

Laís de Lima Franco

**APOPTOSE EM PLACENTA DE MULHERES COM E SEM INFECÇÃO POR
*Streptococcus agalactiae***

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais

2009

Laís de Lima Franco

**APOPTOSE EM PLACENTA DE MULHERES COM E SEM INFECÇÃO POR
*Streptococcus agalactiae***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.
Área de Concentração: Patologia Geral
Orientador: Prof. Anilton Cesar Vasconcelos

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais

2009

**Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca da Universidade Federal de Minas Gerais**

Cxxxp	Franco, Lais de Lima Apoptose em placenta de mulheres com e sem hipótese de infecção por <i>Streptococcus agalactiae</i> / Franco, Lais de Lima. Belo Horizonte, 2009. xpp. ilus. Dissertação.(Mestrado).Patologia. Universidade Federal de Minas Gerais. 1.Apoptose/patologia 2.Placenta 3.Streptococcus 4.Maturação placentária/ 5.Infecções por streptococcus agalactiae 6.Reação em cadeia da polimerase 7.Patologia placentária I.Título xxx: xx xxx XXX: xxx.xxx-xxx.x
-------	--

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado¹

Aluna: Laís de Lima Franco

Orientador: Prof. Dr. Anilton Cesar Vasconcelos

MEMBROS:

1. Prof. Dr. Antônio de Pinho Marques Júnior – Escola de Veterinária da UFMG

2. Prof. Dr. Pedro Alves Campos – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

3. Prof. Dr. Anilton Cesar Vasconcelos - Orientador

Curso de Pós graduação em Patologia

Universidade Federal de Minas Gerais

Data: 24/ 04/2009

¹ Folha de aprovação em anexo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que acreditam que a ousadia e o erro são caminhos para as grandes realizações.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela vida e pela coragem que sempre me dá para enfrentá-la;
- Aos meus pais, à vó Angelina, à irmã Thais, ao irmão Rene, por lutarem juntos e enfrentarem juntos os dois anos de enorme ausência e muita saudade;
- Ao grande amor da minha vida, Danilo, que respeitou minhas decisões, sonhos e incentivou essa longa jornada;
- A amiga irmã Danieli, que iniciou comigo essa jornada e mesmo não estando até o fim, me deu forças como se ainda estivesse ali no quarto ao lado;
- Ao Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos, pela oportunidade, amizade, ensinamentos e orientação;
- A toda equipe do laboratório de apoptose, Prof^a. Dr^a. Luciana Moro, Soraia, Bárbara, Núbia, Chico, Helô pela convivência alegre no laboratório.
- Ao Prof. Dr. Almir, Helen, Fabiana e Gissandra, colaboradores e colegas de horas sofridas no laboratório;
- Ao professor Evanguedes Kalapothakis pelo elevado espírito humano e pela grande contribuição na melhoria dos resultados e a toda sua equipe;
- Ao meu parceiro Rafael, que participou de todos os momentos, que me viu rir e chorar e que estará pra sempre no meu coração;
- Ao meu chicletinho Camila, que esteve do meu lado ajudando no que fosse possível, buscando ideais e soluções;
- Aos demais colegas de pós-graduação com os quais dividi disciplinas e histórias de vida. Em especial, ao pessoal do NIPE e Letícia;
- Às meninas do laboratório de histotécnica, pelo tempo dedicado e pelos dedos cruzados.

- Aos demais professores do mestrado, obrigada pelos ensinamentos;

- À equipe do Hospital das Clínicas, que estava sempre sorrindo, mesmo depois de longas horas de plantão, e também à todas as mães que aceitaram participar dessa pesquisa;

- Ao povo mineiro que me recebeu de braços e coração aberto e que me fez derramar muitas lágrimas por ter que me despedir, mas *“jamais Adeus, e sim até breve”*;

- A tantas outras pessoas com as quais fui agraciada de conviver nestes anos e que muito me fizeram crescer.

RESUMO

Os avanços recentes da Obstetrícia e da Neonatologia melhoraram o atendimento à gestante e ao recém nascido (RN), identificando fatores que elevam a morbi-mortalidade materna e fetal. Dentre os principais fatores de risco para a sepse neonatal precoce está o trabalho de parto prematuro (TPP) e a ruptura prematura de membranas (RPM) que aumentam as chances de colonização materna pelos estreptococos do Grupo B (EGB). Essa bactéria pode estar presente em até 30% das gestantes, sendo que a prevalência estimada na endocérvix é entre 9% e 14%. A maturação placentária é parte intrínseca do desenvolvimento de tecidos na gestação. A apoptose tem papel crítico nos diferentes estágios de desenvolvimento placentário, incluindo a invasão intersticial e endovascular e a tolerância imunológica materna a diferentes microorganismos invasores. Esse trabalho tem com objetivo estudar a ocorrência de apoptose como fator de maturação em 24 placentas de mulheres com e sem hipótese de infecção por *Streptococcus sp* através de técnicas moleculares (Reação de Polimerase em Cadeia utilizando-se sondas para *Streptococcus agalactiae*) e morfométricas (Quantificação da apoptose celular), sendo 12 dessas positivas e 12 negativas. A quantificação total das células em apoptose não demonstrou diferenças entre placentas positivas para estreptococos ($53,03 \pm 1,629$) e material controle ($52,64 \pm 1,603$), mas qualitativamente constatou-se nas placentas infectadas apoptose mais frequente ao redor de grumos bacterianos. Vários fatores parecem influenciar a ocorrência de apoptose, aumentando ou diminuindo o processo na placenta infectada: idade gestacional, parto, ruptura das membranas, imunidade materna, sintomatologia e até mesmo quantidade de bactérias presentes.

PALAVRAS CHAVES: Apoptose, placenta, *Streptococcus*, infecção neonatal

ABSTRACT

Recent advances in Obstetrics and Neonatology improved the attendance to the pregnant and newborn, identifying factors that raise maternal and fetal morbi-mortality. Amongst the main risk factors for neonatal sepsis are the premature parturition and the premature rupture of membranes, which increases the chances of maternal colonization by the Group B Streptococcus. These bacteria may appear in up until 30% of the pregnant, and its prevalence is estimated at the endocervix in between 9% and 14%. Placental maturation is an intrinsic part of the tissue development during pregnancy. Apoptosis seems to have a critical role in different stages of placental development, in the interstitial and endovascular invasion and in the maternal immunological tolerance to the different invading microorganisms. The objective of this paper was to study the occurrence of apoptosis as a factor of maturation in 24 placentas of women with (12) and without (12) hypothesis of infection for *Streptococcus sp* through molecular (Polimerase Chain Reaction using primers to *Streptococcus agalactiae*) and morphometrical (Quantification of cellular apoptosis) approaches. Quantification of apoptotic cells did not show differences between *streptococcus* colonized placentas ($53,03 \pm 1,629$) and control placentas ($52,64 \pm 1,603$), although qualitatively more frequent apoptosis was found around bacterial clusters. Several factors seem to interfere with placental apoptosis, increasing or decreasing the turnover in infected placenta: gestational age, parturition, rupture of the membranes, maternal immunity, symptomatology and also quantity of bacteria.

KEY-WORDS: apoptosis, placenta, streptococcus, neonatal infection

SUMÁRIO

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	11
Lista de figuras e gráficos	13
1. Introdução	15
2. Revisão da Literatura	16
2.1. Estreptococos	18
2.2. Estreptococos do Grupo B e Transmissão ao neonato	19
2.3. Apoptose	23
3. Objetivos	26
3.1. Objetivo Geral	26
3.2. Objetivos Específicos	26
4. Amostras	27
4.1. Critérios de inclusão	27
4.2. Critério de exclusão	27
5. Metodologia	28
5.1. Biologia Molecular	28
5.1.1. Quantificação do DNA total	29
5.1.2. PCR	29
5.1.3. Seleção e Síntese dos iniciadores específicos (PRIMERS)	29
5.2. Histopatologia	30
5.3. Morfometria	30
5.4. Estatística	31
6. Resultados	32
6.1. Extração e quantificação do DNA	32

6.2. PCR	33
6.3. Coloração	34
6.4. Estatística	36
7. Discussão	41
8. Conclusões.....	47
9. Referencias Bibliográficas	48
10. Anexos	56

SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AT -	A termo
ATP	Adenosina trifosfato
CT	Citotrofoblasto
CDC	Center for Disease Control and Prevention
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Mix de nucleotídeo
EDTA	Ácido etilenodiamino
EtBr	Brometo de etídio
ETOH	Etanol
g	Grama
EGB	Estreptococos do grupo B
et al	e colaboradores
HC	Hospital das Clinicas
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
Kb	Kilobase
FasL	Proteína transmembranosa indutora de apoptose
IG	Idade gestacional
IA	Índice apoptótico
IgG	Imuno globulina G.
IgA	Imuno globulina A
Kda	Kilodaltons
M	Molar
mg	Miligrama
Mg +2	Íon magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
µg	micrograma.
µl –	microlitro
mM	milimolar
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
OD	densidade óptica
p/v	Peso por volume
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
pmol	Picomol
PT	Prematuro
UV	Ultra-violeta
v/v	Volume por volume
µl	Micrograma
pRb	Microlitro
E.F	Proteína do retinoblastoma fosforilada
rpm	Rotação por minuto

RN	Recém-nascido
ST	Sinciciotrofoblasto
RPM	Ruptura prematura de membranas
TPP	Trabalho de parto prematuro
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
Σ	somatória

LISTA DE FIGURAS E GRAFICOS

- Figura 1.** Gel de agarose 1,8% corado com Brometo de Etídeo mostrando a fragmentação internucleossômica (padrão em escada) de DNA genômico extraído de placenta, característico da apoptose..... 32
- Figura 2.** . Eletroforese dos amplicons em Gel de agarose mostrando resultado da PCR dos diferentes pares de primers..... 33
- Figura 3.** Gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídeo mostrando o resultado do diagnostico da PCR, deixando claro a presença ou não da bactéria *Streptococcus agalactiae*..... 34
- Figura 4.** Gel de acrilamida corado com prata mostrando a presença de quantidades menores de bactérias através do método da *Nested PCR*..... 34
- Figura 5.** Fotomicrografia de placenta infectada, corada pelo método de *Brown and Hopps*, com objetiva de 40x, mostrando a presença de grumos bacterianos Gram positivos corados em roxo..... 34
- Figura 6.** Fotomicrografia de placenta infectada corada pelo método de *Brown and Hopps*, com objetiva de 5x mostrando a presença de grumos bacterianos Gram negativos corados em róseo 34
- Figura 7.** Fotomicrografia de placenta controle corada pela Hematoxilina Eosina sem grumos bacterianos, com objetiva de 40x, evidenciando poucas células apoptóticas..... 35
- Figura 8.** Fotomicrografia de placenta infectada, com objetiva de 40x, corada pela Hematoxilina Eosina com grumos bacterianos e maior índice de células apoptóticas..... 35
- Figura 9.** Fotomicrografia de placenta controle, com objetiva de 5x, processada pela técnica de TUNEL mostrando pouca marcação de células em apoptose..... 36
- Figura 10.** Fotomicrografia de placenta infectada, com objetiva de 5x,

processada pela técnica de TUNEL mostrando a maior quantidade de marcação de células em apoptose próximo aos grumos bacterianos.	36
Figura 11. Fotomicrografia de placenta infectada corada pelo HE e contra corada com <i>Brown and Hopps</i> , com objetiva de 40x com maior frequência de células apoptóticas próximas dos grumos bacterianos.....	37
Figura 12. Fotomicrografia de placenta controle corada pela HE contracorada por <i>Brown and Hopps</i> , com objetiva de 40x, mostrando células em apoptose esparsas e ausência de grumos bacterianos	37
Gráfico 1. Distribuição das células em apoptose nas amostras de placentas positivas e negativas à infecção com <i>Streptococcus</i>	36
Gráfico 2. Distribuição das células em apoptose nas amostras de placentas de parto Cesário a termo positivas e negativas à infecção com <i>Streptococcus</i>	38
Gráfico 3. Distribuição das células em apoptose nas amostras de placentas de parto Cesário pré termo positivas e negativas à infecção com <i>Streptococcus</i>	38
Gráfico 4. Distribuição das células em apoptose nas amostras de placentas de parto normal a termo positivas e negativas à infecção com <i>Streptococcus</i>	39
Gráfico 5. Distribuição das células em apoptose nas amostras de placentas de parto normal pré termo positivas e negativas à infecção com <i>Streptococcus</i>	39
Gráfico 6. Distribuição das células em apoptose nas amostras de placentas com ruptura prematura das membranas e ruptura induzida.....	40

