

VALQUÍRIA ROVERAN

**EXPRESSÃO LOCAL DO FATOR DE NECROSE
TUMORAL ALFA (TNF- α) NA RUPTURA
PREMATURA DE MEMBRANAS**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Santa
Casa de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Medicina**

SÃO PAULO

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

VALQUÍRIA ROVERAN

**EXPRESSÃO LOCAL DO FATOR DE NECROSE
TUMORAL ALFA (TNF- α) NA RUPTURA
PREMATURA DE MEMBRANAS**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Santa
Casa de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Medicina**

Área de Concentração: Tocoginecologia

Orientadora: Profa. Dra. Mônica López Vázquez

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Antonieta Longo Galvão Silva

SÃO PAULO

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central da
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

Roveran, Valquíria

Expressão local do fator de necrose tumoral (TNF- α) na ruptura de membranas./ Valquíria Roveran. São Paulo, 2008.

Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-graduação em Medicina.

Área de Concentração: Tocoginecologia

Orientador: Mônica López Vázquez

Co-Orientador: Maria Antonieta Longo Galvão Silva

1. Ruptura prematura de membranas fetais 2. Citocinas 3. Fator de necrose tumoral alfa 4. Sistema imune 5. Gravidez/imunologia

BC-FCMSCSP/20-08

Dedicatória especial

Ao meu eterno mestre Professor Doutor José Júlio de Azevedo Tedesco, que me acompanhou durante todo o aprendizado de Obstetrícia.

Iniciamos juntos este trabalho, mas a Vontade Divina não esperou sua conclusão em conjunto.

Para mim, restou no coração muita saudade e na mente o dever de finalizar esta tarefa com êxito;

Para ti, fica a certeza de que não está entre nós porque cumpriu sua missão nesta vida.

Agradeço ter compartilhado sua presença na Terra.

Dedico também este trabalho a:

Meus pais, Walter e Marlene, pelo seu apoio constante em meus estudos e seu esforço para a minha formação acadêmica;

Meu amado esposo Sadi Fernando, por sua presença confortadora nos momentos difíceis e exultante nas conquistas; acima de tudo pelo amor demonstrado nas ações e não apenas nas palavras;

Meus queridos filhos Ivan e Igor, que tentam compreender porque mamãe não está sempre com vocês, e que sempre me recebem com abraços apertados.

Se eu pudesse deixar algum presente a você,
Deixaria aceso o sentimento
De amar a vida dos seres humanos.
A consciência de aprender
Tudo o que foi ensinado pelo tempo afora...
Lembraria os erros que foram cometidos
Para que não mais se repetissem.
A capacidade de escolher novos rumos.
Deixaria para você, se pudesse,
O respeito àquilo que é indispensável:
Além do pão, o trabalho.
Além do trabalho, a ação.
E, quando tudo mais faltasse, um segredo:
O de buscar no interior de si mesmo
A resposta e a força para encontrar a saída.

(Mahatma Ghandi)

Meus agradecimentos especiais para:

Minha cara Professora Doutora Mônica López Vázquez, por aceitar o desafio de enfrentar comigo esta batalha;

Minha querida Professora Doutora Maria Antonieta Longo Galvão Silva, por sua recepção calorosa e sua paciência e disposição constantes.

Meu querido mestre Professor Doutor Sebastião Piato, por seus ensinamentos desde o início de minha vida acadêmica até hoje, e, principalmente, por ter me acolhido como discípula.

Meus sinceros agradecimentos para:

O Prof. Dr. Tsutomu Aoki, diretor do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia (DOGi) da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pelo incentivo ao aprimoramento acadêmico de minha pessoa e de todo o corpo clínico;

O Dr. João Marcelo Guedes, chefe do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital São Luiz Gonzaga, por seu apoio constante;

O Prof. Dr. Dino Martini Filho, diretor do Departamento de Anatomia Patológica da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pela plena colaboração;

O Prof. Dr. Antônio Pedro Flores Auge, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, pelo total apoio e pelo incentivo;

A Profa. Dra. Maria Irma Seixas Duarte, responsável pelo Laboratório de Moléstias Transmissíveis da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela presteza e cuidados na realização das reações de imunoistoquímica;

A amiga Lilian de Paiva Rodrigues, por sua dedicação à Obstetrícia do DOGi, pelo incentivo sempre presente e pelo ombro sempre disponível;

Os Professores Doutores Roseli Mieko Yamamoto Nomura, Venina Isabel Poço Viana Leme de Barros e Luiz Cláudio Bussamra , por sua valiosa contribuição na correção deste trabalho, por ocasião da aula de qualificação;

Os amigos Lúcia Yamano, Kasue Suely Omae, Irineu Wrajntaub e Adriana Ribeiro dos Santos, pelo auxílio na seleção de pacientes para este estudo;

Os funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica, em particular a Sra. Esmeralda, pela contribuição na parte tecnológica do trabalho;

O estatístico Prof. Dr. Ulysses Dória Filho, por seus esclarecimentos e ajuda na análise deste trabalho;

A Secretaria da Pós-Graduação, especialmente as Sras. Priscile e Celina, pela paciência e consideração;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa para a pesquisa;

A Biblioteca da Faculdade, na pessoa da Srta. Sadia, por seu auxílio quanto à bibliografia;

As funcionárias do Centro de Estudos Ayres Netto (CEAN), Amanda, Liamara e Ana, por todo o auxílio prestado;

As secretárias Marta, Ruver e Lilian, por sua disponibilidade e receptividade;

Meus colegas de trabalho, que me proporcionaram tempo para me dedicar ao Curso de Pós-graduação;

Todos os residentes e estagiários do DOGi, que me auxiliaram na coleta dos dados;

As funcionárias do Pronto Socorro e do Centro Obstétrico do DOGi, pela dedicação ao trabalho;

As pacientes envolvidas neste estudo, que depositaram confiança na minha pessoa;

A Divindade, acima de tudo, que permitiu que eu trilhasse o caminho por mim escolhido.

ABREVIATURAS:

C – complemento

DOGi – Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

ELISA – *enzyme-linked immnosorbent assays*

HE – hematoxilina e eosina

IFN – interferon

IL – interleucina

ISCMSP – Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

kD – quilo-Dalton

LSAB - streptavidina-biotina-peroxidase lábil

RPM – ruptura prematura de membranas

Rs – coeficiente de correlação de Sberman

TNF – fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*)

TNFR – receptor do fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. Introdução-----	1
1.1. Resposta imune humana-----	5
1.2. Fator de necrose tumoral alfa-----	8
1.3. Revisão da literatura-----	10
2. Objetivos-----	15
3. Metodologia-----	17
3.1. Material-----	18
3.1.1. Caracterização da população estudada-----	20
3.2. Método-----	21
3.2.1. Exame histopatológico-----	21
3.2.2. Método imunoistoquímico-----	26
3.3. Análise estatística-----	31
4. Resultados-----	32
4.1. Expressão do TNF- α nos Grupos Controle e Estudo-----	33
4.2. Expressão do TNF- α no Grupo Estudo consoante o grau de corioamnionite e o tempo de ruptura das membranas-----	34
5. Discussão-----	36
6. Conclusões-----	44
7. Anexos-----	46
Anexo 1. Dados gerais das pacientes incluídas no Grupo Estudo-----	47
Anexo 2. Dados gerais das pacientes incluídas no Grupo Controle-----	48
Anexo 3. Parecer do Comitê Científico-----	49
Anexo 4. Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa -----	50
Anexo 5. Termo de consentimento -----	51
8. Fontes consultadas-----	53
9. Referências bibliográficas-----	55
10. Resumo -----	62
11. Abstract-----	64

A ruptura prematura de membranas (RPM), definida como efração espontânea do âmnio e do cório antes do início do trabalho de parto, independentemente da idade gestacional (Gunn et al, 1970; Pinheiro, 1989; Romero et al, 1992; Bertini et al, 2000; Medina & Hill, 2006), é complicação obstétrica que expõe a gestante e o concepto a elevados riscos. Apontada por Larsen (1979) como prelúdio de mortalidade perinatal, a RPM ainda é descrita como problema enigmático e controverso em Obstetrícia (Bertini et al, 2000; Fonseca, 2007).

A literatura apresenta dados divergentes em relação à incidência da RPM, com taxas que variam entre 2% e 17% na literatura estrangeira (Calkins, 1952; Breeze, 1961; Lebhertz et al, 1961; Gunn et al, 1970; Gibbs & Blanco, 1982; Romero et al, 1992), e entre 1% e 20% na literatura nacional (Silva Filho et al, 1988; Pinheiro, 1989; Krasnochecoff, 1994; Bertini et al, 2000). Em média, considera-se a ocorrência de RPM em 10% do total de partos (Bryant-Greenwood & Millar, 2000; López-Osma & Ordoñez-Sánchez, 2006).

A etiologia ainda não é totalmente estabelecida; acredita-se ser provável a causa multifatorial (Parry & Strauss 3rd, 1998). Vários fatores de risco foram identificados, como antecedentes obstétricos de RPM e parto pré-termo, tabagismo, desnutrição, raça negra, inserção baixa da placenta, história pregressa de cerclagem, sangramento vaginal, gestação múltipla, polidramnia e algumas doenças maternas (Hadley et al, 1990; Harger et al, 1990; Polzin & Brady, 1998; Lee & Silver, 2001; Medina & Hill, 2006).

Admite-se hoje ser sua etiologia relacionada à infecção bacteriana (Bertini et al, 2000). Verificou-se alta incidência de resposta inflamatória nas membranas de parturientes com RPM, em comparação às com ruptura oportuna no intraparto (Naeye & Peters, 1980); relatou-se cultura positiva no líquido amniótico de gestações com RPM em 30% dos casos (Romero et al, 1992).

A RPM é responsável por aproximadamente 20% dos óbitos perinatais (Bryant-Greenwood & Millar, 2000; Golino et al, 2006). Tal risco de perdas do concepto correlaciona-se com o fato de que se trata de entidade obstétrica que comumente se faz acompanhar de complicações maternas e fetais, especialmente prematuridade e quadros infecciosos (Amed & Camano, 2003; Torrens et al, 2005; Mercer, 2005; Medina & Hill, 2006).

Esta complicação obstétrica constitui o principal fator causal de prematuridade espontânea (Amed & Camano, 2003); responde por aproximadamente 30 a 40 % dos partos prematuros (Bryant-Greenwood & Millar, 2000; Golino et al, 2006).

Tendo em vista o propósito do presente estudo, serão analisados, a seguir, os principais aspectos relacionados com a infecção das membranas ovulares.

O aparecimento de infecção (corioamnionite) deve-se ao fato de que a ruptura das membranas resulta na perda da barreira que impede a ascensão de microorganismos patogênicos presentes no trato genital inferior, especialmente *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Streptococcus agalactie*, através

do canal cervical (Garite, 1994; Rivera Z. et al, 2004; Newton, 2005; Torrens et al, 2005). Cabe assinalar, contudo, que a inflamação das membranas pode anteceder a sua ruptura, conforme referido (Naeye & Peters, 1980; Mercer, 2005; Newton, 2005).

O risco de corioamnionite eleva-se com o prolongamento do período de latência (Bertini et al, 2000; Rocha et al, 2002; Golino et al, 2006). Este é definido como o intervalo entre a ocorrência da ruptura das membranas e o início do trabalho de parto. Alguns autores estabeleceram intervalo mínimo entre uma e 12 horas (Breeze, 1961; Garite, 1994). O período de latência varia em razão inversa à idade gestacional (Bertini et al, 2000; Amed & Camano, 2003; Fonseca, 2007).

Encontrou-se correlação entre o aumento do período de latência e a presença de corioamnionite, comprovada histologicamente (McElrath et al, 2003). Relatou-se desenvolvimento desta complicação infecciosa em 9% dos casos de RPM a termo, com aumento da incidência para 24% após 24 horas de ruptura (Gunn et al, 1970). Verificou-se, ainda, que o prolongamento do tempo de ruptura foi um dos principais fatores preditivos para a presença de febre materna no intraparto (Maayan-Metzger et al, 2006).

