induced upregulation of intercellular cell adhesion molecule-1 on villous syncytiotrophoblasts. *Biol Reprod* 2004;797-803.
- Engelhardt B, Wolburg H. Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol* 2004; 34:2955-63.
- Fox H. Infections and inflammatory lesions of the placenta. In: Fox H. Major problems in pathology - Pathology of the placenta. Second edition. London: Saunders; 1997. v.7. p. 294-343.
- Franco M, Mendes RP, Moscardi-BacchiM, Rezkallah-Iwasso m, Montenegro MR. Paracoccidioidomycosis. In: Balliere's clinical tropical medicine and communicable diseases. 1989. v.4. p. 185-220.

Garcia-Lloret MI, Winkler-Lower B, Guilbert LJ. Monocytes adhering by LFA-1 to placental syncytiotrophoblasts induce local apoptosis via release of TNF- α . A model for hematogenous initiation of placental inflammations. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 903-8.

Gersell DJ, Kraus FT. Diseases of the Placenta. In: Blaustein's Pathology of the female genital tract, fifth ed, New York, Springer-Verlag, 2000.

Imhof BA, Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Immunol*; 2004, 4: 432-44.

Kapur P, Rakheja D, Gomez AM, Sheffield J, Sanchez P, Rogers BB. Characterization of inflammation in syphilitic villitis and villitis of unknown etiology. *Pediatr Dev Pathol* 2004; 7(5): 453-8.

Knox WF, Fox H. Villitis of unknown aetiology: its incidence and significance in placentae from a british population. *Placenta* 1984; 5: 395-402.

Labarrere C, Althabe O, Telenta M. Chronic villitis of unknown aetiology in placentae of idiopathic small for gestational age infants *Placenta* 1982; 3:309-18.

Labarrere C, Catoggio LJ, Mullen EG, Althabe EG, Althabe OH. Placental lesions in maternal autoimmune diseases. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1986; 12:78-86.

Labarrere CA, McIntyre JA, Falk WP. Immunohistologic evidence that villitis in human normal term placenta is an immunologic lesion. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 515-22.

Labarrere C, Faulk WP, Maternal cells in chorionic villi from placentae of normal and abnormal pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 1995; 33:54-9.

Labarrere CA, Ortiz AM, Sosa MJ, Campana GL, Wernicke M, Baldridge, LA, et al. Syncytiotrophoblast intercellular adhesion molecule-1 expression in placental villitis of unknown cause. *Am J Obst Gynecol* 2005; 193: 483-8.

Lebedeva T, Dustin M, Sykulev Y. ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 2005; 17:251-8.

Ley K, Kansas, GS. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:1-11.

- Lyall F, Greer IA, Boswell F, Yoynig A, Madara LM, Jerrers MD. Expression of cell adhesion molecules in placenta growth retardation. *Placenta* 1995; 16: 579-87.
- Maubert B, Guilbert LJ, Deloron P. Cytoadherence of *Plasmodium falciparum* to intercellular adhesion molecule 1 and chondroitin-4-sulfate expressed by the syncytiotrophoblast in the human placenta. *Infect Immunol* 1997; 65(4): 1251-7.
- Mortimer G, MacDonald DJ, Smeeth A. A pilot study of the frequency and significance of placental villitis. *J Obst Gynaecol* 1985; 92:629-33.
- Nakamura Y, Sakuma S, Kawano K, Hashimoto T. Detection of the human cytomegalovirus gene in placental chronic villitis by polymerase chain reaction. *Hum Pathol* 1994; 25(8): 815-8.
- Ordi J, Imai MR, Ventura PJ, Kahigwa E, Hirt R, Cardesa A, et al. Massive chronic intervillitis of the placenta associated with malarial infection. *Am Surg Pathol* 1998; 22: 1006-11.
- Patarroyo M, Prieto J, Rincon J, Timonen T, Lundberg C, Lindbom L, et al. Leukocyte-cell adhesion: A molecular process fundamental in leukocyte physiology. *Immunol Rev* 1990; 114: 67-107.
- Pfaff A, Georger S, Abou-Bacar A, Letscher-Bru V, Klein JP, Mousli M, et al. *Toxoplasma gondii* regulates ICAM-1 mediated monocytes adhesion to trophoblast. *Immunol Cell Biol* 2005; 83: 483-9.
- Redline RW, Abramowsky CR. Clinical and pathologic aspects of recurrent placental villitis. *Hum Pathol* 1985; 16: 727-31.
- Redline RW, Patterson P. Villitis of unknown etiology is associated with major infiltration of fetal tissue by maternal inflammatory cells. *Am J Pathol* 1993; 143: 473-9.
- Redline WR, O'Riordan MA. Placental lesions associated with cerebral palsy and neurologic impairment following term birth. *Arch. Pathol Lab Med* 2000; 124: 1785-91.
- Russel P. Inflammatory lesions of the human placenta. II villitis of unknown etiology in perspective. *Am J Diagn Gynecol Obst* 1979; 1: 339-46.

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

Russel P. Infections of the placental villi (villitis). In: Fox H, Wells A. Haynes and Taylor Obstetrical and Gynaecological Pathology. Fourth edition. New York: Churchill Livingstone; 1995. v.2. p.1541-58.

Sartelet H, Garraud O, Rogier C, Sartelet IM, Kaboret Y, Michel G, et al. Hyperexpression of ICAM-1 and CD36 in placentas infected with *Plasmodium falciparum*: a possible role of these molecules in sequestration of infected red blood cells in placentas. *Histopathol* 2000, 36(1): 62-8.

Schenkel AR, Mamdouh Z, Muller WA. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol* 2004; 5: 393-400.

Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346(6283): 425-34.

Sugiyama T, Cuevas LE, Bailey W, Makunde R, Kawamura K, Kobayashi M. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in *Plasmodium*-infected placenta. *Placenta* 2001; 22: 573-9.

Xiao J, Garcia-Lloret M, Winkler-Lowen B, Miller R, Simpson K, Guilbert LJ. ICAM-1-mediated adhesion of peripheral blood monocytes to the maternal surface of placental syncytiotrophoblasts: implications for placental villitis. *Am J Pathol* 1997; 150: 1845-60.

Yavuz E, Aydin F, Seyhan A, Topuz S, Karagenc Y, Tuzlali S, et al. Granulomatous villitis formed by inflammatory cells with maternal origin: a rare manifestation type of placental toxoplasmosis. *Placenta Em publicação* 2005