INTRODUÇÃO

Os avanços da medicina, principalmente na segunda metade do século XX, tornaram possíveis à Obstetrícia e à Neonatologia melhoras no atendimento à gestante e ao recém nascido (RN), identificando fatores que elevam a morbi-mortalidade materna e fetal. Um desses fatores, a prematuridade, teve ampliado o conhecimento dos seus fatores de risco, das necessidades metabólicas, nutricionais e de suporte respiratório desses RN, aumentando a sobrevivência daqueles anteriormente considerados inviáveis. Identificada como um dos fatores de risco para a prematuridade, a infecção materno-fetal foi reconhecida como oportunista, conhecido seus aspectos fisiopatológicos e os agentes infecciosos mais freqüentes nessa faixa etária. Todos esses dados permitiram que o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) americano criasse protocolos de conduta frente aos agentes responsáveis pelas infecções materno-fetais nos anos 90. O diagnóstico precoce e o início da antibioticoterapia, além do manejo adequado desses RN, podem reduzir de maneira significativa a morbidade e a mortalidade da infecção neonatal.

As mulheres albergam os Estreptococos do Grupo B (EGB) como parte da flora fecal e vaginal normal. Os índices de portador assintomático variam de 5% a 40% (SAVOIA, 1996; REGAN *et al.*, 1991). O EGB foi identificado como o agente mais freqüentemente responsável pelas septicemias neonatais em países industrializados. Nos países em desenvolvimento, a infecção pelo EGB é considerada rara entre os neonatos, entretanto poucos trabalhos relatam à incidência e a característica da doença (KA KURUVILLA *et al.*, 1999).

Duke *et al.* (1996) relataram que a manutenção dos organismos vivos depende do balanço equilibrado entre a habilidade de produzir novas células e a capacidade de eliminar células individuais desnecessárias, danificadas ou prejudiciais. Muitas células de um organismo vivo morrem para que o conjunto sobreviva. Assim, como é preciso gerar novas células para manter os processos vitais, é imprescindível eliminar as supérfluas ou defeituosas.

Recentemente Manning *et al.* (2006) demonstraram a ocorrência natural de anticorpos contra uma proteína específica da superfície o EGB em mulheres grávidas e seus respectivos recém-nascidos. Foi observada uma correlação linear entre os níveis de

anticorpos maternos e do RN, comprovando que anticorpos naturais anti-EGB atravessam a barreira transplacentária e conferem proteção aos RN.

Lin *et al.* (2001) demonstram que os RN filhos de mães com níveis de anticorpos anti-EGB sorotipo Ia maior que 5 µg/ml, apresentavam risco de desenvolver sepse por essa bactéria 88% menor que em relação aos filhos de mães com níveis de anticorpos anti-EGB inferiores a 0,5 µg/ml. Estudo semelhante realizado em 2004 mostrou que RN filhos e mães com níveis de anticorpos anti-EGB sorotipo III acima de 10 µg/ml apresentavam risco de desenvolver sepse por esta bactéria 91% menor em relação aos filhos de mães com níveis inferiores a 2 µg/ml (LIN *et al.*, 2001).

Anticorpos maternos específicos contra o polissacarídeo capsulares do EGB atuam como protetores fundamentais contra infecção neonatal e a doença invasiva, visto que os RN produzem anticorpos tardiamente em resposta a infecção e respondem fracamente aos polissacarídeos capsulares (BAKER *et al.*, 1981).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Em 1999, Mussi-Pinhata *et al.* observaram que mesmo variando entre as populações estudadas, essas infecções acometiam até 10% dos nascidos vivos e os fatores que determinavam o acometimento do feto e as conseqüências da sua infecção eram: [i] estado imunitário materno; [ii] características do agente infeccioso, [iii] defesa placentária e [iv] idade gestacional (IG) da aquisição da infecção materna. Observaram também que a via hematogênica transplacentária era a mais comum para a transmissão da infecção materno-fetal e que geralmente a placenta era mais “vulnerável” à passagem de agentes microbianos quanto mais tardia a gestação. A proteção ao feto era mais eficiente no início da gestação e, após a 20^a-25^a semanas, o feto já apresentava um esboço de resposta imunológica específica (mesmo que ainda imatura). Além disso, o feto ainda contaria com a imunidade passiva humoral representada pela IgG materna cuja concentração se elevava ativa e progressivamente na segunda metade da gestação. Embora a transmissão de infecção no início da gestação levasse mais freqüentemente ao óbito fetal, a infecção na segunda metade da gestação era assintomática ou inaparente ao nascimento, podendo causar doenças no período neonatal precoce ou tardio ou ainda às seqüelas tardias.

Infecções neonatais precoces ocorrem durante a primeira semana de vida e são as mais prevalentes, correspondendo a 80% dos casos, enquanto que a doença tardia (após a primeira semana de vida) corresponde ao restante dos casos de infecção pelo Estreptococo do grupo B (EGB) em recém-nascidos (SCHUCHAT, 1998). Cerca de 80% dos casos de doença neonatal precoce ocorrem nas primeiras 24 horas de vida (BAKER, 1997; SCHUCHAT, 1998). De 25% a 36% dos casos ocorrem em recém-nascidos prematuros (PT) (ZANGWILL *et al.*, 1992; ODDIE e EMBLETON, 2002) com taxa de caso-fatalidade (número de óbitos atribuíveis à doença no grupo de RN acometidos pela mesma) maior que em recém-nascidos a termo (AT) (CDC, 1997; SCHUCHAT *et al.*, 2001). A taxa de caso-fatalidade para recém-nascidos com menos de 33 semanas de gestação é de 30%, três vezes maior que a observada entre 34 e 36 semanas e quinze vezes maior que a de recém-nascidos com 37 semanas ou mais (SCHRAG *et al.*, 2000). A maior susceptibilidade do prematuro pode estar relacionada à menor passagem transplacentária de anticorpos protetores, uma vez que dois terços da imunoglobulina G materna são transmitidos ao feto após a 30^a semana de gestação. Além disso, o recém-

nascido PT é portador de deficiências imunológicas nas vias alternada e clássica do sistema de complemento e na capacidade de fagocitose (DORAN e NIZET, 2004).

A sepse neonatal precoce ocorre dentro de 72 horas após o nascimento e geralmente se manifesta com desconforto respiratório e pneumonia, porém pode instalar-se rapidamente, com achados clínicos inespecíficos. Dentre os principais fatores de risco para a sepse neonatais precoces estão os trabalhos de parto prematuro (TPP) e a ruptura prematura de membranas (RPM) (AGGARWAL *et al.*, 2001; BERGSTRÖM, 2003). Apesar de não haver etiologia definida em aproximadamente 50% dos casos (MCDONALD *et al.*, 1991), há múltiplas linhas de evidência que sustentam a hipótese de infecção como um dos fatores determinantes de TPP e RPM (MCGREGOR *et al.*, 1988; ROMERO *et al.*, 1988; GIBBS *et al.*, 1992; LAMONT e FISK, 1993; KING e FLENADY, 2002; KENYON *et al.*, 2003).

A incidência de septicemia neonatal precoce situa-se entre 1 a 10 casos por 1000 nascidos vivos, mas pode ser de três a cinco vezes maior dependendo da presença de fatores predisponentes para a infecção neonatal (MCCRACKEN *et al.*, 1990; MCCRACKEN *et al.*, 1987; SIEGEL *et al.*, 1981), por isso avaliou-se alguns fatores importantes separadamente a fim de correlacionar melhor com o que condiz na literatura.

A presença de bactérias na cavidade intra-amniótica pode causar infecção, ou limitar-se à colonização, sem causar sintomatologia clínica, nem na mãe nem no feto, em ambos ou num deles (GIBBS, 1990; KLEIN e MARCY, 1990; KLEIN, e REMINGTON, 1990; ROMERO *et al.*, 1991). A presença de infecção depende de fatores relacionados à bactéria, à defesa local e inespecífica do meio, das reações que ocorrem na interação entre a bactéria e o hospedeiro e das situações que possam alterar estes fatores (BAKER e EDWARDS, 1990; BAKER e EDWARDS, 1987; WILSON, 1990).

Entre os fatores predisponentes e de risco mais importantes para a septicemia neonatal encontramos a prematuridade e, conseqüentemente, os fatores que a promovem. Esses fatores estão relacionados com o: i) hospedeiro (prematuridade, gemelaridade, mesmo quando controlada quanto ao baixo peso e à idade gestacional, erros inatos do metabolismo, diferenças no sistema imune do RN em relação aos lactentes e crianças maiores, monitorização fetal, manipulação obstétrica, esforços vigorosos de ressuscitação); ii) fatores maternos (etnia, saúde e flora bacteriana vaginal);

iii) fatores ambientais facilitando a transmissão de germes da microbiota vaginal por via ascendente (ruptura das membranas fetais por um período maior que 24 horas) são reconhecidos como causadores de septicemia neonatal.

Os microorganismos podem ganhar acesso à cavidade amniótica e ao feto das seguintes formas: ascensão da vagina e do colo, disseminação hematogênica através da placenta (infecção transplacentária), contaminação retrógrada da cavidade amniótica, via tubas uterinas, e em procedimentos invasivos como amniocenteses, cordocenteses e biópsias de vilos coriônicos (ROMERO *et al.*, 2003).

Ao instalar-se nas membranas, ou já no líquido amniótico, a bactéria pode iniciar uma cascata de reações do hospedeiro, quer diretamente por produção de enzimas proteolíticas que diminuirão a integridade da membrana, quer indiretamente por ativação do sistema peroxidase, ou por desencadear a formação dos derivados do metabolismo do ácido aracdônico. Ao ser fagocitada pelos macrófagos existentes no âmnio, decídua e cório placentária, a bactéria poderá ativar o sistema peroxidase, favorecendo a formação de radicais livres que propiciarão a destruição tissular local, com necrose e clivagem entre as pontes peptídicas do colágeno aí existentes, além de ativar outras collagenases (ROMERO *et al.*, 1988; ROMERO *et al.*, 1991).