Observou-se, outrossim, que o risco de corioamnionite é inversamente proporcional ao tempo de gestação no momento da ruptura (Rocha et al, 2002; Mercer, 2005; Newton, 2005). Apontaram-se índices de infecção intra-amniótica de 2% em gestações a termo, de 15% naquelas entre 28 e 36 semanas e de 41% em idade gestacional abaixo de 27 semanas (Newton, 1993). Outra investigação, na qual procurou-se correlacionar o período de latência superior a 24 horas com o

aparecimento de corioamnionite, consoante a idade gestacional, constatou maior prevalência em gestações pré-termo (Krohn & Hitti, 1998).

A suscetibilidade para o aparecimento da infecção das membranas após sua ruptura relaciona-se, do mesmo modo que ocorre nos demais processos infecciosos, com a imunocompetência do organismo da gestante, ou seja, com a integridade da resposta imune humana (Minkoff, 1983; Newton, 2005).

1.1 Resposta imune humana

O sistema imune é fundamental para a manutenção da vida humana, pois reconhece o que lhe é próprio e protege contra o que lhe é estranho, além de desenvolver memória, conferindo proteção subsequente. O reconhecimento imune do próprio organismo, essencial no desenvolvimento do sistema imune, ocorre desde a vida intra-uterina e é realizado pelo timo e pela bursa-equivalente. Este processo é mediado por códigos de glicoproteínas de superfície celular determinados pelo complexo de histocompatibilidade maior ou *human leukocyte antigen* e por imunoglobulinas de superfície (Roitt, 1999). A resposta imune humana ocorre por vários mecanismos, podendo ser inespecífica (ou inata) e específica (ou adaptativa).

A resposta inespecífica compõe-se de barreiras físico-químicas, presentes na epiderme e epitélios dos tratos gastrintestinal, urinário e respiratório, além de proteínas, como o sistema complemento, e células, como os fagócitos e células *natural killer* (Abbas et al, 2000).

Essa resposta sofre várias adaptações durante a gravidez. Há aumento da fagocitose pelos macrófagos do sistema mononuclear fagocitário e maior agressividade na ação dos fagócitos mononucleares, que se apresentam na interface feto-placentária, onde são ativados pelas linfocinas e citocinas. A atividade das células *natural killer* está diminuída, pois o soro materno parece inibir sua maturação. O sistema complemento sofre maior ativação, principalmente no sítio placentário; há aumento nas frações sistêmicas C3 e C4. Encontra-se interferon (IFN) no líquido amniótico e na placenta (Vinatier & Monnier, 1988).

A resposta específica é intermediada pelos linfócitos, classificando-se a mesma em dois tipos: imunidade humoral, mediada pelas imunoglobulinas secretadas pelos linfócitos bursa-equivalentes (linfócitos B), que podem recobrir bactérias para fagocitose ou combinar-se com toxinas bacterianas para neutralizá-las, e imunidade celular, mediada pelos linfócitos timo-dependentes (linfócitos T) que, sensibilizados, adquirem memória imunológica (Parham, 2001; Janeway, 2000; Forte, 2004).

Tal resposta imune igualmente se adapta às modificações gravídicas. A resposta celular sofre supressão, ocorrendo inibição da proliferação e ação das células T citotóxicas; também mostra predomínio da função de células T auxiliares, com maior produção de interleucinas (IL) IL-4, IL-5 e IL-10. Na resposta humoral há aumento da produção de imunoglobulinas pelos plasmócitos, embora haja diminuição no número de linfócitos B periféricos (Iwatani & Watanabe, 1998).

Faz-se necessário delicado equilíbrio entre os requisitos do feto e a resposta imune materna, para que não haja rejeição trofoblástica, e ao mesmo tempo, mantendo-se intactas as defesas contra os agentes agressores habituais (Kelly, 1994; Weetman, 1999; Trundley & Moffet, 2004).

Consideradas de grande importância na regulação da resposta imune, as citocinas são polipeptídios habitualmente ausentes no plasma em condições estéreis. As mesmas são produzidas após estimulação antigênica; podem ser sintetizadas principalmente por monócitos e macrófagos ou podem se originar de linfócitos. As citocinas atuam como mediadores na comunicação intercelular, por meio de maturação, proliferação, diferenciação, ativação ou inibição de diferentes células do sistema imunológico, aumentando ou diminuindo a resposta imune (Forte, 2004).

De acordo com suas atividades biológicas, as citocinas são classificadas em: a) pró-inflamatórias, onde exercem função de destaque a IL-1, a IL-2, o fator de necrose tumoral (TNF) e o IFN; b) das doenças alérgicas e das parasitoses, representadas por IL-4, IL-5 e IL-6; c) imunossupressoras, como as IL-10, IL-13 e IL-19; d) estimuladoras de crescimento de colônias, ou seja, IL-3, IL-7, IL-9, IL-11, IL-14 e IL-17; e) quimiocinas, onde ressalta-se a IL-8 (Forte, 2004).

Dentre as citocinas, o fator de necrose tumoral desempenha relevante papel nos processos infecciosos. De acordo com sua origem, este fator é classificado em alfa (TNF- α), antigamente conhecido pela denominação caquetina, e beta (TNF- β), antes denominado linfotóxina (Shalaby et al, 1985).

Por se tratar do objeto de estudo da presente pesquisa faremos a seguir análise da estrutura do TNF- α e de sua participação nos processos infecciosos.

1.2 Fator de necrose tumoral alfa

O TNF- α é proteína com peso molecular de 17 quilo-Daltons (kD); é composta por 157 amino-ácidos e contém uma ponte dissulfídica ligada a dois resíduos cisteínicos (Shalaby et al, 1986; Beutler & Cerami, 1988).

O fator é sintetizado principalmente por macrófagos e monócitos. O principal estímulo para a sua produção são os lipopolissacarídeos que compõem a membrana das bactérias Gram-negativas. O TNF- α é expresso na membrana citoplasmática do macrófago como um trímero de 51 kD, com forma piramidal; cada face é formada por uma subunidade de 17 kD (Abbas et al, 2000).

O TNF- α produzido liga-se a receptores específicos da membrana celular, denominados receptores de TNF (TNF-R) I e II. Estes receptores estão presentes em praticamente todas as células do nosso organismo, dos quais o tipo I parece ser o mais importante. No citoplasma, ativam uma família de proteínas denominada fatores associados aos receptores do fator de necrose tumoral (Abbas et al, 2000; Bingham 3rd, 2002).

A principal função do TNF- α é promover a resposta imune, por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los. Constitui-se no principal mediador da resposta inflamatória aguda contra

bactérias Gram-negativas e outros microorganismos (Abbas et al, 2000). A figura 1.1 representa esquematicamente as funções do TNF- α .

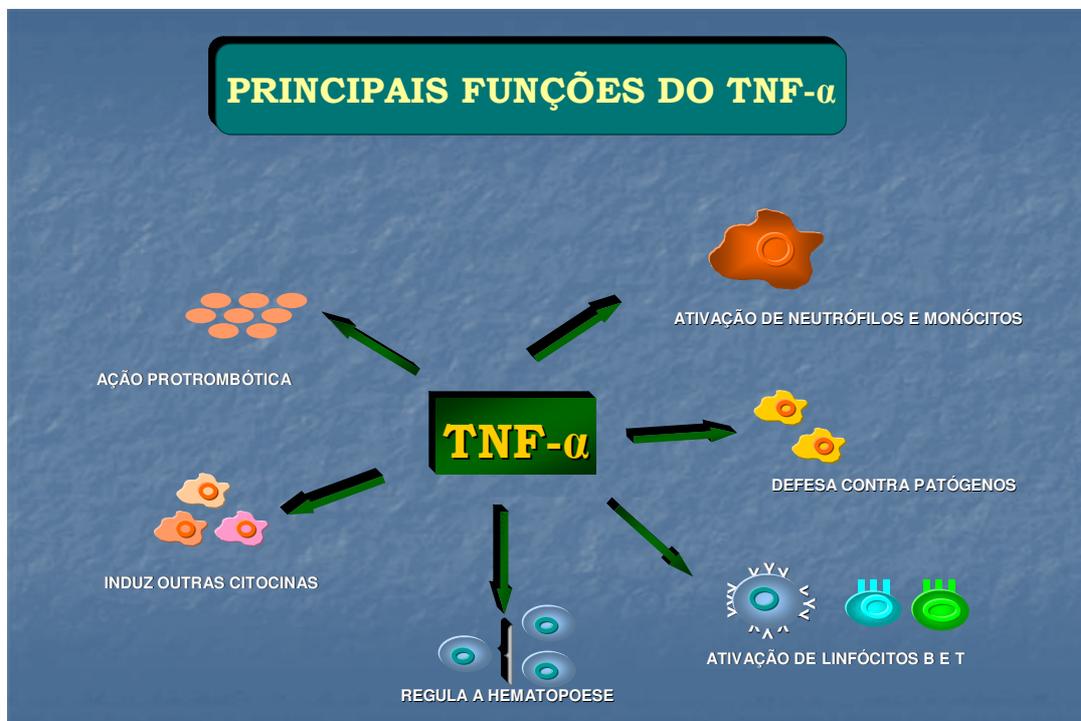


Figura 1.1. Funções do TNF- α (adaptado de Roitt, 1999).

O TNF- α age nas células endoteliais; ativa a expressão de novos receptores celulares, que irão promover a adesão de neutrófilos, monócitos e linfócitos. Também estimula as células endoteliais a secretarem as quimiocinas com ação quimiotática sobre os leucócitos (Abbas et al, 2000).

Esse fator é responsável ainda por várias complicações de infecções graves, uma vez que promove uma série de efeitos no organismo. O TNF- α age no hipotálamo onde induz febre (pirógeno endógeno), por meio do aumento de síntese de prostaglandina. No fígado estimula a produção das proteínas da fase aguda do processo inflamatório e do fibrinogênio, conjuntamente com as

interleucinas 1 e 6. Quando secretado em grande quantidade, pode desencadear ainda choque séptico, causando hipoglicemia, diminuição do tônus vascular e da contração do miocárdio, além de coagulação intravascular disseminada (Abbas et al, 2000).

Desta forma, o TNF- α tem diversas ações benéficas ao organismo quando sintetizado em quantidades moderadas; porém, acredita-se que tenha importante ação deletéria quando produzido em quantidades excessivas (Forte, 2004).

1.3 Revisão da literatura: TNF- α e RPM

Por meio de revisão da literatura, na qual buscamos estudos acerca da expressão do fator de necrose tumoral alfa em membranas com ruptura prematura, verificamos escassez dos mesmos. As primeiras investigações surgiram na década de 1990.

Beltrán Montoya et al (1997) utilizaram cultura de membranas amnióticas de casos de RPM, que foram estudadas por meio de técnicas de imunotransferência (*Western blot* e *Northern blot*) e imunoistoquímica, e identificaram TNF- α como sinal de infecção das mesmas.

Baud et al (1999) dosaram, por meio do método ELISA, IL-1, IL-6 e TNF- α no líquido amniótico de 31 gestações abaixo de 32 semanas, complicadas por corioamnionite, e encontraram correlação positiva. Observaram ainda associação

entre a presença de TNF- α e o desenvolvimento de infecção neonatal precoce grave.

Zhang et al (2000) realizaram dosagem de IL-6, IL-8 e TNF- α no soro materno e no líquido amniótico de 46 gestações com RPM e compararam com 46 gestações normais; verificaram aumento significativo de IL-6 e IL-8 séricos maternos e no líquido amniótico nos casos com RPM. Estes autores demonstraram também relação significativa entre o tempo de ruptura das membranas e o aumento das dosagens realizadas de IL-6, IL-8 e TNF- α e encontraram ainda, nos 12 casos descritos de corioamnionite, níveis elevados de IL-6, IL-8 e TNF- α .

Raghupathy et al (2001), por meio de estímulo de células mononucleares do sangue de 44 gestantes normais e 30 gestantes com RPM com células autólogas de placenta e antígenos de trofoblastos, verificaram altos níveis de TNF- α e interferon-gama (IFN- γ), dosados por meio do método ELISA, no grupo com RPM, em comparação com o grupo controle.

Menon et al (2002) demonstraram presença de apoptose nas membranas de casos com RPM e realizaram indução desta alteração com TNF- α em membranas normais.

Romero et al (2002) realizaram dosagem de metaloproteinase-9, IL-1, IL-6, TNFR I e TNFR II no plasma fetal, líquido amniótico e plasma materno de 96 casos de trabalho de parto prematuro com membranas íntegras e de 43 casos de RPM; encontraram aumento de metaloproteinase-9, porém diminuição de IL-1,

TNFR I e TNFR II no plasma fetal nas gestações com RPM em comparação aos fetos com membranas íntegras.

Shobokshi & Shaarawy (2002) quantificaram IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ e fator de crescimento epidermal no líquido amniótico de 30 gestações complicadas por RPM e de 20 gestações normais e encontraram aumento dos níveis de todas as citocinas dosadas nos casos de RPM com infecção comprovada por cultura positiva no líquido amniótico.

Dollner et al (2002) quantificaram, por meio do método ELISA, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, proteína C reativa e receptores de TNF- α no sangue de cordão umbilical de 139 partos complicados por RPM e de 82 partos sem intercorrências e relacionaram a elevação nos níveis destas citocinas com o grau histológico severo de corioamnionite.

Lonergan et al (2003) realizaram, por meio de imunistoquímica, dosagem de marcador de apoptose relacionado ao TNF- α e seus receptores de membrana (osteoprotegerinas) em 61 placentas de partos a termo, 61 placentas de partos prematuros e 69 casos de RPM, além da mesma dosagem no líquido amniótico de 13 gestações normais no segundo trimestre. Estes autores sugeriram o papel protetor das osteoprotegerinas, encontradas em abundância nas membranas durante a gestação, contra a ação do marcador de apoptose relacionado ao TNF- α , com dosagem aumentada nos partos a termo.

McElrath et al (2003) estudaram as concentrações das citocinas divididas por funções de inflamação (IL-1, IL-6 e TNF- α), quimiotaxia (IL-8), efetores endoteliais e modulação inflamatória (IL-10, TNF- β e trombomodulinas) em 30

placentas de partos de gestações com pré-eclâmpsia, RPM e parto prematuro. Encontraram maiores níveis de efetores endoteliais e citocinas de modulação inflamatória nas placentas de pré-eclâmpsia e distribuição similar de citocinas inflamatórias e moduladoras no parto prematuro e na RPM.

El-Shazly et al (2004) compararam níveis de IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-12, além de TNF- α , TNF- β e IFN- γ em 30 placentas de partos prematuros, 30 com RPM e 30 placentas de partos a termo. Estes autores encontraram aumento significativo nos níveis de IL-2, IL-12 e IFN- γ nos casos de partos prematuros e RPM, bem como verificaram níveis elevados de TNF- α , IL-4, IL-6 e IL-10 nos partos a termo.

Winkler (2005), por meio de dosagem de IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , evidenciou aumento destas citocinas no segmento inferior do útero nas gestações complicadas por corioamnionite.

Hansen-Pupp et al (2005) realizaram dosagens seriadas de IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e IFN- γ , colhidos do cordão umbilical de 74 neonatos prematuros após 6, 24 e 72 horas do parto. Estes autores verificaram, nos casos de RPM, aumento dos níveis séricos de IL-2 após 6 horas, níveis aumentados de TNF- α após 6 e 24 horas e ainda aumento do IFN- γ na dosagem após 6, 24 e 72 horas do nascimento.

Acredita-se na importância da busca por esclarecimentos sobre a fisiopatologia da ruptura prematura de membranas, principalmente no que se refere à associação desta complicação obstétrica com a presença de processos infecciosos. Assim, face à escassez de trabalhos relacionados ao tema e ao

provável envolvimento do TNF- α na presença de infecção em casos de RPM, justifica-se a realização do presente estudo.

Objetivos

O presente estudo, realizado em casos de ruptura prematura de membranas, teve como objetivos analisar:

- 1- a expressão do fator de necrose tumoral alfa em membranas ovulares;
- 2- a associação entre a expressão do fator de necrose tumoral alfa e o grau de corioamnionite;
- 3- a correlação entre a expressão do fator de necrose tumoral alfa e o tempo de ruptura das membranas.

3.1 Material

O material do presente estudo constou de membranas ovulares provenientes dos partos de 45 mulheres, que ocorreram no complexo hospitalar da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSP), constituído pelos Hospitais Central, São Luiz Gonzaga e Geral de Guarulhos, no período de julho a dezembro de 2006.

Os casos foram divididos em Grupo Estudo, no qual foram incluídas 31 parturientes que apresentaram ruptura prematura das membranas ovulares, e em Grupo Controle, formado por 14 parturientes com ruptura oportuna das membranas. Os dados gerais das mulheres de ambos os grupos são apresentados nos Anexos 1 e 2.

Em relação às 31 pacientes do Grupo Estudo, a idade gestacional encontrava-se acima de 34 semanas por ocasião da ruptura das membranas. O cálculo da idade gestacional fundamentou-se na data da última menstruação e em exame ultra-sonográfico realizado no primeiro trimestre da gravidez. Para a obtenção do diagnóstico da ruptura das membranas utilizaram-se critérios clínico, baseado na história de perda de líquido e visualização deste na cavidade vaginal ao exame especular, e laboratorial, por meio de teste descrito por lanetta et al (1984). Considerou-se ruptura prematura das membranas, a ocorrência espontânea do evento em pacientes com ausência de trabalho de parto no momento da internação.

As 14 pacientes que constituíram o Grupo Controle encontravam-se com idade gestacional acima de 37 semanas. Foram incluídas nesse grupo pacientes

internadas em trabalho de parto ou com indicação de resolução eletiva por via alta, com membranas ovulares íntegras no momento da internação. Considerou-se ruptura oportuna das membranas a ocorrência espontânea do evento durante a evolução do trabalho de parto ou a amniotomia artificial realizada no período expulsivo do parto vaginal ou durante a realização da cesárea.

Os critérios de exclusão adotados para a formação de ambos os grupos foram a presença de:

- Sinais clínicos de infecção (temperatura axilar > 37,8° C, taquicardia, fisometria e hipersensibilidade uterina);
- Doenças clínicas de repercussão sistêmica;
- Outras doenças obstétricas, excetuando-se RPM no Grupo Estudo.

Para o Grupo Controle, o achado histopatológico de corioamnionite foi considerado critério de exclusão, o que ocorreu em seis dos 20 casos iniciais, restando, portanto 14 casos incluídos neste grupo.

O estudo obteve aprovação da Comissão Científica do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da ISCMSP (Anexo 3).

De acordo aos preceitos éticos, à legislação local (Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde) e às normas internacionais, o estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido obtiveram aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMSP (Anexos 4 e 5).

3.1.1. Caracterização da população estudada

Para avaliar a homogeneidade dos grupos foram consideradas três variáveis: idade, paridade e idade gestacional. Essas variáveis estão descritas individualmente nos Anexos 1 e 2 e podem ser observadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Distribuição dos valores médios das variáveis idade (anos), paridade (número de partos anteriores) e idade gestacional (semanas) nos grupos Estudo e Controle.

	Estudo	Controle	valor de p
Pacientes	31	14	
Idade	24,2±1,0	23,3±1,7	0,615
Paridade	0,5±0,1	0,7±0,3	0,804
Idade gestacional	38,1±0,3	39,7±0,3	0,002

Em relação à distribuição dos grupos Controle e Estudo quanto à idade, observa-se não haver diferença estatisticamente significativa entre os mesmos ($p=0,615$). A média das idades foi de 24,2 anos no Grupo Estudo e 23,3 anos no Grupo Controle, com desvios-padrões de 1,0 e 1,7, respectivamente.

Os grupos mostraram-se homogêneos quanto ao número de partos progressos ($p=0,804$). O Grupo Controle apresentou média de 0,7 partos e o Grupo Estudo média de 0,5 partos, com desvios-padrões de 0,1 e 0,3, respectivamente.

No que se relacionou com a idade gestacional, o Grupo Estudo apresentou diferença em relação ao Grupo Controle, com média de 38,1 e 39,7 semanas respectivamente, com desvios-padrões de 0,3 ($p=0,002$).

3.2 Método

3.2.1. Exame histopatológico

As membranas ovulares de ambos os grupos, ainda inseridas nas placentas, foram recolhidas no pós-parto imediato, armazenadas em solução de formaldeído a 10%, e encaminhadas ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Central da ISCMSP para o exame das margens correspondentes ao sítio da ruptura.

Para a realização do exame histopatológico das membranas ovulares, procedeu-se inicialmente a sua separação da placenta. Em seguida, foi cortada uma tira de membrana medindo aproximadamente 3 cm de largura e a mesma foi enrolada com o sítio de ruptura no centro, constituindo o chamado *jelly roll*, para posterior corte. A figura 3.1 ilustra este corte.

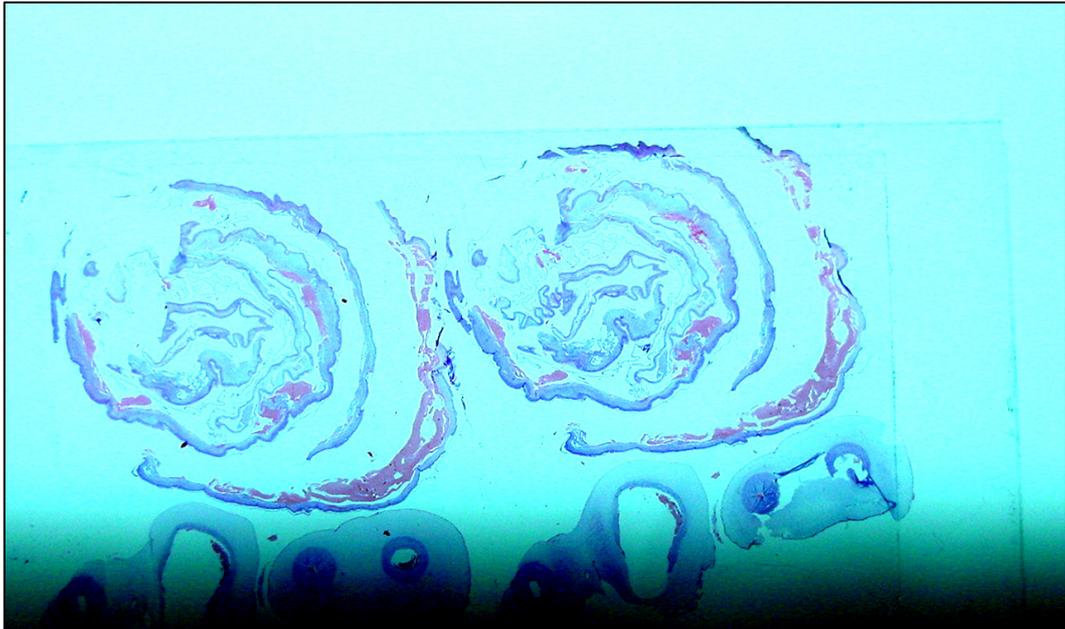


Figura 3.1. Corte de membranas ovulares (HE 200X)

Os espécimes foram desidratados em álcool etílico, clareados pelo xilol e embebidos em parafina, para confecção dos blocos. Para o preparo das lâminas, os blocos foram cortados por meio de micrótomo calibrado para espessura de 4 μm . Os cortes histológicos obtidos foram corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE) e a leitura foi feita em microscópio óptico comum. Na figura 3.2 são representadas, de forma esquemática, as camadas das membranas fetais vistas histologicamente; a figura 3.3 ilustra sua correspondência em coloração HE em um dos casos analisados neste estudo.