A causa mais comum de infecção intra-uterina é a via ascendente (GOLDENBERG *et al.*, 2000; GARLAND *et al.* 2002; BERGSTRÖM 2003; ROMERO *et al.*, 2003). A infecção ascendente intra-uterina possui quatro estágios. O primeiro consiste em uma mudança na microbiota biológica vaginal e cervical e/ou a presença de microorganismos patogênicos na cérvix. A ruptura das membranas não é um pré-requisito para infecção intra-amniótica, pois os microorganismos podem atravessar as membranas intactas. Uma vez na cavidade amniótica, as bactérias podem chegar ao feto por diferentes portas de entrada.

As infecções ascendentes são observadas principalmente, depois de ruptura das membranas sendo sua incidência aumentada em proporção direta ao tempo da bolsa rota. A presença de bactérias na cavidade amniótica é detectada em quase 100% dos casos após 24 horas de bolsa rota, o mesmo acontecendo com a manipulação excessiva da gestante, pois favorece a contaminação da cavidade amniótica. Porém, em apenas 5%

a 10% dos casos de amnionite se observa infecção fetal. Por outro lado, em 5% dos casos, encontramos bactérias no líquido amniótico, com bolsa íntegra (GOMES, 1985; CDC, 2002; CHEN *et al.*, 2002; ODDIE e EMBLETON, 2002).

Pela via transplacentária, o germe que atingiu diretamente a corrente sanguínea materna pode levar às seguintes conseqüências, bacteremia fetal e sepse (ROMERO e MAZOR, 1988). A contaminação fetal, além da via ascendente, pode ocorrer através do canal de parto, sendo decorrente de aspiração de secreções vaginais (DORAN e NIZET 2004).

Neste contexto, é fundamental identificar em que situações a gestante é mais susceptível à colonização e ascensão de patógenos, e qual o papel do muco cervical no mecanismo de defesa contra a as infecções do trato genital inferior. Sabe-se que o trato genital feminino possui vários sistemas de defesa contra o risco de infecções, sendo os mesmos complementares, aditivos e sinérgicos.

2.1. ESTREPTOCOCOS

Segundo Santos (1999), “a primeira vez em que foi isolado microorganismo esférico disposto caracteristicamente em cadeia foi em 1874, por Billroth, ao analisar material purulento coletado de pacientes com erisipela”.

Em 1884, Rosenhac (apud TCHARNIAKOVSKY, 1976) empregou pela primeira vez o nome *Streptococcus* (do grego *strepto* = cadeia) para designar essa bactéria, que posteriormente foi responsabilizada por várias infecções e encontrada como saprófita do homem e de animais.

Os estreptococos são bactérias Gram positivas, esféricas ou ovóides, na sua grande maioria imóveis, menores que 2 µm de diâmetro. Apresentam-se em cadeias em meio líquido e aos pares quando *in vivo*. São classificados como pertencentes à família *Streptococcaceae*, gênero *Streptococcus*, com 21 espécies diferentes.

Os estreptococos são classificados de acordo com a sua capacidade de provocar lise (morte celular) em eritrócitos, em alfa (hemólise incompleta), beta (hemólise total) ou gama (nenhuma hemólise)-hemolítico. Também podem ser classificados de acordo com

os Carboidratos nas suas membranas, de acordo com a classificação de Lancefield de 1933 ainda usada.

Grupo A: *Streptococcus pyogenes* é o mais importante: beta-hemolítico causa a faringite estreptocócica, a mais comum forma de faringite. São as espécies mais patogênicas para o ser humano, embora o mesmo seja seu hospedeiro natural.

Grupo B: *Streptococcus agalactiae*: pode ser beta ou gama-hemolítico. Causam mais freqüentemente infecções perigosas nos recém-nascidos (ex: sepse neonatal) e infecções articulares (artrite séptica) e cardíacas (endocardite).

Grupos C e G: *Streptococcus pneumoniae* ou pneumococo, são alfa-hemolítico. Freqüentemente são transportados por animais, mas também crescem na orofaringe, no intestino, na vagina e no tecido cutâneo do ser humano. Esses estreptococos podem causar infecções graves, como a faringite estreptocócica, pneumonia, infecções cutâneas, sepse pós-parto e neonatal, endocardite e artrite séptica.

Grupo D e enterococos: *Streptococcus viridans*, Grupo de espécies de características muito similares. São freqüentes nos dentes e podem causar abscessos dentários ou endocardite. Uma espécie é o *Streptococcus mutans* que pode causar cáries devido à produção de ácidos que danificam o esmalte.

2.2. ESTREPTOCOCOS GRUPO B E TRANSMISSÃO AO NEONATO

O reservatório primário do EGB é o trato gastrintestinal, sendo o trato geniturinário o segundo local mais comum de sua detecção. No entanto, o EGB já foi isolado dos mais variados locais e em diversas situações clínicas envolvendo recém-nascidos, adultos jovens e idosos, tanto do sexo masculino como do feminino (MANNING *et al.*, 2004). Pode causar doença invasiva, que ocorre com maior freqüência entre zero e noventa dias de vida, voltando a ser mais prevalente entre idosos (ZANGWILL *et al.*, 1992).

O principal agente etiológico que tem sido pesquisado, relacionado à sepse neonatal precoce e colonização materna, é o EGB (SCHUCHAT *et al.*, 2000). Esta bactéria pode estar presente em até 30% das gestantes, sendo que a prevalência estimada na endocérnix é entre 9% e 14% (HORDNES *et al.*; 1996; REGAN *et al.*; 1996; FEIKIN *et al.*, 2001).

O EGB também está relacionado à corioamnionite, endometrite, sepse materna e infecção de trato urinário durante a gestação (ZANGWILL *et al.*, 1992; YANCEY *et al.* 1994; KROHN *et al.*, 1999).

Algumas opções têm sido investigadas para reduzir a ocorrência de sepse neonatal por EGB, incluindo a identificação das gestantes de risco e os tratamentos pré-natais, intraparto e neonatal.

O maior fator de risco para a infecção neonatal pelo EGB é a colonização materna no momento do parto. Outros fatores de risco são a prematuridade, a ruptura prematura de membranas, a presença de febre no trabalho de parto e a infecção urinária por EGB na gestação (BENITZ *et al.*, 1999; MOHAMMAD *et al.*, 2002; ODDIE e EMBLETON 2002; SCHRAG *et al.*, 2002).

A importância da detecção de gestantes colonizadas pelo EGB se deve a chance de se fazer profilaxia da transmissão vertical desse agente, através do uso de antibióticos, reduzindo o risco de doença neonatal e suas seqüelas (CDC, 1996; BROZANSKY *et al.*, 2000; SCHUCHAT *et al.*, 2001; VOLUMENIE *et al.*, 2001).

Por outro lado, o uso de antibiótico para profilaxia de infecção e sepse neonatal, visando aos microorganismos de maneira geral, tem sido objeto de estudos e ainda é controverso. Segundo a última revisão da biblioteca eletrônica Cochrane, nos casos de ruptura prematura pré-termo de membranas, a administração de antibióticos seria indicada, com redução de corioamnionite materna, aumento do tempo de latência até o parto e redução de infecção neonatal, do uso de surfactante e da necessidade de O₂ (KENYON *et al.*, 2003). Já nos casos de trabalho de parto prematuro, sem evidência clínica de infecção, ainda não foram reconhecidos benefícios maternos e fetais com o uso de antibióticos. Nessa revisão, os autores admitem a necessidade de identificar marcadores de infecção e, talvez nestes casos, a antibioticoterapia dirigida seria benéfica (KING e FLENADY, 2002).

As conseqüências da infecção em RN envolvem desde sepse, pneumonia e meningite até seqüelas neurológicas, visuais e auditivas graves e debilitantes em 15% a 30% dos recém-nascidos infectados, podendo levar ao óbito neonatal (BEARDSALL *et al.*, 2000). Na maioria dos casos, os sintomas são evidentes seis a oito horas após o nascimento. Esta precocidade sintomática sugere que a ascensão através das

membranas amnióticas, íntegras ou rotas, seja o evento básico que leva ao contato do EGB com tecidos fetais, uma vez que há relatos de isolamento dessa bactéria no compartimento amniótico de mulheres com ruptura de membranas, óbitos fetais e abortos (SPELLERBERG, 2000; BLACKWELL *et al.*, 2003). A contaminação através do canal de parto, outra forma descrita de transmissão do agente para o RN, pode ocorrer pela aspiração de secreções vaginais (DORAN e NIZET, 2004).

Um evento já descrito é a presença de sofrimento fetal intraparto ou anteparto como manifestação intra-uterina de sepse (KEOGH *et al.*, 1999; BRIGANTI *et al.*, 2002). Outra situação relacionada a este tipo de manifestação é o óbito fetal sem causa aparente e, em alguns estudos, o EGB foi um agente freqüentemente isolado em culturas de líquido amniótico e placenta (TOLOCKIENE *et al.*, 2001).

A colonização do trato genital depende da adesão de proteínas de superfície do EGB à fibronectina, laminina e ao fibrinogênio da mucosa vaginal (SCWARTZ-LINEK *et al.*, 2004). A persistência da colonização está relacionada à ligação de uma proteína de clivagem da fração C5a do complemento com a fibronectina não solúvel, o que impede a opsonização e a remoção do EGB do epitélio vaginal (DORAN e NIZET, 2004).

A invasão dos tecidos fetais ocorre através da ligação principalmente com células coriônicas. O desencadeamento da produção local de prostaglandinas e radicais livres fragilizam a membrana amniótica e predispõe tanto à sua ruptura quanto à ocorrência do trabalho de parto (BENETT *et al.*, 1987). O EGB também pode invadir a cavidade amniótica íntegra a partir da ascensão por contato direto com as membranas e, através do líquido amniótico, atingir o pulmão, que passa a ser o órgão central na patogênese da disseminação da infecção (BURNHAM e TYRRELL, 2003). Ocorre captação pelas células alveolares e endoteliais pulmonares e dentro destas o EGB produz uma beta-hemolisina que lesa diretamente a membrana celular, formando poros e permitindo a invasão da corrente sanguínea, além de promover a apoptose e a destruição de linfócitos e macrófagos (TYRRELL *et al.*, 2002). Essa beta-hemolisina também estimula a produção de interleucina-8, uma potente citocina pró-inflamatória, aumentando a lesão pulmonar (DORAN e NIZET, 2004). Essa ação citolítica e pró-inflamatória do EGB pode ser inibida pelo principal componente do surfactante pulmonar, a dipalmitoil fosfatidilcolina, o que

pode explicar, em parte, a maior susceptibilidade do prematuro à doença invasiva, já que o mesmo possui esta substância em menor quantidade (DORAN *et al.*, 2002).

Outros fatores de invasão celular são a produção de hialuronidase, que degrada o tecido conjuntivo, e o chamado fator CAMP, uma proteína extracelular que forma poros e provoca lise de membranas celulares do hospedeiro (SPELLERBERG, 2000).