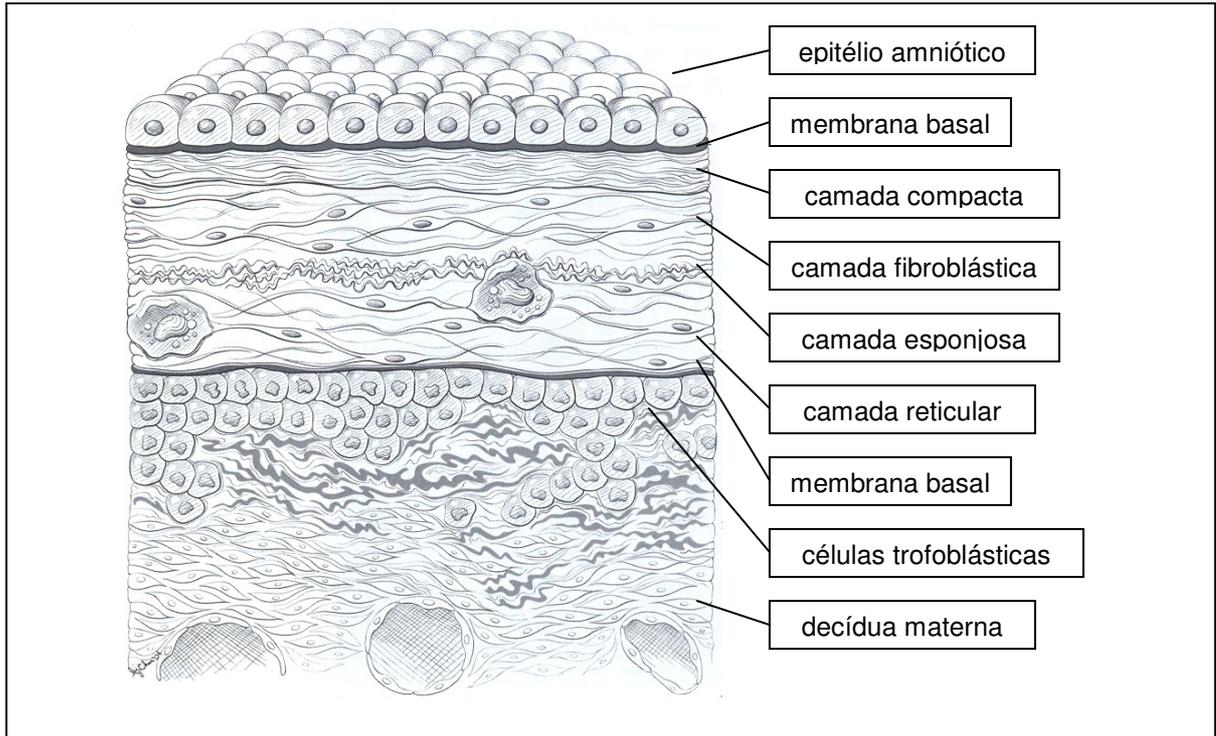


Figura 3.2. Esquema representativo das camadas das membranas amnióticas (adaptado de Fox,1993).

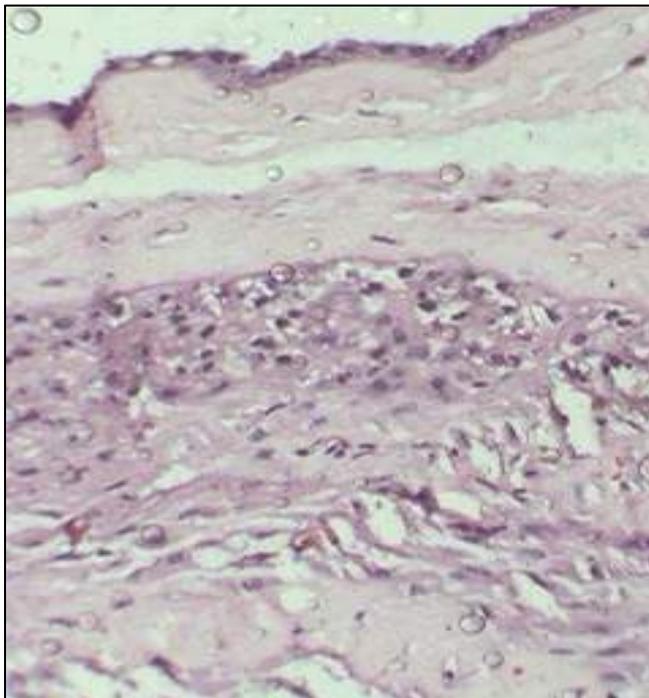


Figura 3.3. Camadas das membranas amnióticas (HE, 200X).

Por meio desse exame histopatológico procurou-se estabelecer a presença ou ausência de corioamnionite. Esta foi definida histologicamente pela presença de células inflamatórias, especialmente leucócitos polimorfonucleares (PMN), nas membranas amnióticas (Fox, 1993; Baergen, 2005). Utilizando-se classificação padronizada caracterizou-se o grau da corioamnionite em leve, moderado e acentuado (Salafia et al, 1989).

Os achados histológicos foram graduados de 0 a 3, sendo classificados de acordo com a densidade do infiltrado leucocitário, determinada pela contagem de PMN em: 0) ausência de corioamnionite, ou seja, menos de cinco PMN por campo; 1) corioamnionite leve, com 5-10 PMN por campo; 2) corioamnionite moderada, apresentando 10-20 PMN por campo e 3) corioamnionite acentuada, ou seja, presença difusa de PMN. Esta graduação é exemplificada nas figuras 3.4, 3.5, 3.6 e 3.7.

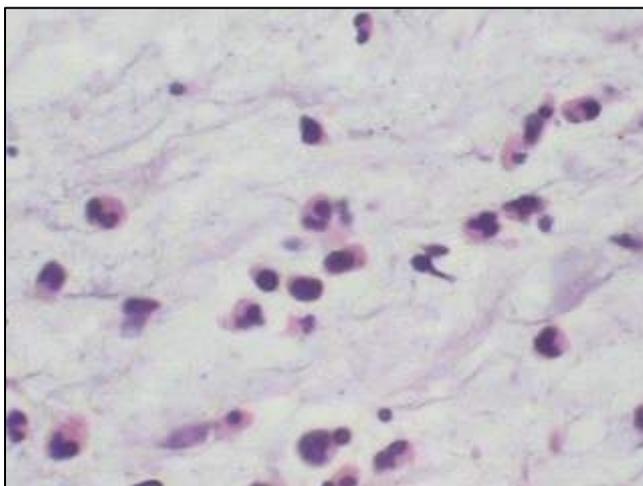


Fig. 3.4. Ausência de corioamnionite (grau 0). HE 400 X.

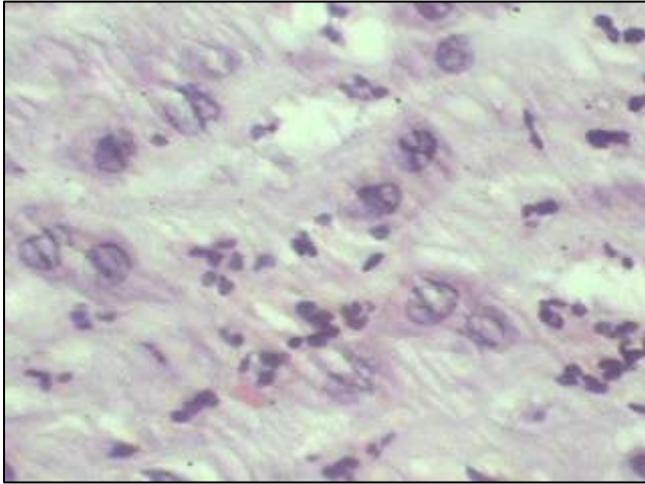


Fig. 3.5. Corioamnionite leve (grau 1). HE 400 X.

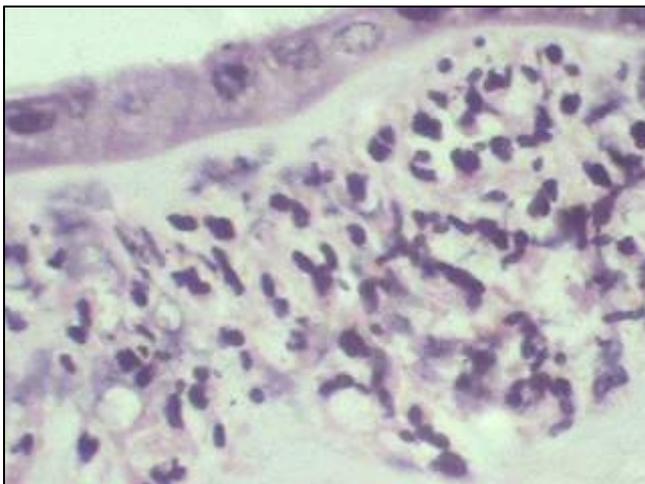


Fig. 3.6. Corioamnionite moderada (grau 2). HE 400 X.

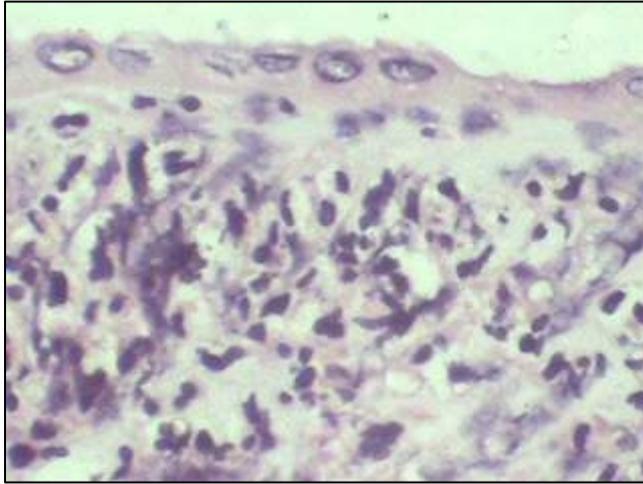


Fig. 3.7. Corioamnionite acentuada (grau 3). HE 400 X.

3.2.2. Método imunoistoquímico

A técnica de imunoistoquímica para avaliação da expressão do TNF- α nas membranas ovulares previamente bloqueadas dos grupos Estudo e Controle foi realizada na Divisão de Anatomia Patológica do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Empregou-se na referida técnica o método streptavidina-biotina-peroxidase lábil (LSAB) (Alves et al, 1999). Foram utilizados anticorpo primário anti-TNF- α (código AS210NA, RD System®, USA) e *kit* de visualização contendo anticorpo secundário conjugado à peroxidase e cromógeno (Envision®, DAKO, USA). O controle negativo foi realizado omitindo-se o anticorpo primário; em seu lugar foi adicionado soro não imune. Nesses casos nenhuma marcação foi observada.

Foram realizados cortes histológicos com 3 µm de espessura e montados em lâmina de vidro, previamente preparadas com o adesivo poli-D-lisina, para evitar o descolamento dos mesmos durante a imunocoloração. Em seguida, as mesmas foram desparafinadas em xilol à temperatura ambiente, por 10 minutos, e hidratadas em dois banhos de álcool etílico absoluto, em dois de álcool a 95% e em um de álcool a 75%. Seguiram-se lavagens em água corrente destilada durante cinco minutos. Posteriormente, foram tratadas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 6% (20 volumes) em cinco banhos, de cinco minutos cada, para bloqueio da peroxidase endógena.

Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário, em solução previamente otimizada 1/ 500, diluída em solução de albumina a 1% e em solução salina tamponada com fosfatos (PBS), por 18 horas, incluindo o período noturno, à temperatura de 4°C. No dia seguinte, após lavagens em tampão PBS (três banhos), os cortes foram incubados com anticorpo secundário em câmara úmida, por uma hora, a 37°C. Após três lavagens com tampão PBS, realizou-se incubação com complexo streptavidina-biotina-peroxidase, em câmara úmida a 37°C, por 30 minutos, e três banhos com tampão PBS.

Para visualização da reação, os cortes foram tratados com substrato cromogênico (diaminobenzidina a 60 mg% em PBS associado a 1,5 ml de peróxido de hidrogênio a 20 volumes), por cinco minutos, a 37°C. Em seguida, foram lavados em água corrente destilada, por cinco minutos. Os cortes foram então contra-corados com hematoxilina de Harris, com posteriores lavagens em água corrente e destilada, por cinco minutos, e desidratação em álcool 75%, álcool 95% (dois banhos), álcool etílico absoluto (dois banhos) e xilol (três

banhos). Seguiu-se, por fim, montagem em Entellan®, com lamínula e identificação das lâminas.

A positividade da reação para identificação do TNF- α foi marcada pela coloração marrom sépia, tomando-se como controle positivo da reação o padrão de coloração do TNF- α presente no citoplasma de macrófagos em cortes de amígdala humana (figura 3.8).

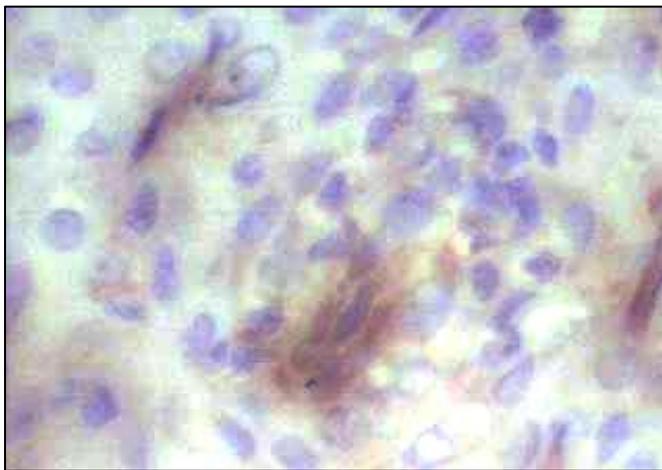


Fig. 3.8. Controle positivo da reação do TNF- α (amígdala humana). HE 400 X.

Quando presente, a positividade da reação marcou o citoplasma de células trofoblásticas da membrana amniótica com cor marrom sépia de aspecto granular. A intensidade da reação foi graduada de 0 a 3, consoante e porcentagem de células trofoblásticas coradas. Considerou-se grau 0 ou reação negativa, quando nenhuma célula apresentava cor marrom sépia; grau 1, quando havia coloração de menos de 50% das células; grau 2, quando havia reação positiva em 60-90 %;

e grau 3, quando a reação era mais intensa, com coloração de praticamente todas as células trofoblásticas. As figuras 3.9, 3.10, 3.11 e 3.12 ilustram esta graduação.

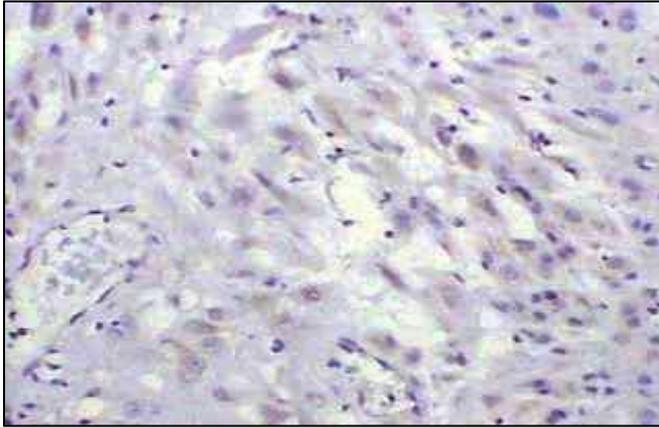


Fig. 3.9. Reação negativa para TNF- α (células trofoblásticas) HE 200 X.

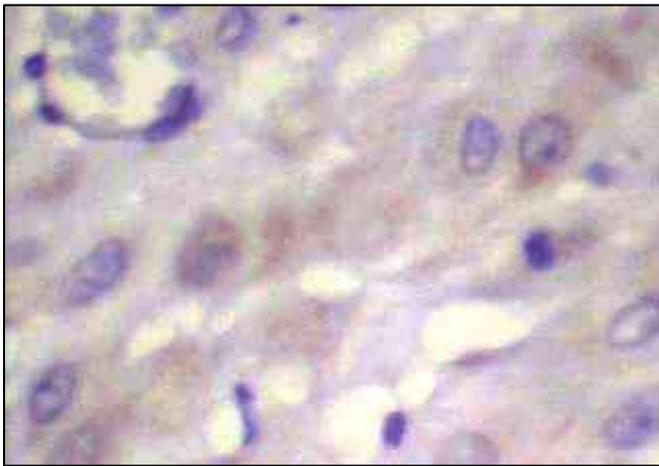


Fig. 3.10. Expressão de TNF- α grau 1 (células trofoblásticas) HE 400 X.

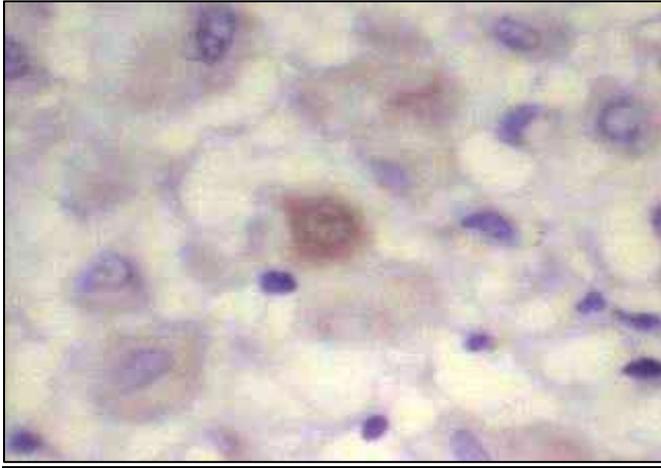


Fig. 3.11. Expressão de TNF- α grau 2 (células trofoblásticas) HE 400 X.

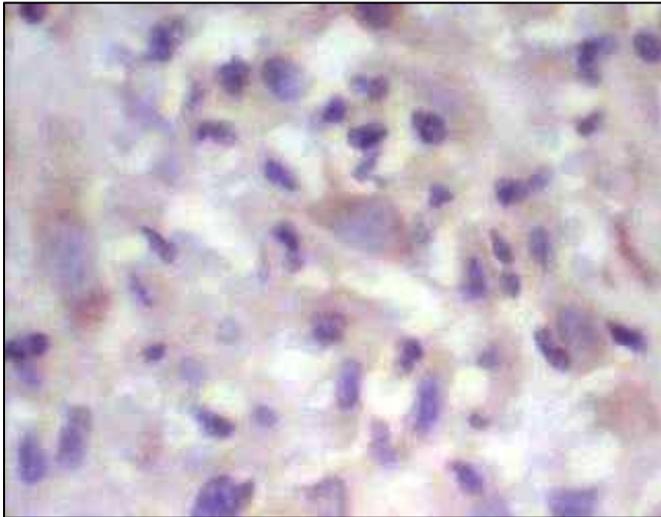


Fig. 3.12. Expressão de TNF- α grau 3 (células trofoblásticas) HE 400 X.

3.3 Análise estatística

Na análise descritiva das variáveis quantitativas (idade, idade gestacional e paridade) foram apresentados os dados (média e erro padrão). A verificação da suposição de normalidade destas variáveis foi feita através do teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov (Siegel, 1956).

O teste t de Student (Bussab & Morettin, 1987) foi utilizado para a comparação dos resultados nos grupos Controle e Estudo quanto à variável idade gestacional, por confirmar a suposição de normalidade. O teste não paramétrico de Mann-Whitney (Siegel, 1956) foi utilizado para comparação dos resultados dos grupos Controle e Estudo quanto à idade e paridade, pois estas variáveis não satisfizeram aquela suposição.

Para verificar a existência de associação entre a expressão de TNF- α com o grau de corioamnionite e com o tempo de ruptura foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman (Siegel, 1956).

Utilizou-se o teste qui-quadrado (Siegel, 1956) para a comparação da expressão de TNF- α entre os grupos Controle e Estudo.

Para todos os testes foi utilizado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os *softwares* usados nas análises estatísticas foram SPSS 13.0 e *GraphPad InStat* 3.06.

Resultados

São expostos a seguir os resultados obtidos pela análise do material submetido à técnica da imunistoquímica.

Na figura 4.1 é exposta a freqüência dos graus de corioamnionite no Grupo Estudo.

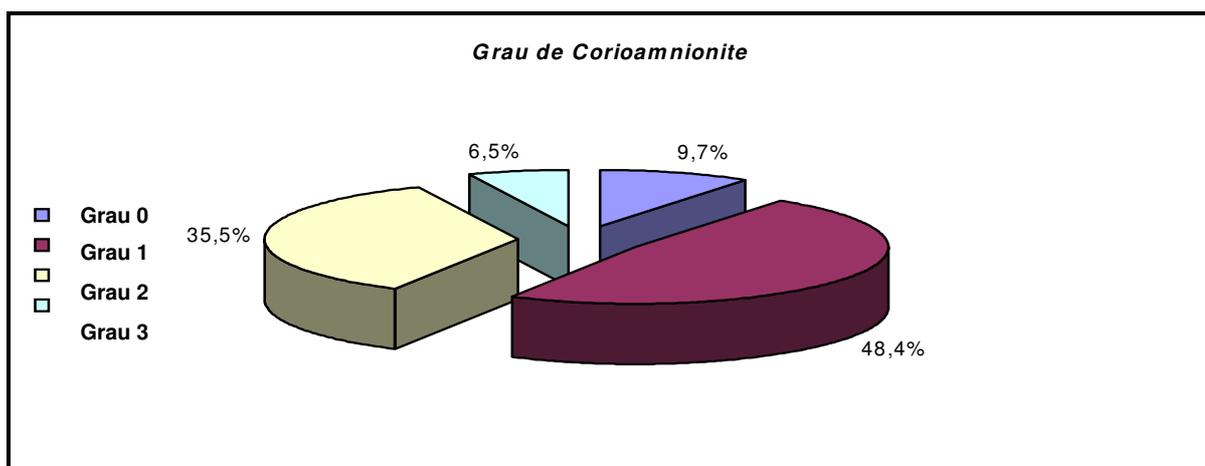


Figura 4.1. Freqüência dos graus de corioamnionite no Grupo Estudo.

No Grupo Controle, todos os casos apresentaram corioamnionite ausente (grau 0), conforme explicado nos critérios de inclusão e exclusão das pacientes. O Grupo Estudo apresentou em sua maioria graus 1 e 2 de corioamnionite, com freqüência de 48,4% e 35,5%, respectivamente.

4.1 Expressão do TNF- α nos Grupos Controle e Estudo

A tabela 4.1 mostra a freqüência da expressão de TNF- α observada nas membranas analisadas nos Grupos Controle e Estudo e os valores individuais encontram-se descritos nos Anexos 1 e 2.

Tabela 4.1. Freqüência da expressão do TNF- α nos Grupos Controle e Estudo.

Expressão de TNF- α	Controle		Estudo	
	n	%	n	%
total de casos	14	100	31	100
grau 0	2	14,29	2	6,45
grau 1	10	71,42	12	38,71
grau 2	2	14,29	15	48,39
grau 3	0	0	2	6,45

A comparação da freqüência da expressão de TNF- α nos grupos Controle e Estudo pelo teste do Qui-quadrado não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Qui-quadrado=6,65; p=0,0839).

4.2 Expressão do TNF- α no Grupo Estudo consoante o grau de corioamnionite e o tempo de ruptura das membranas

Tabela 4.2. Valores da correlação entre a intensidade da expressão de TNF- α com o grau de corioamnionite e com o tempo de ruptura.

Variáveis	Coeficiente de Correlação de Spearman	p-valor
Grau de corioamnionite	0,407	0,023
Tempo de ruptura	0,340	0,061

Verificou-se, no grupo Estudo, a existência de correlação entre o grau de corioamnionite e a intensidade da expressão de TNF- α . O cálculo do coeficiente de correlação de Spearman (R_s) demonstrou correlação estatisticamente significativa entre estas variáveis ($R_s=0,407$, $p=0,023$), conforme mostra a tabela 4.2.

O tempo de ruptura médio foi de 16,6 horas. A tabela 4.2 também ilustra a análise da correlação entre o tempo de ruptura das membranas e a intensidade da expressão de TNF- α . O coeficiente de correlação de Spearman não mostrou associação estatisticamente significativa entre estas variáveis ($R_s=0,340$; $p=0,061$).

Discussão

A ruptura prematura das membranas ainda representa, na atualidade, um dos enigmas da Obstetrícia, pois é entidade cercada de controvérsias e indagações, seja no estabelecimento de sua etiologia e mecanismos fisiopatológicos, ou no que se refere ao correto diagnóstico e ao consenso sobre a conduta a ser adotada.

Dentre os diferentes aspectos controversos relacionados com a RPM ressaltam aqueles referentes ao aparecimento da corioamnionite e aos problemas decorrentes da instalação desta complicação.