Outro aspecto importante e que confere intensa virulência é a evasão imunológica, ou seja, a presença de mecanismos que dificultam o reconhecimento do EGB pelo hospedeiro. O EGB pode ser imunologicamente classificado em nove sorotipos diferentes, classificação esta baseada na conformação molecular do polissacarídeo capsular. Este polissacarídeo é composto de uma seqüência de carboidratos conjugados a um terminal de ácido siálico (BURNHAM e TYRRELL, 2003). Os sorotipos são classificados em Ia, Ib, Ic e II a VII. Esta conformação da cápsula também está presente na superfície de várias membranas celulares de mamíferos, proporcionando uma “camuflagem” extremamente eficiente, impedindo o reconhecimento e a fagocitose do EGB pelas células do hospedeiro. Cepas de EGB não-capsuladas, raramente causadoras de doença em humanos, são mais facilmente removidas pelo sistema imunológico (DORAN e NIZET, 2004).

A capacidade de sobreviver por longos períodos dentro de lisossomas de macrófagos, a produção da enzima superóxido-dismutase e de um pigmento carotenóide, que protegem contra o estresse oxidativo e a inibição da atividade do sistema complemento, reduzem ainda mais a capacidade de reconhecimento e ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, especialmente no recém nascido prematuro (SPELLERBERG, 2000).

A ativação de processos inflamatórios através de outras proteínas de superfície do EGB é responsável pela sepse e pela disfunção de múltiplos órgãos, mediadas principalmente pelo fator de necrose tumoral alfa e pela interleucina- 1, além de outras citocinas produzidas pelo hospedeiro. A beta-hemolisina está associada à produção de óxido nítrico e hipotensão arterial. O processo inflamatório é mais intenso no cérebro e nas meninges, estimulado pelo endotélio da barreira hemato-encefálica (DORAN *et al.*, 2002).

Devido ao seu potencial de causar infecções graves nos recém-nascidos, é importante saber o que pode estar associado à colonização materna. Os fatores de risco sócio-demográficos para colonização pelo EGB foram objeto de vários estudos.

O maior deles, que envolveu 7.742 mulheres, do grupo intitulado *Vaginal Infections and Prematurity Study Group*, demonstrou que nenhuma das variáveis estudadas permitia selecionar um grupo específico de mulheres com alta probabilidade de estarem colonizadas e que o rastreamento seletivo não seria útil (REGAN *et al.*, 1991).

A partir de mãe infectada, o recém-nascido tem 50% de chance de nascer infectado. De 50% dos recém nascidos infectados, 2% apresentarão doença invasiva, ou seja, sepse precoce, pneumonia e/ou meningite (BAKER e EDWARDS, 1995). Recém-nascidos de mães colonizadas têm um risco 29 vezes maior de desenvolver sepse precoce quando comparados a recém-nascidos de mães com culturas pré-natais negativas (BOYER e GOTOFF, 1986). Fatores microbiológicos e imunológicos, como o sorotipo de EGB, grandes inóculos bacterianos e baixos níveis de anticorpos contra o polissacarídeo capsular da cepa infectante, são importantes fatores de risco (LIN *et al.*, 2004).

A importância da detecção de gestantes infectadas pelo EGB decorre da possibilidade de fazer a profilaxia da transmissão vertical deste agente, reduzindo o risco de doença neonatal e suas seqüelas.

2.3. APOPTOSE

Apoptose é parte intrínseca do desenvolvimento de tecidos e órgãos sendo descrita também no feto e na placenta (COSTA *et al.*, 2003). Considera-se, na atualidade, que a apoptose tem papel crítico nos diferentes estágios de desenvolvimento placentário, incluído a invasão intersticial e endovascular e a tolerância imunológica materna a diferentes microorganismos invasores (COSTA *et al.*, 2003).

É um mecanismo controlado de eliminação de células. Trata-se de um fenômeno ativo, naturalmente controlado, iniciado ou inibido por vários estímulos, fisiológicos ou patológicos que inclui a fragmentação nuclear (KERR, 1993). Em contraste com a degradação aleatória do DNA que ocorre em células em necrose, a degradação do DNA

em células apoptóticas conduz á formação de fragmentos que são múltiplos de 180 Pb. A necrose difere da apoptose por representar um fenômeno hipobiótico irreversível, causado por um agressão intensa. Trata-se, pois da degradação progressiva das estruturas celulares sempre que existam agressões ambientais graves. É interessante salientar que o mesmo agente etiológico pode provocar tanto necrose quanto apoptose, sendo que a intensidade da agressão parece ser o fator determinante do tipo de morte celular. Já a apoptose é um mecanismo que regula o tamanho dos tecidos, exercendo um papel oposto ao da mitose. Pode ocorrer fisiologicamente em várias situações como: células que não possuem funções no organismo, células geradas em excesso, células que se desenvolvem de forma imprópria, células que já desempenharam suas funções e aquelas que podem ser prejudiciais e devem ser eliminadas. Sua ausência ou estímulo pode resultar em conseqüências desastrosas para os tecidos (VASCONCELOS e VASCONCELOS, 1996).

A indução de apoptose seja através de mecanismos imunológicos, seja por outros mecanismos homeostáticos específicos, parece ser extremamente importante no processo de eliminação de células alteradas. Danos não reparáveis no DNA, aparentemente iniciam o processo de apoptose. É importante salientar que muitos dos genes que condicionam a proliferação celular (chamados oncogenes e genes supressores de tumor) estão também envolvidos na iniciação do processo de apoptose. A inibição, por si só, do processo fisiológico da apoptose, leva à sobrevivência prolongada das células, favorecendo o acúmulo de mutações e a transformações malignas. Assim, a apoptose representa um mecanismo de eliminação seletiva de células cuja sobrevivência poderia prejudicar o bem estar do organismo (VASCONCELOS e VASCONCELOS, 1996).

Na evolução da gestação, o trofoblasto, camada epitelial de origem fetal que separa o tecido materno do fetal, sofre modificações em suas camadas celulares. Estas alterações têm como objetivo diminuir a espessura do trofoblasto para facilitar a nutrição e a oxigenação fetal. Smith *et al.* (1997) demonstraram a ocorrência de apoptose no trofoblasto durante toda a gestação, com maior freqüência no terceiro comparado ao primeiro trimestre e na gravidez a termo, sugerindo ser este um processo normal da senescência placentária.

O sinciciotrofoblasto (ST) do vilo placentário humano é o epitélio presente nessa superfície de contato com o sangue materno, possuído citoplasma multinucleado. A regulação da apoptose no sinciciotrofoblasto é muito interessante porque esse é o único verdadeiro epitélio sincicial na biologia celular humana.

A identificação do apoptose nessa interface celular realça a importância de se entenderem os mecanismos que a controlam na placenta. Os conhecimentos atuais, no entanto, são iniciais para esclarecer como acontece a cascata de receptores de apoptose no trofoblasto, quais os fatores reguladores no desenvolvimento da placenta, quais os controladores do processo e se o descontrole levaria a disfunção placentária.

Analisar este fenômeno celular, que até a alguns anos atrás era pouco conhecido, deverá ampliar os conhecimentos na área da perinatologia, aumentando o entendimento sobre placentação normal e a disfunção placentária nas gestações de risco.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

* Estudar a ocorrência de apoptose como fator de maturação em placentas de mulheres com e sem hipótese de infecção por *Streptococcus sp*;

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

* Quantificar a apoptose nas placentas de mulheres com e sem hipótese de infecção por *Streptococcus sp*; através da morfometria do índice apoptótico.

* Confirmar a apoptose pela constatação da fragmentação internucleossômica do DNA genômico proveniente de placentas de mulheres positivas e negativas para estreptococos.

* Identificar a presença ou não do *Streptococcus agalactiae*, via reação de polimerase em cadeia em placentas de mulheres com e sem hipótese de infecção por *Streptococcus sp*.

* Confirmar a presença do *Streptococcus agalactiae* em amostras com baixa carga infecciosa, via reação de polimerase em cadeia do tipo *Nested* em placentas de mulheres com e sem hipótese de infecção por *Streptococcus sp*.

* Avaliar com base nos resultados obtidos para a apoptose e para a presença do *Streptococcus*, outros fatores envolvidos, considerando os dados clínicos presentes nas fichas das pacientes.

4. AMOSTRAS

Vinte e quatro amostras foram selecionadas dentre cerca de 50 colhidas no Hospital das Clínicas (HC – UFMG), em Belo Horizonte, de maneira a preencher os 12 casos com critérios positivos para estreptococos e 12 controles negativos. Os dados clínicos de cada paciente selecionada foram também considerados (ver formulário em anexo), após a avaliação da presença ou não de infecção e da quantidade de apoptose nas placentas. Estes dados posteriormente permitiram uma análise de fatores individuais que poderiam influenciar a incidência de apoptose na placenta.

Durante todo o procedimento de coleta manteve-se o máximo possível de rigor para obter material estéril. O acondicionamento foi realizado de acordo com os padrões exigidos para posterior processamento molecular (gelo seco) e morfológico (formol tamponado %)

4.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Participaram desse estudo: gestantes com história de infecção urinária (10), febre (8), bolsa rota por mais de 18 horas (12), adolescentes com idade inferior a 18 anos (6), gemelaridade (2) e que havia suspeita de infecção, confirmada posteriormente como sendo causada pelo Estreptococo do Grupo B, independente da idade gestacional em que se encontravam e que evoluíram para trabalho de parto, com parto por via baixa ou operatório. Algumas amostras de placenta apresentaram mais de um critério.

4.2. CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

Recém nascidos vivos de mães portadoras de testes sorológicos positivos para doenças infecciosas (HIV, CMV, hepatite, sífilis, toxoplasmose, rubéola e herpes).

5. METODOLOGIA

5.1. BIOLOGIA MOLECULAR

Para a extração de DNA foi utilizado o método descrito por Grimberg *et al.* (1989) com algumas modificações realizadas no Laboratório de Fisiologia e Genômica Funcional FGM/NUFIGEM (ICB-UFMG) para tecidos a fresco ou congelados em nitrogênio líquido. O rendimento de DNA é cerca de 100-200 µg por g de placenta. O tempo requerido foi de cerca de 8 horas.

5.1.1. QUANTIFICAÇÃO DO DNA TOTAL

5 µl do DNA total obtido foram diluídos em 95 µl de água Millipore estéril filtrada e essa diluição (1:20) foi utilizada para quantificação, em espectrofotômetro GeneQuant, do DNA total e a densidade óptica (O.D.) lida:

$$\text{O.D.260} = 260 \times 20 \times 50/1000 = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

(OD260/OD280 deve ser > 1.5)

Após a determinação da concentração, 1,0 µl (aproximadamente 500 ng) da amostra foi submetido ao PCR como descrito posteriormente.

5.1.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E NESTED PCR

Extraído e quantificado o DNA, procedeu-se à reação em cadeia da polimerase. Adicionou-se uma mistura (pré-mix) de *dNTPs* (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), primers (oligonucleotídeos ou iniciadores) específicos para o *Streptococcus agalactiae* e a enzima *Taq DNA polimerase* em uma solução tampão. Estes componentes foram colocados no termociclador, que utilizou ciclos de temperatura pré-estabelecidos e tempos exatos específicos para etapa da reação (conforme o fragmento a ser amplificado).

Quando a PCR padrão não foi conclusiva, realizou-se a *Nested PCR* para a amplificação de uma seqüência interna de um fragmento previamente amplificado.

Os resultados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% com Brometo de Etídio e transiluminados com ultravioleta ou Gel de acrilamida a 30% corado em prata.