A Imunologia vem procurando respostas para muitos questionamentos em Medicina, inclusive em Obstetrícia. Constitui-se, indiscutivelmente, importante área de conhecimentos com linhas de pesquisa voltadas para o estudo dos processos infecciosos, pois estes estão intimamente ligados à resposta imune do organismo hospedeiro. Exemplos marcantes de investigações relacionadas ao sistema imune na gestação são aqueles publicados por Gusdon Jr (1969), que demonstrou a passagem transplacentária de IgG, e por Mendenhall (1970), que verificou aumento de IgG no soro materno e no sangue de cordão umbilical em comparação ao sangue de mulheres não-grávidas. Baines et al (1974) encontraram aumento progressivo dos componentes do sistema complemento dosados seriadamente no sangue de gestantes.

São escassos os estudos específicos do sistema imune em relação à RPM. O primeiro relatado é o de Cederqvist et al (1980), que compararam dosagens de IgA e IgG no sangue de cordão umbilical em relação à corticoterapia. Existem estudos relativos às imunoglobulinas (Sikorski et al, 1991;

Berezowski et al, 1994; Hironaka & Casanova, 2003; Roveran et al, 2007) e outros que analisaram a atividade do complemento na RPM (Levy & Arquembourg, 1981; Roveran et al, 2007). Além disso, alguns trabalhos estudaram as citocinas na RPM (Carrol et al, 1995; Murtha et al, 1996; Stiemer et al, 1997; Raghupathy et al, 2001; El-Shasly et al, 2004; Esplin et al, 2005; Menon et al, 2006).

A análise da literatura pertinente, em busca de trabalhos sobre a relação da expressão do TNF- α na ruptura prematura de membranas demonstra a carência de pesquisas específicas a esta citocina, como foi relatado na introdução deste trabalho (Beltran-Montoya et al, 1997; Baud et al, 1999; Zhang et al, 2000; Raghupathy et al, 2001; Menon et al, 2002; Romero et al, 2002; Shobokshi & Shaarawy, 2002; Dollner et al, 2002; Lonergan et al, 2003; El-Shasly et al, 2004; Winckler, 2005; Hansen-Pupp et al, 2005; McElrath et al, 2006).

Assim, a existência de poucos trabalhos específicos sobre o tema e a presença de dúvidas referentes ao papel dos processos infecciosos encontrados nesta complicação obstétrica motivaram a realização do presente estudo.

Para tanto, utilizou-se o método imunoistoquímico para a identificação e quantificação relativa do TNF- α nas membranas amnióticas estudadas, por meio do método streptavidina-biotina-peroxidase lábil (LSAB), com a utilização de reações com anticorpos primários e secundários. Utiliza-se rotineiramente este método em imunoistoquímica, com variação apenas dos anticorpos empregados. A imunoistoquímica tem grande indicação na pesquisa realizada diretamente em tecidos, como o caso deste estudo. Os trabalhos revisados utilizaram outras

técnicas de dosagem do TNF- α , porém realizaram a pesquisa em outros locais e não nas membranas ovulares.

Neste estudo, elegeu-se como material as membranas ovulares, por serem o sítio principal da corioamnionite, o que proporcionaria melhor avaliação da atuação da resposta imune local. A literatura mostra estudos com pesquisa de TNF- α no sangue materno (Zhang et al, 2000), no sangue funicular neonatal (Dollner et al, 2002; Hansen-Pupp et al, 2005), no líquido amniótico (Baud et al, 1999; Zhang et al, 2000; Shobokshi & Shaarawy, 2002) e em placentas (Lonergan et al, 2003; El-Shazly et al, 2004). Apenas Beltran-Montoya et al (1997) utilizaram, à semelhança deste trabalho, membranas amnióticas como material de estudo.

O Grupo Estudo foi composto por 31 gestantes com RPM que atenderam a critérios rígidos de inclusão e exclusão. Este foi o número obtido, respeitando-se a incidência da RPM durante o período estudado. Utilizaram-se como Grupo Controle 14 gestantes normais, número considerado adequado pela análise estatística para a comparação entre os grupos. Os estudos relatados utilizaram número de casos de RPM que variou entre 30 (Raghupathy et al, 2001; Shobokshi & Shaarawy, 2002; El-Shazly et al, 2004) e 139 (Dollner et al, 2002).

Neste trabalho, os grupos apresentaram média de idades semelhante, em torno de 24 anos no Grupo Estudo e de 23 anos no Grupo Estudo. Esta faixa etária coincide com a idade reprodutiva, e nenhum estudo, inclusive o atual, mostra influência desta variável na incidência ou no prognóstico da doença em questão.

A distribuição dos grupos Controle e Estudo quanto à idade gestacional apresentou diferença estatisticamente significativa, com média de 39,6 e 38,0 semanas respectivamente. Este resultado, porém, não tem repercussão na prática obstétrica, pois ambas as médias se referem a gestações a termo e portanto podem ser consideradas semelhantes. As idades gestacionais relatadas nos estudos revisados, assim como neste trabalho, dependeram da seleção realizada pelos pesquisadores. No caso do estudo em questão, optou-se por casos de RPM acima de 34 semanas de gestação, pelo fato de que neste Serviço indica-se resolução da gestação a partir deste ponto de corte, o que facilitaria a coleta do material do parto.

Neste estudo, os grupos Controle e Estudo foram semelhantes em relação à paridade, com maior proporção de primíparas nos dois grupos; portanto, esta variável não constituiu fator de confusão. Naeye & Peters (1980) mostraram não haver associação entre frequência de RPM e paridade.

O Grupo Estudo, apesar de não apresentar nenhuma evidência clínico-laboratorial de infecção, apresentou corioamnionite leve (frequência de 48,39%) ou moderada (35,48%) na maioria dos casos. Este achado é concordante com o de Naeye & Peters (1980), que verificaram resposta inflamatória nas membranas de parturientes com RPM, em comparação com aquelas de parturientes com ruptura oportuna das mesmas.

Estes resultados parecem trazer contribuição no que se refere à controvérsia sobre a presença da corioamnionite. Alguns autores admitem ser a mesma conseqüência da ascensão de microorganismos patogênicos presentes

no trato genital inferior, através do canal cervical após a perda da barreira protetora das membranas ovulares (Garite, 1994; Rivera Z. et al, 2004; Newton, 2005; Torrens et al, 2005), enquanto que outros têm opinião de que ocorra infecção das membranas e da cavidade amniótica previamente à ruptura das membranas, constituindo portanto fator causador da RPM (Naeye & Peters, 1980; Mercer, 2005; Newton, 2005).

O estudo em questão sugere que pode haver presença de processo inflamatório local previamente à ruptura das membranas, o que corrobora os trabalhos que apontam ser a RPM de causa principalmente infecciosa (Naeye & Peters, 1980; Romero et al, 1992).

A comparação da expressão do TNF- α nos dois grupos não mostrou diferença estatística (Qui-quadrado=6,65; $p=0,0839$); porém, houve predominância da reação grau 1 no Grupo Controle, com frequência de 71,42%, enquanto a maioria do Grupo Estudo apresentou reação graus 1 e 2, com frequências de 38,71% e 48,39%, respectivamente. Estes dados sugerem associação entre a intensidade da expressão do TNF- α com o grau de corioamnionite; tal fato foi confirmado pelo coeficiente de correlação de Spearman, calculado entre estas variáveis, que mostrou positividade ($R_s=0,407$, $p=0,023$).

Os estudos relacionados na literatura, embora não possam ser diretamente comparados ao nosso, por apresentarem metodologia diferente, mostraram, em concordância com o atual, associação entre corioamnionite e aumento dos níveis de TNF- α (Beltran-Montoya et al, 1997; Baud et al, 1999;

Zhang et al, 2000; Shobokshi & Shaarawy, 2002; Dollner et al, 2002; Winckler, 2005).

Essa correlação positiva era resultado esperado nesta pesquisa, pois conhece-se o papel do TNF- α como principal mediador da resposta inflamatória aguda contra os agentes infecciosos.

Constituiu-se preocupação deste trabalho verificar a possível influência do tempo de ruptura das membranas em relação à expressão do TNF- α . O tempo de ruptura médio foi de 16,6 horas. Valendo-se do coeficiente de correlação de Spearman, não foi possível demonstrar associação entre o tempo de ruptura e a intensidade da expressão do TNF- α ($R_s=0,34$; $p=0,061$).

Sabe-se que o risco de corioamnionite eleva-se com o prolongamento do período de latência, conforme apontam alguns autores relatados na introdução deste estudo (Gunn et al, 1970; McElrath et al, 2003; Maayan-Metzger et al, 2006). Esperava-se, portanto, correlação positiva entre este marcador de inflamação e o tempo de ruptura.

Dos estudos revisados, apenas Zhang et al (2000) e Hansen-Pupp et al (2005) analisaram esta possível associação com o tempo de ruptura das membranas e ambos encontraram correlação positiva. No entanto, as dosagens empregadas por estes autores foram realizadas no sangue materno, no sangue do cordão umbilical e no líquido amniótico, enquanto nossa pesquisa foi realizada diretamente nas membranas ovulares.

A ausência de correlação significativa encontrada no estudo em questão talvez possa ser explicado pelo tempo médio de ruptura das membranas ter sido relativamente curto no Grupo Estudo, enquanto outros trabalhos mostram aumento da corioamnionite acima de 24 horas de ruptura.

O presente estudo, apesar de não se prestar para aplicação clínica direta, por ter sido realizada análise pós-natal dos casos, demonstra, entretanto, que existe atuação do sistema imune na RPM, o que condiz com a presença provável de processos infecciosos existentes previamente à ruptura das membranas, conhecimento este que proporciona aplicação prática quanto à prevenção da RPM, como, por exemplo, o tratamento pré-natal das infecções genitais.

Além disso, a pesquisa de TNF- α diretamente nas membranas ovulares pode ser utilizada nos casos de RPM que cursam com complicações infecciosas maternas e perinatais, para melhor elucidação do real foco infeccioso nos quadros duvidosos.

Acredita-se que este trabalho possa colaborar para maior compreensão dos aspectos que envolvem a presença de corioamnionite na RPM.

Conclusões

O presente estudo possibilitou as seguintes conclusões:

1- não se observou diferença estatisticamente significativa entre as expressões do fator de necrose tumoral alfa em membranas ovulares com ruptura prematura e com ruptura oportuna das mesmas;

2- no Grupo Estudo constatou-se associação estatisticamente significativa entre a expressão do fator de necrose tumoral alfa e o grau de corioamnionite;

3- no Grupo Estudo não se observou correlação entre a expressão do fator de necrose tumoral alfa e o tempo de ruptura das membranas.

Anexo 1. Dados gerais das pacientes incluídas no Grupo Estudo.

Nº	PACIENTE	Nº EXAME	REGISTRO	IDADE	Nº PARTOS	IDADE GESTACIONAL	TEMPO RUPTURA	GRAU CORIOAMNIONITE	EXPRESSÃO TNF- α
1	LES	10606873	277289	37,0	1	38,1	11,0	2	2
2	JSC	10608045	1006116	19,0	0	40,0	4,8	2	1
3	FNST	10608130	1014721	28,0	1	37,0	4,2	2	1
4	MS	10612031	82263	22,0	0	38,3	2,6	1	2
5	SNC	10608349	69957	20,0	0	38,4	37,0	2	1
6	JFM	10608397	6224	22,0	0	35,6	7,2	2	2
7	RPO	10608401	212411	23,0	2	38,3	17,0	1	1
8	TAF	10608422	80213	17,0	0	35,6	14,0	2	2
9	MM	10608557	871194	30,0	1	37,8	6,5	1	2
10	LCS	10608758	543253	24,0	0	40,8	13,7	1	1
11	LVL	10608798	278177	20,0	0	39,6	7,0	2	2
12	JCS	10608907	51732	21,0	0	39,7	6,0	2	2
13	GK	10608910	278284	19,0	0	40,3	8,5	2	2
14	MTRB	10609101	1034673	20,0	0	39,1	13,7	1	2
15	VRS	10609105	1034637	20,0	0	39,1	25,0	0	1
16	LSS	10609231	278398	21,0	0	38,0	36,0	0	0
17	KFA	10612643	280244	20,0	0	40,1	17,5	1	2
18	CNB	10609362	278400	23,0	1	38,7	14,0	1	0
19	RRN	10609488	1035284	33,0	0	38,1	17,8	0	1
20	CS	10609543	274199	18,0	0	39,4	4,5	2	3
21	GSL	10609912	694020	30,0	2	39,3	8,0	1	2
22	EFS	10609952	651047	23,0	0	35,8	13,7	3	3
23	APB	10610394	212392	30,0	0	37,7	9,0	1	1
24	SAT	10611113	213855	36,0	1	38,8	18,0	2	2
25	DSM	10611843	773582	25,0	1	39,0	24,0	1	1
26	ILP	10611844	1039451	30,0	1	34,3	15,0	1	2
27	ECSR	10611924	278242	18,0	0	35,3	35,0	1	2
28	MCS	10612946	82820	24,0	3	39,3	8,5	3	1
29	EGP	10613462	279651	33,0	2	35,3	48,0	1	2
30	KRFS	10613668	280775	24,0	1	36,1	45,0	1	1
31	GBV	10614240	1043899	19,0	0	37,1	21,0	1	1

Idade (em anos); idade gestacional (em semanas); tempo de ruptura (em horas); Grau de corioamnionite: (0) ausente, (1) leve, (2) moderada, (3) severa; expressão do TNF- α : (0) reação negativa, (1) reação positiva leve, (2) reação positiva moderada, (3) reação positiva intensa.