5.1.3. SELEÇÃO E SÍNTESE DE INICIADORES ESPECÍFICOS (PRIMERS)

Os oligonucleotídeos iniciadores ou primers designados para amplificar pela PCR foram selecionados, e obtidos através do programa Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) sintetizados pela Prodmiol Biotecnologia a 25nmol desalinizado padrão.

Sequência de segmentos do genoma do *Streptococcus agalactiae* obtida no Blast:

```
1 AAGATAATCG GTTTTAAAGG AGATACCAAG AAAAATGAAT ATTTATGATC AATTGCAGCC
61 AGTTGAAGAT CGTTATGAAG AGTTAGGTGA GTTACTTAGT GATCCATATG TTGTTTCAGA
121 TACAAAGCGA TTTATGGAAT TATCACGTGA AGAAGCTAAT ACTCGAGAAA CTGTACACAGC
181 TTATAGAGAA TATAAGCAAG TCATTCAAAA TATTTTCAGAT GCTGAAGAAA TGATCAAGGA
241 TGCTTCTGGT GATGCTGAAT TGGAAGAAAT GGCTAAAGAA GAACTTAAAG AATCAAAAAGC
301 AGCTAAAGAA GAGTATGAAG AAAGATTAAT AATCCTTCTA TTACCTAAAG ATCCTAACGA
```

Primers sintetizados:

59-82F – 5'CAGTTGAAGA TCGTTATGAA GAG 3'(23pb)

79-105F – 5' AGAGTTAGGT GAGTTACTTA GTGATCC 3'(27pb)

164 -186F – 5'TCGAGAACCT GTCACAGCTT ATAG 3'(24pb)

187-164R – 5'CTCTATAAGC TGTGACAGTT TCTCG 3'(25pb)

273-235R - 5'GCCATTTCTT CCAATTCAGC 3'(20pb)

254-235R – 5'CATCACCAGA AGCATCCTTG 3'(20pb)

Dentre os pares de primers usados para PCR (59/187, 59/254, 59/273, 79/187, 79/254, 79/273, 163/273), em diferentes diluições (de 10X A 10000X) – o melhor resultado foi o 79/187.

Para a Nested PCR, foram testados os seguintes primers internos: 79/254 e 163/187 (26pb), obtendo-se o melhor resultado com este último.

5.2. HISTOPATOLOGIA

As amostras fixadas em formol tamponado 10%, foram processadas rotineiramente para inclusão em bloco de parafina e os cortes histológicos obtidos foram corados com Hematoxilina Eosina (HE), tricrômico de Gomori (TG), Shorr, verde de metila - pironina (*Methyl Green Pyronin -MGP*), para se quantificar a resposta inflamatória, as áreas de necrose e também a apoptose nos hilos placentários. A técnica de Brown and Hopps (Gram de tecido) foi utilizada para se visualizar grumos bacterianos nos cortes histológicos. Para se validar criterios morfológicos utilizados na quantificação da apoptose, corte histológicos também foram submetidos à técnica de TUNEL.

5.3. MORFOMETRIA

A quantificação das células em apoptose foi feita manualmente em imagens digitalizadas obtidas dos campos histológicos em microscópio de luz com objetiva planapocromática de 40 vezes. A morfometria das imagens digitalizadas foi feita em analisador de imagens Kontron Elektronik GMBH da Zeiss, com o programa KS300 versão 2.0.

O número mínimo representativo de campos microscópicos por hilo placentário para a análise das células apoptóticas foi determinado a partir da quantificação inicial deste parâmetro no número máximo de campos de um hilo tomado aleatoriamente. Os campos foram digitalizados com objetivas de 40 vezes, considerando apenas aqueles na interface materno-fetal placentária. Desses, formaram-se subgrupos de 5 campos retirados aleatoriamente com reposição, e de 10, 15, 20 e 25 campos. De cada subgrupo, foi calculada a média aritmética e coeficiente de variação para cada tamanho amostral. O tamanho amostral considerado como mínimo representativo foi aquele em que o incremento do n° de campos não resultou em redução considerável no valor do coeficiente de variação (SAMPAIO, 1998).

A quantificação da apoptose foi feita nas lâminas coradas pela coloração de HE, coloração a qual melhor evidenciou as características das células em apoptose.

A quantificação de células apoptóticas foi feita por um único observador considerando-se o seguinte critério de inclusão: só foram contadas as células que apresentaram pelo menos 3 das seguintes características morfológicas peculiares do processo: anoiquia (retração celular e perda de adesões entre células e membrana basal); condensação do citoplasma; condensação nuclear (compactação da cromatina nuclear em massas densas uniformes, alinhadas no lado interno da membrana nuclear, às vezes formando imagens de crescentes); fragmentação nuclear (convolução e fragmentação da membrana nuclear - sem cariorrexe ou ruptura); Fragmentação celular (com formação dos corpos apoptóticos);

O índice apoptótico foi determinado pela seguinte fórmula:

$$\text{Índice apoptótico (IA)} = \left(\frac{\Sigma \text{ n}^\circ \text{ de células apoptóticas}}{\Sigma \text{ n}^\circ \text{ de células totais}} \right) \times 100$$

5.4. ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (COCHRAN & COX, 1957) desenvolvido na forma de ensaio duplo cego. Os parâmetros morfométricos obtidos dos diversos campos histológicos para cada hilo placentário estudado foram submetidos ao teste de Kolmogorf-Smirnoff (KS) para verificação de distribuição normal (gaussiana). Em se tratando de dados com distribuição Gaussiana, procedeu-se à Análise de Variância e à múltipla comparação de Newman Keuls (SNK). As médias e respectivos erros de cada tratamento foram plotadas em gráfico.

6. RESULTADOS

As 24 amostras selecionadas das 50 colhidas no Hospital das Clínicas (HC – UFMG) e processadas pela reação em cadeia da polimerase para caracterização da presença de infecção possibilitaram número iguais (12) de casos positivos e negativos para estreptococos. No grupo Positivo para EGB havia 10 gestantes com história de infecção urinária, 8 com febre, 12 com bolsa rota por mais de 18 horas, 6 adolescentes com idade inferior a 18 anos, 2 gemelaridade, independente da idade gestacional em que se encontravam, que evoluíram para trabalho de parto, com parto por via baixa ou operatório. Algumas amostras apresentaram mais de um critério.

6.1. Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico total extraído das amostras de tecido placentário possibilitou uma boa evidência da fragmentação internucleossômica do genoma na eletroforese em gel de agarose, melhor observada nas amostras positivas, conforme demonstrado na figura 1. A quantificação do DNA total obtido por espectrofotômetro GENEQUANT está sumariada na tabela 1 do Anexo.

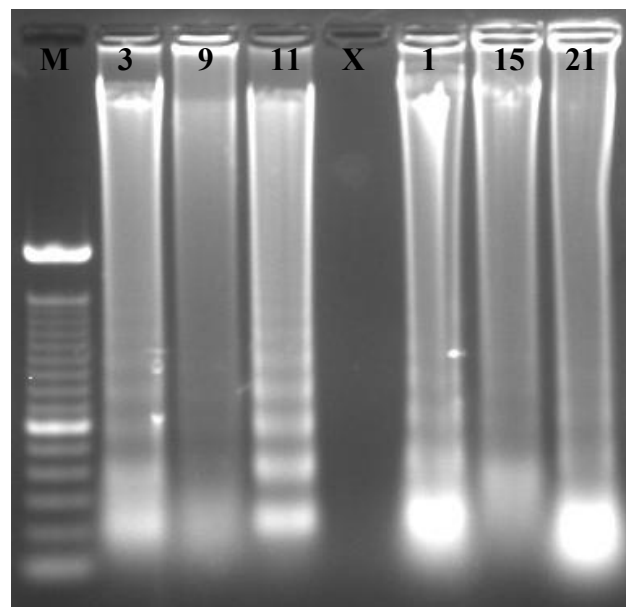


Figura 1. Eletroforese de DNA Genômico em Gel de agarose evidenciando o padrão em escada típico da fragmentação internucleossômica na apoptose (1ª coluna = marcador 100pb, colunas 3, 9 e 11= amostras positivas, colunas 1, 15 e 21= amostras negativas).

6.2. Reação em Cadeia da Polimerase

Os “primers” foram testados em diferentes diluições para verificação da especificidade e sensibilidade, conforme observado na imagem invertida do gel de agarose da figura 2.

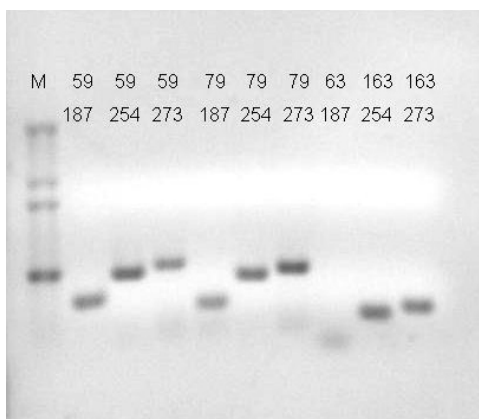


FIGURA 2. Eletroforese dos amplicons em Gel de agarose mostrando resultado da PCR dos diferentes pares de “primers” para verificação dos números de pares de bases (pb) representado para cada par. (1ª coluna = marcador, colunas 2 a 10= amostra positiva, submetidos a diferentes pares de primers).

Das 24 amostras de placenta estudadas, 12 foram positivas na PCR para o *Streptococcus agalactiae*, e 12 foram negativas, conforme observado na figura 3, que mostra reação realizada para 8 amostras, sendo as primeiras 4 colunas com resultados positivos (de 1 a 4) e outras 4 com resultados negativos (de 5 a 8). Na Figura 4, o gel de poliácridamida mostra o resultado da *Nested PCR*, realizada com “primers” internos, que evidenciaram maior sensibilidade, evidenciando resultados positivos mesmo em amostras consideradas negativas no PCR padrão.

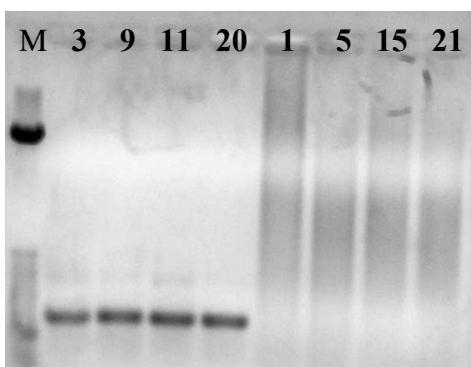


Figura 3. Gel de agarose mostrando o resultado da PCR, sendo as 4 primeiras amostras positiva para o EGB e as 4 ultimas negativas (1ª coluna = marcador, colunas 3, 9, 11e 20 = amostras positivas, colunas 1, 5, 15 e 21= amostras negativas).

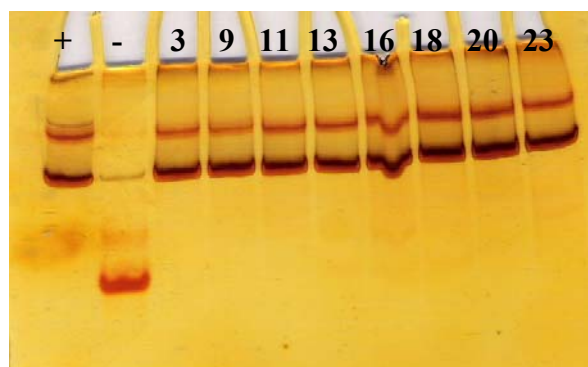


Figura 4. Resultado da Nested PCR evidenciando resultados positivos mesmo em amostras consideradas negativas no PCR padrão (1ª coluna = controle positivo, 2ª coluna = controle negativo, colunas 3, 9, colunas 11, 13, 16, 18, 20 e 23 = amostras positivas).

6.3. Histoquímica e microscopia

Na coloração Brown and Hopps (Gram de tecido) foi possível identificar a presença de grumos bacterianos azulados representando colônias Gram positivas (+) e de grumos avermelhados, representando colônias Gram negativas (-) nos tecidos placentários. Ver figuras 5 e 6.

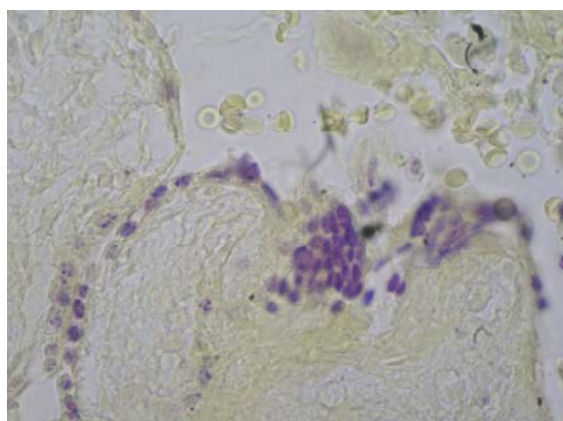


Figura 5- Corte histológico de placenta positiva, evidenciando grumos bacterianos

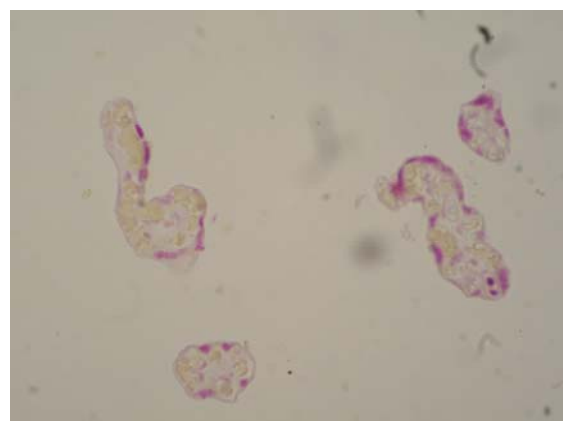


Figura 6- Corte histológico de placenta positiva, evidenciando grumos bacterianos

azulados, representando bactérias Gram avermelhados, representando bactérias positivas (Brown and Hopps, objetiva 40x) Gram negativas (Brown and Hopps, objetiva 40x)

Mesmo na coloração de HE foi possível identificar as células apoptóticas, considerando os critérios descritos no item Morfometria (5.3) do material e métodos. Assim, células retraídas e com halo claro ao redor das células (anoiquia); com citoplasma e núcleos condensados e às vezes fragmentados foram facilmente identificados como células apoptóticas (Figuras 7 e 8).

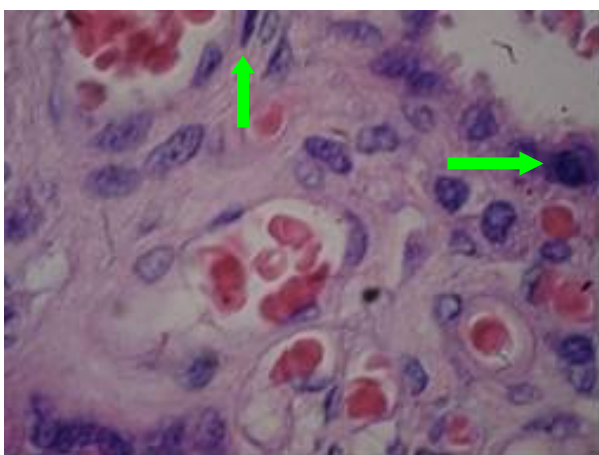


Figura 7. Corte histológico de Placenta negativa ao EGB, mostrando poucas células retraídas e com perda de adesões entre células (anoiquia); com citoplasma e núcleos condensados, identificadas com as setas mostrando células apoptóticas (HE, 40X)

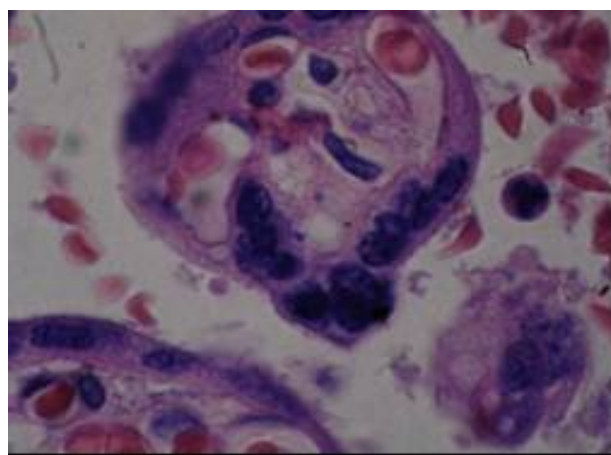


Figura 8. Corte histológico de Placenta positiva ao EGB, mostrando células retraídas, hiper Cromáticas e condensadas, identificadas como células apoptóticas (HE, 40X)

A fragmentação do genoma das células em apoptose evidenciada pelo padrão em escada na eletroforese do DNA foi confirmada também pela técnica de TUNEL que marca *in situ* com grumos castanhos escurecidos os núcleos das células em apoptose.

Nas figuras 9 e 10, observa-se o padrão de marcação em menor aumento, evidenciando-se maior dispersão nas amostras negativas e maior densidade nas amostras positivas.

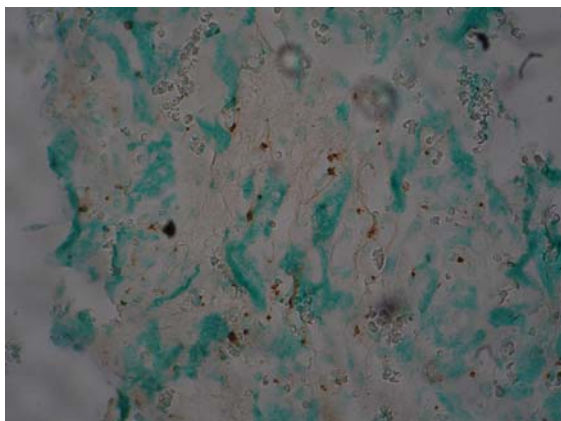


Figura 9. Padrão de marcação da reação de TUNEL, evidenciando-se maior dispersão e menor densidade nas amostras negativas (TUNEL, 10x)

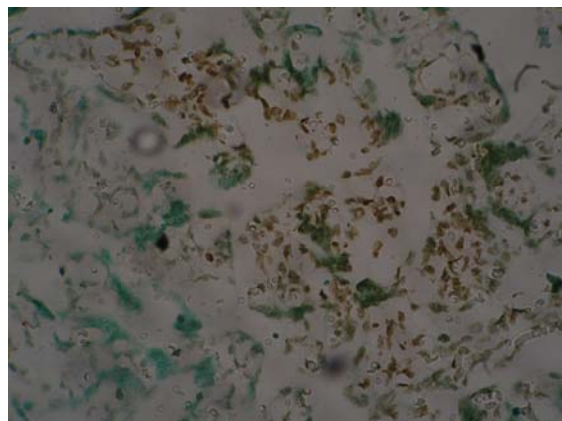


Figura 10. Padrão de marcação da reação de TUNEL, evidenciando-se maior densidade e maior concentração nas amostras positivas (TUNEL, 10x)

6.4. Morfometria

A quantificação total das células em apoptose não demonstrou diferenças ($p \leq 0,005$) entre placentas com critérios positivos para estreptococos e material controle ($53,03 \pm 1,629$ para amostras positivas e $52,64 \pm 1,603$ para amostras negativas) (Gráfico 1).

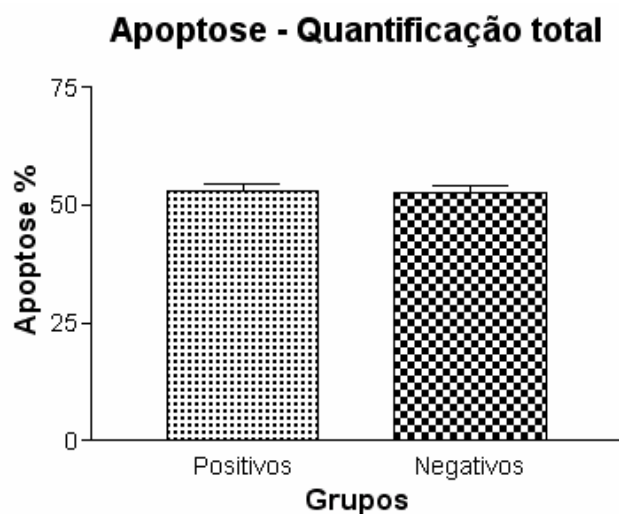


Gráfico 1. Quantificação total das células em apoptose nas amostras de placentas positivas e negativas para EGB não demonstra diferenças na intensidade do processo.

Parece que a simples presença bacteriana é insuficiente para o rompimento da membrana, sendo imperativa a interação da bactéria com o hospedeiro e, desta forma, sugere-se que haja uma infecção prévia, subclínica, responsável pelo rompimento das membranas amnióticas (ALLEN, 1991; COWLES e GONIK, 1992; GOLDSTEIN *et al.*, 1989; KLEIN e MARCY, 1991; ROMERO *et al.*, 1991).