Anexo 2. Dados gerais das pacientes incluídas no Grupo Controle.

Nº	PACIENTE	REGISTRO	Nº EXAME	IDADE	Nº PARTOS	IDADE GESTACIONAL	GRAU CORIOAMNIONITE	EXPRESSÃO TNF- α
1	MSGs	48390	10606585	34	4	38,0	0	1
2	HO	79185	10606589	39	2	40,3	0	1
3	AJS	17581	10610874	21	1	38,3	0	1
4	SC	79465	10607119	18	1	40,0	0	1
5	VRC	83347	10614007	28	0	40,4	0	1
6	LSN	80187	10608814	24	0	41,0	0	2
7	PSRJ	808459	10609300	21	1	40,6	0	2
8	MESB	1036177	10609950	25	0	39,2	0	1
9	MDI	1036789	10610352	20	0	39,0	0	1
10	LSS	83942	10615232	16	0	39,0	0	1
11	RAS	1036928	10610455	21	0	41,1	0	1
12	ACG	1037043	10610490	22	0	41,3	0	1
13	MSA	81589	10610893	16	0	38,3	0	0
14	DRV	82096	10611931	21	1	39,0	0	0

Idade (em anos); idade gestacional (em semanas); tempo de ruptura (em horas); Grau de corioamnionite: (0) ausente, (1) leve, (2) moderada, (3) severa; expressão do TNF- α : (0) reação negativa, (1) reação positiva leve, (2) reação positiva moderada, (3) reação positiva intensa.

Anexo 3. Parecer do Comitê Científico do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia da Santa Casa de São Paulo
Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

Parecer da Comissão Científica

Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da ISCMSP

I – Identificação

Título do trabalho:

Pesquisa de interleucinas e fator de necrose tumoral em placentas de gestações com ruptura prematura de membranas

Pesquisador Responsável na ISCMSP:

Dr. Valquíria Roveran

Orientador: Prof. Dr. Júlio Tedesco

Serviços envolvidos:

ISCMSP - Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de Misericórdia

II – Projeto:

Finalidade Acadêmica: Pós-graduação - Doutorado

Objetivo do trabalho: claro e conciso

Material e métodos: Os métodos propostos são viáveis em nossa instituição.

Crítérios de exclusão: De acordo com o proposto.

III – Comentários do relator:

Área de conhecimento: Obstetrícia

Tipo de trabalho: () retrospectivo (X) prospectivo

Análise de risco: sem risco.

Orçamento: O projeto será subsidiado pelo pesquisador juntamente com eventuais recursos obtidos do fundo de amparo a pesquisa da FCMSOSP.

Termo de Consentimento: de acordo

Folha de rosto: (X) adequada () inadequada () não anexada

IV – Parecer da Comissão Científica

Projeto:

(X) aprovado sem modificações

() aprovado após seguimento dos itens comentados

() não aprovado

Local e data: São Paulo, 21 de junho de 2006.

Dr. Antônio Pedro Auge
CRM 22448

Comissão Científica

Anexo 4. Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa.



IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
 Rua Dr. Cesário Mota Júnior, 112 Santa Cecília CEP 01277900 São Paulo –SP
 PABX (11) 21767000 Ramais:57102/5502 – Fax- 2176.7041 E-mail: eticamed@santacasasp.org.br

São Paulo, 25 de agosto de 2006.

Projeto nº 285/06
 Informe este número para
 identificar seu projeto no CEP

Ilmo.(a).Sr.(a).

Dr.(a). Valquíria Roveran
 Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

O Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMSP, em reunião ordinária, dia **26/07/2006** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa: **“Pesquisa de interleucinas e fator de necrose tumoral em placentas de gestações com ruptura prematura de membranas”**, emitiu parecer inicial em pendência e nesta data enquadrando-o na seguinte categoria:

- Aprovado (inclusive o TCLE);**
- Com pendências** (há modificações ou informações relevantes a serem atendidas em 60 dias, enviar as alterações em duas cópias);
- Retirado**, (por não ser reapresentado no prazo determinado);
- Não aprovado:** e
- Aprovado** (inclusive TCLE -Termo de Consentimento Livre e Esclarecido), e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS -CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias. **Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.**

Prof. Dr. Daniel R. Muñoz

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
 ISCMSP

Anexo 5. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA SANTA CASA DE SÃO PAULO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº PTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: EXPRESSÃO DO TNF-ALFA EM MEMBRANAS COM RUPTURA PREMATURA

PESQUISADOR: VALQUIRIA ROVERAN

CARGO/FUNÇÃO: MÉDICA PRIMEIRO-ASSISTENTE

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 79333

DEPARTAMENTO DA I.S.C.M.S.P. ou F.C.M.S.C.S.P.: DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO X RISCO BAIXO RISCO MÉDIO

RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 6 MESES

III - CONSENTIMENTO

Eu, _____, RG _____, declaro ter recebido explicações médicas sobre pesquisa de TNF na placenta e ter entendido o que me foi explicado. Consinto em participar da presente Pesquisa, tendo o direito de deixar esta participação a qualquer momento, sem perder o direito de atendimento na Santa Casa.

São Paulo, ____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

VALQUIRIA ROVERAN – CRM 79333

Fontes Consultadas

Houaiss A, Villar MS, Franco FMM. Dicionário Houaiss da língua portuguesa. Rio de Janeiro: Objetiva; 2001. 351p.

Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Pós-Graduação. Normatização para apresentação de dissertações e teses em estudos experimentais e observacionais. Aprovada pela Comissão de Pós-Graduação em 13 de julho de 2004 [on line] São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2004. Disponível em: <http://www.fcmscsp.edu.br/posgraduacao/index.php?s=regulamento> [2 set 2007]

Moraes IN. Elaboração da pesquisa científica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Álamo; 1985. 215p.

Referências Bibliográficas

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: WB Saunders; 2000. 553 p.
- Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J. Manual de imuno-histoquímica. Sociedade Brasileira de Patologia. 1999. 270p.
- Amed AM, Camano L. Amniorrexe prematura. In: Camano L, Souza E, Sass N, Mattar R. Obstetrícia: guias de medicina ambulatorial e hospitalar - UNIFESP/Escola Paulista de Medicina. Barueri: Manole; 2003. p. 149-55.
- Baergen RN. Manual of Benirschke and Kaufmann's pathology of the human placenta. New York: Springer Verlag; 2005. 504 p.
- Baines MG, Millar KG, Mills P. Studies of complement levels in normal human pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1974; 43:806-10.
- Baud O, Emilie D, Pelletier E, Lacaze-Masmonteil T, Zupan V, Fernandez H, et al. Amniotic fluid concentrations of interleukin-1beta, interleukin-6 and TNF-alpha in chorioamnionitis before 32 weeks of gestation: histological associations and neonatal outcome. *Br J Obstet Gynaecol.* 1999; 106:72-7.
- Beltrán Montoya J, Meráz Cruz N, Vadillo Ortega F. Identificación de nexos moleculares entre infección y ruptura prematura de membranas. *Ginecol Obstet Méx.* 1997; 65:191-3.
- Berezowski AT, Cunha SP, Costa JC, Bacchi CE. Quantitation of immunoglobulin A in the human chorioamniotic membrane with premature rupture of membranes. *Int J Gynaecol Obstet.* 1994; 47:23-6.
- Bertini AM, Taborda W, Amed AM, Porto AGM. Rotura prematura de membranas. In: Benzecry R, Oliveira HC, Lemgruber I. Tratado de obstetrícia FEBRASGO. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p.499-503.
- Beutler B, Cerami A. The history, properties, and biological effects of cachectin. *Biochemistry.* 1988; 27:7575-82.
- Bingham CO 3rd. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Rheumatol Suppl.* 2002; 65:3-9.
- Breeze MW. Spontaneous premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1961; 81:1086-93.
- Bryant-Greenwood GD, Millar LK. Human fetal membranes: their preterm premature rupture. *Biol Reprod.* 2000; 63:1575-9.
- Bussab WO, Morettin PA. Estatística básica: métodos quantitativos. São Paulo: Atual; 1987. 321 p.
- Calkins LA. Premature spontaneous rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1952; 64:871-7.

Carroll SG, Abbas A, Ville Y, Meher-Homji N, Nicolaidis KH. Concentration of fetal plasma and amniotic fluid interleukin-1 in pregnancies complicated by preterm prelabour amniorrhexis. *J Clin Pathol.* 1995; 48:368-71.

Cederqvist LL, Ekelund L, Litwin SD. Effect of glucocorticoids on fetal immunoglobulin production after premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol.* 1980; 55:444-6.

Dollner H, Vatten L, Halgunset J, Rahimipoor S, Austgulen R. Histologic chorioamnionitis and umbilical serum levels of pro-inflammatory cytokines and cytokine inhibitors. *BJOG.* 2002; 109:534-9.

El-Shazly S, Makhseed M, Azizieh F, Raghupathy R. Increased expression of pro-inflammatory cytokines in placentas of women undergoing spontaneous preterm delivery or premature rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol.* 2004; 52:45-52.

Esplin MS, Romero R, Chaiworapongsa T, Kim YM, Edwin S, Gomez R, et al. Monocyte chemotactic protein-1 is increased in the amniotic fluid of women who deliver preterm in the presence or absence of intra-amniotic infection. *J Matern Fetal Neonatal Med;* 2005; 17:365-73.

Fonseca E S V B. Ruptura prematura das membranas ovulares. In Zugaib M, Bittar R E. *Protocolos assistenciais da Clínica Obstétrica da Faculdade de Medicina da USP.* São Paulo: Atheneu; 2007. p.557-70.

Forte WN. *Imunologia básica e aplicada.* São Paulo: Artmed ; 2004. 359p.

Fox H. The placenta and infection. In: Redman CWG, Sargent IL, Starkey PM. *The human placenta – a guide for clinicians and scientists.* Oxford: Blackwell Scientific; 1993. p.313-33.

Garite TJ. Premature rupture of the membranes. In: Ceasy R K, Resnik R. *Maternal-fetal medicine: principles and practice.* Philadelphia: WB Saunders; 1994. p.625-38.

Gibbs RS, Blanco JD. Premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol.* 1982; 60:671-9.

Golino OS, Chein MBC, Brito LMO. Ruptura prematura de membranas: fisiopatologia, diagnóstico e conduta. *Femina.* 2006; 34:711-7.

Gunn GC, Mishell DR Jr, Morton DG. Premature rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1970; 106:469-83.

Gusdon JP Jr. Fetal and maternal immunoglobulin levels during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1969; 103:895-900.