Entretanto, apesar de não se constatar diferenças na quantificação total da apoptose por campos nas diversas amostras, o padrão de distribuição do evento em algumas amostras mostrou indícios sugestivos de que nas proximidades dos grumos bacterianos havia maior incidência de apoptose (Figuras 11 e 12). **Esta observação, baseada em evidências qualitativas e em observações em número reduzido de amostras, sugere que a infecção com EGB poderia aumentar de maneira focal e não global a apoptose, talvez até facilitando a disseminação da infecção.**

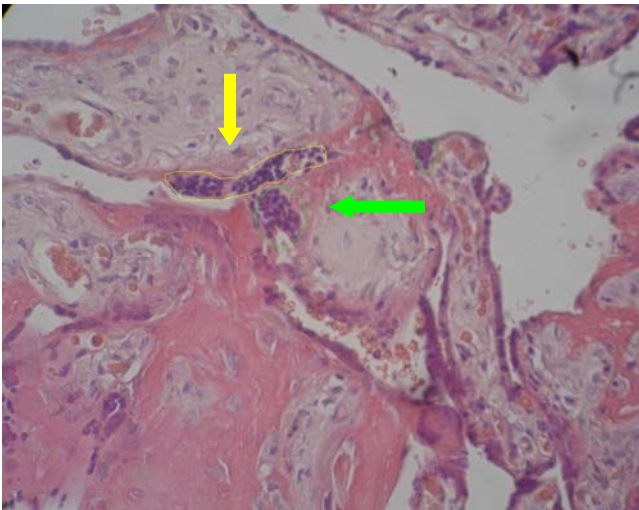


Figura 11. Microfotografia de Placenta positiva ao EGB, mostrando células retraídas, hiper Cromáticas e condensadas, identificadas como células apoptóticas apontadas pela seta amarela e mais abaixo bactérias Gram positivas circulares em

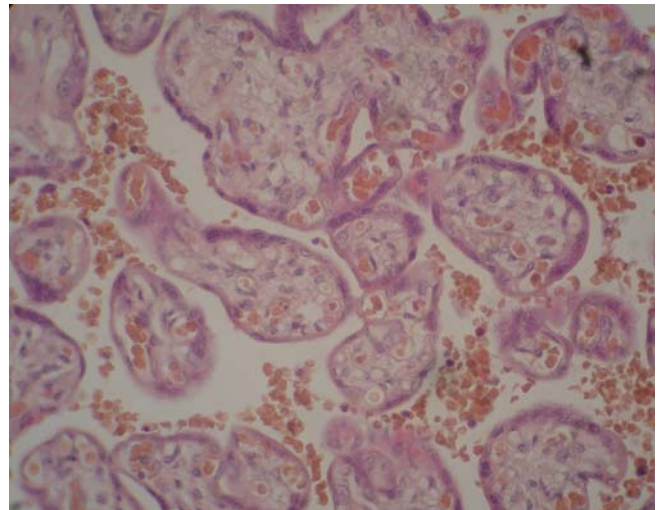


Figura 12. Microfotografia de Placenta negativa ao EGB, mostrando um padrão de células normais com marcação de célula em apoptose mais dispersa no tecido placentário. (HE contraste Brown and

verde com um fundo rosado característico Hopps, 40X)
da coloração apontadas pela seta verde
(HE contraste Brown and Hopps, 40X)

A quantificação do índice apoptótico em placentas de parto cesário a termo positiva comparadas com placenta de parto cesário negativa teve dados sugestivos de normalidade ($46,07 \pm 2,985$ e $48,83 \pm 2,429$ consecutivamente) (Gráfico 2). Já no gráfico 3 foram obtidos dados importantes mostrando maior incidência da apoptose em amostras provenientes de placentas de partos pré termo positivos ao EGB comparados a amostras de partos cesário pré termo negativos ao EGB ($56,04 \pm 2,381$ e $51,83 \pm 4,477$ consecutivamente).

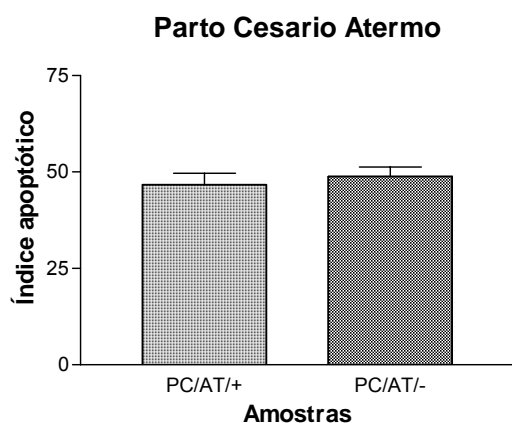


Gráfico 2. Quantificação total das células em apoptose nas amostras de placentas de parto cesário a termo positivas (7) e negativas (7) para EGB, demonstrando diferenças na diminuição do processo nas amostras positivas.

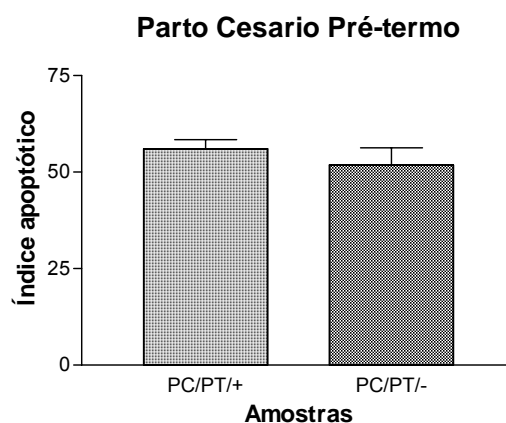


Gráfico 3. Quantificação total das células em apoptose nas amostras de placentas de parto cesário pré termo positivas (6) e negativas (6) para o EGB, demonstrando diferenças na intensidade do processo nas amostras positivas.

A quantificação em placentas de parto normal a termo positiva comparadas com placenta de parto normal a termo negativa (7) teve dados que sugerem uma diminuição do processo de morte celular ($46,61 \pm 2,033$ e $58,62 \pm 2,064$ consecutivamente) (Gráfico 4). No gráfico 5 os dados não sugerem alteração na morte celular/apoptose nas amostras

de placenta de parto normal pré termo positivas quando comparadas com amostras de placenta de parto normal pré termo negativas ao EGB ($51,28 \pm 2,886$ e $51,07 \pm 3,886$ consecutivamente).

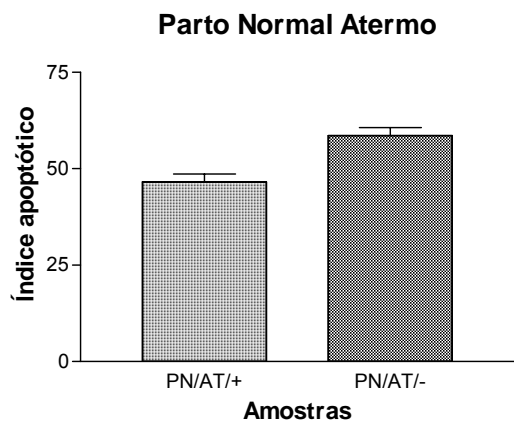


Gráfico 4. Quantificação total das células em apoptose nas amostras de placentas de parto normal a termo positivas (7) e negativas (7) para EGB, demonstrando diferenças na queda do processo nas amostras positivas.

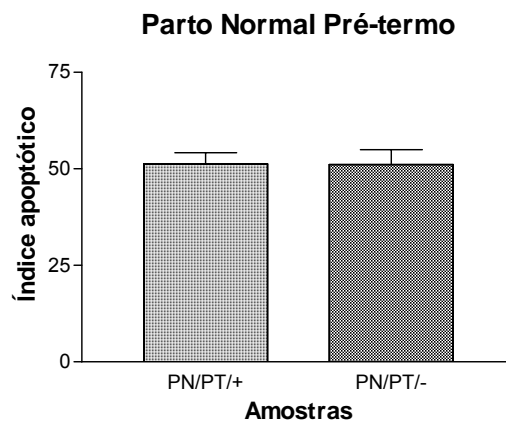


Gráfico 5. Quantificação total das células em apoptose nas amostras de placentas de parto normal pré termo (5) positivas e negativas (5) para EGB, o que não demonstra diferenças na intensidade do processo.

100% das amostras com ruptura prematura da membrana foram positivas para o EGBA e a quantificação total das células em apoptose entre placentas com ruptura prematura da membrana (10) e ruptura induzida (10) demonstrou uma leve diferença no aumento do índice apoptótico de placentas com RPM quando comparadas com placentas com bolsa rota induzida ($53,96 X \pm 2,723$ para amostras com RPM e $51,07 \pm 3,886$ para bolsa rota induzida) (Gráfico 6).

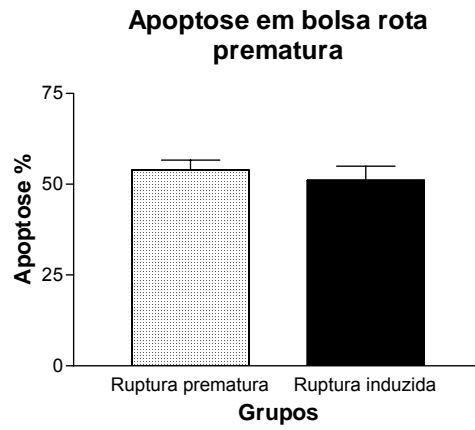


Gráfico 6. Quantificação total das células em apoptose nas amostras de placentas com ruptura prematura das membranas e ruptura induzida, demonstrando diferenças no aumento do processo nas amostras com RPM.

7. DISCUSSÃO

A apoptose ocorre de maneira natural no terço final da gestação, para que ocorra o descolamento da placenta e conseqüentemente a liberação do feto. Observou-se que a presença da bactéria na placenta faz com essa apoptose aconteça de uma maneira localizada e equilibrada, tentando evitar grandes danos à saúde do feto.

Dados iniciais das lâminas coradas com HE nos levam a crer que há aumento de apoptose, mas ao realizar análises estatísticas da contagem do número de células em apoptose sobre o número total de células comparando placentas infectadas e não infectadas pela bactéria *Streptococcus agalactiae* pudemos observar que a presença da bactéria não influenciou, sozinha, no processo de morte celular por apoptose.

Buscando informações que pudessem explicar os resultados obtidos, Belec (2002), afirma que o trato genital feminino possui vários sistemas de defesa contra o risco de infecções, sendo esses complementares, aditivos e sinérgicos. Estas defesas compreendem inicialmente estratégias não imunes, passivas (síntese de muco protéico, pH, barreira epitelial) ou ativas (reação inflamatória, secreção de fatores solúveis humorais, como a lactoferrina), que são muito eficientes para limitar o agente infeccioso. Estratégias de defesa pré-imunes, tanto celulares quanto humorais, ainda mal compreendidas, também estão possivelmente envolvidas em uma proteção rápida, que ocorre antes da estimulação antigênica. Quando esta linha de defesa inicial falha, uma terceira estratégia, adquirida e específica para o patógeno, ocorre progressivamente. Nesta última estão associadas resposta imune humoral, com IgA secretória e IgM e IgG local, e resposta imune celular. A defesa do trato genital está sob influência de hormônios e da produção de várias citocinas. A imunidade sistêmica atua em um segundo plano para reforçar ou substituir a imunidade adquirida na mucosa do trato genital.

De acordo com Ghosh *et al* (2000), as citocinas produzidas pela mãe podem funcionar como fatores de crescimento placentário, limitar a invasão do trofoblasto e mediar a remodelação tecidual. A natureza proliferativa e invasiva do trofoblasto tem que ser regulada com precisão, de forma a garantir que o endométrio permaneça intacto e não seja invadido pela placenta em crescimento. Esta regulação é, em parte, mediada pela apoptose seletiva de células, um processo que não altera a estrutura normal do tecido.

Muitos estudos indicam que a expressão da FasL pelo trofoblasto é um mecanismo para fornecer a proteção de encontro á ação lítica das células imunes decidual. Foi demonstrado recentemente que a expressão do FasL pelas células do citotrofoblasto (CT) da placenta humana não media a apoptose. Isso sugere que a resposta Fas é inativada por um mecanismo desconhecido que evita matança pelo FasL constitutivamente expressa nas imediações do CT ou ST, equilibrando assim a apoptose (UCKAN *et al.*, 1997; RUNIC *et al.*, 1996; HUNT *et al.*, 1997; GULLER *et al.*, 1999; PAYNE *et al.*, 1990).