- Hadley CB, Main DM, Gabbe SG. Risk factors for preterm premature rupture of the fetal membranes. *Am J Perinatol.* 1990; 7:374-9.
- Harger JH, Hsing AW, Tuomala RE, Gibbs RS, Mead PB, Eschenbach DA, et al. Risk factors for preterm premature rupture of fetal membranes: a multicenter case-control study. *Am J Obstet Gynecol.* 1990; 163:130-7.
- Hansen-Pupp I; Harling S; Berg AC; Cilio C; Hellström-Westas L; Ley D. Circulating interferon-gamma and white matter brain damage in preterm infants. *Pediatr Res.* 2005; 58:946-52.
- Hironaka HC, Casanova LD. Concentrações séricas de imunoglobulinas em sangue do funículo umbilical e em sangue materno no momento do parto. *Acta Cir Bras.* 2003; 18:159-66.
- Ianetta O, Urbanetz AA, Moura MD. Propedêutica da amniorrexe prematura. *Femina.* 1984; 13:836, 840, 842.
- Iwatani Y, Watanabe M. The maternal immune system in health and disease. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1998; 10:453-8.
- Janeway C. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença.* Porto Alegre: Artmed; 2000. 767p.
- Kelly, R. W. Pregnancy maintenance and parturition: the role of prostaglandin in manipulating the immune and inflammatory response. *Endocr Rev.* 1994; 15:684-706.
- Krasnochecoff N M. Ruptura prematura das membranas ovulares. In: Neme B. *Obstetrícia básica.* São Paulo: Sarvier; 1994. p.406-12.
- Krohn MA, Hitti J. Characteristics of women with clinical intra-amniotic infection who deliver preterm compared with term. *Am J Epidemiol.* 1998; 147:111-6.
- Larsen JW. Premature amniorrhexis. *Obstet Gynecol Annu.* 1979; 8:203-21.
- Lebhertz TB, Boyce CR, Huston JW. Premature rupture of the membranes. A statistical study from 7 U.S. Navy hospitals. *Am J Obstet Gynecol.* 1961; 81:658-65.
- Lee T, Silver H. Etiology and epidemiology of preterm premature rupture of the membranes. *Clin Perinatol.* 2001; 28:721-34.
- Levy DL, Arquembourg PC. Maternal and cord blood complement activity: relationship to premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1981; 139:38-40.
- Lonergan M, Aponso D, Marvin KW, Helliwell RJ, Sato TA, Mitchell MD, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TRAIL receptors, and the soluble receptor osteoprotegerin in human gestational membranes and

amniotic fluid during pregnancy and labor at term and preterm. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:3835-44.

López-Osma FA, Ordoñez-Sánchez SA. Ruptura prematura de membranas fetales: de la fisiopatología hacia los marcadores tempranos de la enfermedad. *Rev Colomb Obstet. Ginecol.* 2006; 57:279-90.

Maayan-Metzger A, Mazkereth R, Shani A, Kuint J. Risk factors for maternal intrapartum fever and short-term neonatal outcome. *Fetal Pediatr Pathol.* 2006; 25:169-77.

McElrath TF, Allred EN, Leviton A, Development Epidemiology Network Investigators. Prolonged latency after preterm premature rupture of membranes: an evaluation of histologic condition and intracranial ultrasonic abnormality in the neonate born at <28 weeks of gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 189:794-8.

Medina TM, Hill DA. Preterm premature rupture of membranes: diagnosis and management. *Am Fam Physician.* 2006; 73:659-64.

Mendenhall H. Serum protein concentrations in pregnancy II: concentrations in cord serum and amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 1970; 106:581-3.

Menon R, Lombardi SJ, Fortunato SJ. TNF-alpha promotes caspase activation and apoptosis in human fetal membranes. *J Assist Reprod Genet.* 2002; 19:201-4.

Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes: current approaches to evaluation and management. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2005; 32:411-28.

Minkoff H. Prematurity: infection as an etiologic factor. *Obstet Gynecol.* 1983; 62:137-44.

Murtha AP, Greig PC, Jimmerson CE, Roitman-Johnson B, Allen J, Herbert WN. Maternal serum interleukin-6 concentrations in patients with premature rupture of membranes and evidence of infection. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 175:966-9.

Naeye RL, Peters EC. Causes and consequences of premature rupture of fetal membranes. *Lancet.* 1980;1:192-4.

Newton ER. Chorioamnionitis and intraamniotic infection. *Clin Obstet Gynecol.* 1993; 36: 795-808.

Newton ER. Preterm labor, preterm premature rupture of membranes, and chorioamnionitis. *Clin Perinatol.* 2005; 32:571-600.

Parry S, Strauss JF 3rd. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med.* 1998; 338: 663-70.

Parham P. O sistema imune. Porto Alegre: Artmed; 2001. 372p.

Pinheiro LS. Amniorrexe prematura. *Femina.* 1989; 17:41-3.

Polzin WJ, Brady K. The etiology of premature rupture of the membranes. Clin Obstet Gynecol. 1998; 41:810-6.

Raghupathy R, Makhseed M, El-Shazly S, Azizieh F, Farhat R, Ashkanani L. Cytokine patterns in maternal blood after premature rupture of membranes. Obstet Gynecol. 2001; 98:122-6.

Rivera Z. R, Caba B. F, Sminirnov S. M, Aguilera T. J, Larraín H. A. Fisiopatología de la rotura prematura de las membranas ovulares en embarazos de pretérmino. Rev Chil Obstet Ginecol. [periódico online] 2004; 69: [cited 2 October 2007] 249-55. Available from: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75262004000300013&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0717-7526.

Rocha, JES, Tomaz ACP, Rocha DB, Bezerra AF, Lopes ALC, Breda AMO, et al. Morbidade materna e morbimortalidade perinatal associada à infecção ascendente na rotura prematura das membranas. Rev Bras Ginecol Obstet. 2002; 24:15-20.

Romero R, Ghidini A, Bahado-Singh R. Premature rupture of the membranes. In: Reece EA, Hobbins JC, Mahoney MJ, Petrie RH, editors. Medicine of the fetus & mother. Philadelphia: J.B.Lippincott; 1992. p. 1430-68.

Romero R, Chaiworapongsa T, Espinoza J, Gomez R, Yoon BH, Edwin S, et al. Fetal plasma MMP-9 concentrations are elevated in preterm premature rupture of the membranes. Am J Obstet Gynecol. 2002;187:1125-30.

Roitt IM. Imunologia. 5^a. ed. São Paulo: Atheneu; 1999. 294p.

Roveran V, Tedesco JJA, Forte WCN, Yamano LM, Rodrigues LP, Vazquez ML, et al. Valores séricos de imunoglobulinas e dos componentes do complemento em gestantes com ruptura prematura de membranas. Rev Bras Ginecol Obstet. 2007; 29:175-80.

Salafia CM, Weigl C, Silberman L. The prevalence and distribution of acute placental inflammation in uncomplicated term pregnancies. Obstet Gynecol. 1989; 73:383-9.

Shalaby MR, Aggarwal BB, Rinderknecht E, Svedersky LP, Finkle BS, Palladino MA Jr. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. J Immunol. 1985; 135:2069-73.

Shalaby MR, Pennica D, Palladino MA Jr. An overview of history and biologic properties of tumor necrosis factors. Springer Semin Immunopathol 1986; 9:33-7.

Shobokshi A; Shaarawy M. Maternal serum and amniotic fluid cytokines in patients with preterm premature rupture of membranes with and without intrauterine infection. Int J Gynaecol Obstet 2002; 79:209-15.

- Siegel S. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. Tokyo: McGraw-Hill Kogakusha; 1956. 312 p.
- Sikorski R, Milart P, Kapec E. Essential metal and immunoglobulin levels in women and neonates with PROM. *Zentralbl Gynakol.* 1991; 113:99-103.
- Silva Filho AR, Cunha AA, Menezes AA. Ruptura prematura das membranas: por que ocorre? O que fazer? *J Bras Ginecol.* 1988; 98:421-4.
- Stiemer B, Buschmann A, Bisson S, Hensel K, Gramm HJ, Hopp H, et al. Interleukin-8 in urine: a new diagnostic parameter for intra-amniotic infection after premature rupture of the membranes. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997; 104:499-502.
- Torrens MCT, Maioli LC, Carvalho RL. Ruptura prematura de membranas. *Acta Med (Porto Alegre)* 2005; 26:680-9.
- Trundley A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens.* 2004; 63:1-12.
- Vinatier D, Monnier JC. Les defenses immunitaires non spécifiques pendant la grossesse. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 1988, 17:861-8.
- Weetman AP. The immunology of pregnancy. *Thyroid.* 1999; 9:643-6.
- Winkler M. Role of cytokines and other inflammatory mediators. *BJOG.* 2003;110 (Suppl 20):118-23.
- Zhang W, Wang L, Zhao Y, Kang J. Changes in cytokine (IL-8, IL-6 and TNF-alpha) levels in the amniotic fluid and maternal serum in patients with premature rupture of the membranes. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei).* 2000; 63:311-5.

Título: Expressão local do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na ruptura prematura de membranas

Objetivos: 1- comparar a expressão do fator de necrose tumoral alfa em membranas ovulares com ruptura prematura (RPM) e com ruptura oportuna das mesmas; 2- nos casos de ruptura prematura das membranas, correlacionar a expressão do fator de necrose tumoral alfa nas mesmas com o período de latência; 3- verificar a associação entre a expressão do fator de necrose tumoral alfa em membranas ovulares e o grau de corioamnionite das mesmas.

Metodologia: foram analisadas as membranas ovulares de 31 parturientes com RPM, com idade gestacional acima de 34 semanas e de 14 parturientes com ruptura oportuna das membranas, com idade gestacional igual ou maior de 37 semanas. A detecção da corioamnionite foi feita por meio de estudo histopatológico. A avaliação da expressão do fator de necrose tumoral alfa foi feita por meio de técnica imunoistoquímica, onde foi empregado o método streptavidina-biotina-peroxidase lábil (LSAB).

Resultados: a frequência da expressão de TNF- α nos grupos Controle e Estudo não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os mesmos (Qui-quadrado=6,65; $p=0,0839$). No Grupo Estudo, houve correlação entre o grau de corioamnionite e a intensidade da expressão de TNF- α (coeficiente de Spearman (R_s)=0,407, $p=0,023$). A análise da correlação entre o tempo de ruptura das membranas e a intensidade da expressão de TNF- α não mostrou associação estatisticamente significativa entre estas variáveis ($R_s=0,34$; $p=0,061$).

Conclusões: o presente estudo possibilitou-nos concluir que: 1- não houve diferença estatisticamente significativa entre as expressões do TNF- α em membranas ovulares com ruptura prematura e com ruptura oportuna das mesmas; 2- no Grupo Estudo não se observou correlação entre a expressão do TNF- α em membranas ovulares com o período de latência; 3- no Grupo Estudo constatou-se associação estatisticamente significativa entre a expressão do TNF- α e o grau de corioamnionite.

Abstract

Title: Local expression of alpha tumor necrosis factor (TNF- α) on premature rupture of membranes

Objectives: 1- to compare the expression of alpha tumor necrosis factor (TNF- α) on premature rupture of membranes and labor rupture; 2- in cases of premature rupture of membranes, to correlate the expression of alpha tumor necrosis factor on membrane rupture timing; 3- to check the association between alpha tumor necrosis factor expression on ovular membranes and chorioamnionitis severity.

Methodology: we analyzed membranes of 31 pregnant women with premature rupture of membranes, gestational age over 34 weeks, and 14 women with labor membrane rupture, gestational age equal or greater than 37 weeks. Detection of chorioamnionitis was made through histopathological analysis. The assessment of alpha tumor necrosis factor expression was made using immunohistochemistry labeled streptavidin-biotin-peroxidase (LSAB) method. *Results:* the frequency of TNF- α expression in the Control and Study group did not show statistically significant differences (Chi-square = 6.65; $p=0.0839$). In the Study group, there was correlation between chorioamnionitis severity and expression of TNF- α (Spearman coefficient (R_s)=0.407, $p=0.023$). The analysis of the correlation between membrane rupture timing and TNF- α expression did not show statistically significant difference ($R_s=0.34$; $p=0.061$). *Conclusions:* The present study led us to conclude that: 1- there was no statistically significant difference between TNF- α expression on premature rupture of membranes and labor membrane rupture; 2- in the Study group, we did not observe statistically significant correlation between TNF- α expression on ovular membranes and timing of rupture; 3- in the Study group, we observed statistically significant difference between expression of TNF- α and chorioamnionitis severity.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)