Apesar dos dados quantitativos do trabalho em questão sugerirem que não ocorre mudança na presença da bactéria, qualitativamente, colorações de Gram contra corada com HE permitem observar apoptose focal onde existem grumos bacterianos, ou seja, a presença em massa da bactéria parece acelerar o processo de morte celular. Podendo assemelhar-se assim com Jackson *et al.* (1993) que sugere que neonatos de mães muito infectadas seja mais susceptíveis a desenvolver a doença neonatal sintomática de início precoce do que aqueles de mães pouco infectadas, ou seja, quanto mais bactérias maior risco ao neonato, o que pode estar ligado de forma direta a essa apoptose localizada ao redor das colônias bacterianas, causando assim um enfraquecimento das membranas fazendo com que elas se rompam prematuramente.

Uma explicação também para a ruptura prematura da membrana seria então a diminuição da quantidade de colágeno, a alteração em sua estrutura e o aumento da atividade colagenolítica. A integridade das membranas é mantida pelo controle de degradação do colágeno. As metaloproteinases, mediadores dessa degradação, tem sua ação controlada pelos inibidores teciduais. Momentos antes do parto, o equilíbrio entre a atividade das metaloproteinases e seus inibidores teciduais é diferenciado para ação proteolítica, levando à degradação da matriz extracelular das membranas fetais. As membranas que se rompem prematuramente parecem possuir defeitos localizados, e não enfraquecimento generalizado, assim como parece acontecer com a morte celular.

Os estreptococos secretam proteases capazes de degradar colágeno, enfraquecendo as membranas (BAKER e EDWARDS, 2003). A atividade colagenolítica pode ser um fator importante para o espalhamento dessa bactéria permitindo sua entrada na cavidade amniótica com proliferação subsequente no liquido amniótico.

Já 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. Lembrando que a apoptose é um processo rápido, que se completa em aproximadamente 3 horas e não é sincronizado por todo o órgão, portanto diferentes estágios de apoptose coexistem em diversas secções dos tecidos. Devido à taxa rápida de destruição celular é necessário que apenas 2 a 3% das células estejam em apoptose em determinado momento para que se obtenha uma regressão substancial de tecido. Os dados deste trabalho concordam, pois, na análise quantitativa da apoptose em placentas com ruptura prematura da membrana em comparação com a ruptura induzida momento antes do parto, observou-se que há um aumento, mesmo que discreto, na apoptose das placentas com RPM.

Ressalta-se que além de mecanismos de proteção materna, existem outros fatores que interferem no processo de infecção neonatal. Não menos importante esses fatores agindo em conjunto com defeitos localizados da imunidade materna tornam o prognóstico do recém nascido melhor ou pior. Esses fatores são: idade gestacional, tipo de parto sugerido (normal e cesária) e colonização materna.

A associação entre idade gestacional inferior a 37 semanas e baixos níveis de anticorpos anti-EGB concorda com a maior vulnerabilidade destes neonatos á infecção pelo *streptococcus agalactiae*. Yancey *et al.* (1996) demonstraram haver risco maior de sepse por EGB quanto menor a idade gestacional. Benitz *et al.* (2000), em revisão de literatura, apontaram a prematuridade como importante fator e risco para sepse por EGB.

Em um estudo que avaliou possíveis fatores de risco de sepse materna periparto, foi observado que os partos pré-termo associavam-se com risco 2,7 vezes maior de sepse, quando comparados com partos a termo. A sepse anteparto foi associada a um risco 2,6 vezes maior de parto cesárea e a sepse puerperal ocorreu 3,2 vezes mais após parto cesárea, comparando-se com os partos vaginais (KANKURI *et al.*, 2003).

Uma associação significativa foi mostrada entre a ruptura prematura das membranas e a infecção sintomática de início precoce (MATORRAS *et al.*, 1989; PASS *et al.*, 1979). Estas observações sugerem neonatos de mães muito colonizadas e com a RPM seja mais prováveis desenvolver a doença neonatal sintomática de início precoce o que aqueles nascidos de mãe pouco colonizada sem RPM. Em ambos os casos a

degradação de fibrilas colágeno da placenta na presença do EGB pode ser um fator de contribuição importante (JACKSON *et al.*, 1993).

A placenta tem um papel importante durante o processo de desenvolvimento, pois é um órgão capaz de fornecer nutrição ao feto, barrar microorganismos patogênicos e rejeição imune. Todos esses processos exigem mecanismos bem equilibrados a fim de permitir uma boa gestação. Em particular, durante a gestação muitas moléculas são importantes papéis no remodelamento e homeostase placentária. Há algum tempo a apoptose ganhou um papel central na regulação de alguns fenômenos tais como a fusão sincicial e o privilégio imune. O desequilíbrio das vias apoptóticas durante a gravidez é a principal causa de patologias severas e perigosas. Assim a placenta deve poder regular um contrapeso delicado entre a proliferação, a invasão e a apoptose.

A apoptose como fator de maturação placentária, ocorre naturalmente no terço final da gestação, facilitando assim a liberação do feto. Fato esse observado nos géis de acrilamida feito com a intenção de observar o padrão em escada típica da fragmentação internucleossômica que ocorre no processo. Esse padrão foi observado nas amostras de DNA de placentas infectadas e não infectadas, em maior e menor grau, dependendo da idade gestacional e quantidade de microorganismos presentes.

Através da coloração de BROW AND HOPPS, coloração para bactérias Gram positivas e Gram negativas, não sendo capaz de um diagnóstico preciso, pôde-se observar maior intensidade do processo de apoptose ao redor de grumos bacterianos. Para um diagnóstico real optou-se pela PCR, que mostrou-se satisfatória, identificando claramente a bactéria alvo, quando em grande quantidade. Para uma maior precisão quanto à identidade do *Streptococcus agalactiae* a realização da Nested PCR, foi de grande valor, diminuindo ainda mais a possibilidade de erro.

A fragmentação internucleossômica, quantitativamente, se iguala em placentas infectadas e não infectadas, mas qualitativamente foi bastante visível que nas placentas infectadas ocorre um processo aumentado ao redor dos grumos bacterianos, ou seja, deixa de ser um processo normal para se tornar um evento patológico.

Ou seja, provavelmente, as mulheres mais susceptíveis à infecção do trato genital, devem ter os mecanismos de defesa locais fragilizados, incluindo a proteção realizada pela flora normal e aquela feita por citocinas e por mediadores humorais, havendo

favorecimento do crescimento e da atuação de microorganismos com potencial patogênico.

Concluindo que ainda é necessário estudar o conjunto de fatores que interferem no processo dessa apoptose placentária, é importante entender como a bactéria age no organismo e quais são as vias usadas por ela para chegar ao feto, seja por via transplacentária ou outra qualquer, pois evidências sugerem que a RPM ocorra por processos bioquímicos como a ruptura do colágeno da matriz extra-celular do âmnion e córion e apoptose das células da membrana fetal. A presença de um ou mais fatores contribui para maior risco materno.

8. CONCLUSÕES

A apoptose como fator de maturação em placentas de mulheres não é alterada significativamente com a infecção por *Streptococcus agalactiae*;

A apoptose de placentas de mulheres positivas e negativas para estreptococos é constatável pela fragmentação internucleossômica do DNA genômico.

A reação de polimerase em cadeia em placentas permite identificar a presença ou não do *Streptococcus agalactiae*, nas placentas de mulheres.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL R., SARKAR N., DEORARI A.K., PAUL V.K. Sepsis in the newborn. *Indian J. Pediatrics*, v. 68, p. 1143-1147, 2001.
- ALLEN, S.R. Epidemiology of premature rupture of the fetal membranes. *Clin. Obstet. Gynecol*, v. 34 (4): 685-93, 1991.
- BAKER C.J., EDWARDS M.S., KASPER D.L. Role of antibody to native type III polysaccharide of group B streptococcus in infant infection. *Pediatrics*, v.68, p.544-549, 1981.
- BAKER, C.J.; EDWARDS, M.S. Group B streptococcal infections. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN, J.O. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 3. ed. Philadelphia, W.B. Saunders, p.742-89, 1990.
- BAKER C.J., MORVEN S.E. Group B Streptococcal Infections In : Remington J. ,Klein J.O., eds. *Infectious disease of the fetus and newborn infant* ed. Philadelphia , PA :WB Sanders Co ; p.980 – 1054, 1995.
- BAKER, C.J. Group B streptococcal infections. *Clin Perinatol*, v.24, p.59-70, 1997.
- BAKER, C. J., AND M. S. EDWARDS. Group B streptococcal conjugate vaccines. *Arch. Dis. Child*, v.88, p.375–378, 2003.
- BEARDSALL, K.; THOMPSON, M.H.; MULLA, R.J. Neonatal group B streptococcal infection in South Bedfordshire, 1993-1998. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*, v.82, p.205-207, 2000.
- BELEC, L. Defenses of the female genital tract against infection. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, v.31, p.45-59, 2002.
- BERGSTRÖM, S. Infection-related Morbidities in the Mother, Fetus and Neonate. *J Nutr*, v.133, p.1656-1660, 2003.
- BLACKWELL, S.; ROMERO, R.; CHAIWORAPONGSA, T.; KIM, Y.M.; BUJOLD, E.; ESPINOZA, J. *et al.* Maternal and fetal inflammatory responses in unexplained fetal death. *Matern Fetal Neonatal Med*, v.14, p.151-157, 2003.
- BRIGANTI, L.; ARRUDA M.S.; CASTRO, E.B.; NOMURA, M.L.; PASSINI JÚNIOR, R. Sofrimento fetal anteparto e sepse intra-uterina por estreptococo o grupo B (poster). In: VII CONGRESSO PAULISTA DE OBSTETRÍCIA e GINECOLOGIA, 2002, São Paulo-SP. *Anais*. São Paulo, 2002.
- BROZANSKI, B.S.; JONES, J.G.; KROHN, M.A.; SWEET, R.L. Effect of a screening-based policy on prevalence of early-onset group B streptococcal sepsis. *Obstet Gynecol*, v.95, p. 496-501, 2000.

BURNHAM, C.A.D.; TYRRELL, G.J. Virulence factors of group B streptococci. **Rev Med Microbiol**, v.14, p.109-118, 2003.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. **MMWR**; 45(No. RR-7), 1996.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Decreasing incidence of perinatal group B streptococcal disease – United States, 1993-1995. **MMWR**, v.46, p.473-477, 1997.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: morbidity and mortality weekly report. **Revised Guidelines from CDC - Recommendations and Reports**, v. 51, n. RR-11, ago. 2002.

CHEN, K. T. *et al.* The role of intrapartum fever in identifying asymptomatic term neonates with early-onset neonatal sepsis. **J. Perinat.**, v.22, n.8, p. 653-657, dez. 2002.

COCHRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental designs**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1957, 611p.

COSTA, E. C. N. F. *et al.* Apoptose. Traduzido do original: Apoptosis: physiological mechanism of celular death in the normal and pathological placenta. Revista Femina, , n. Vol.31, N^o 10, Novembro/Dezembro/2003, p. 845-849, 2003.
COWLES, T.A.; GONIK, B. Perinatal infections. In: FANAROFF, A.A.; MARTIN, R.J. **Neonatal perinatal medicine diseases of the fetus and infant**. 5. e. Baltimore, Mosby p.251-71, 1992.

DORAN, K.S.; BENOIT, V.M.; GERTZ, R.E.; BEALL, B.; NIZET, V. Late-onset group B streptococcal infection in identical twins: insight to disease pathogenesis. **J Perinatol**, v.22, p.326-330, 2002.

DORAN, K.S.; NIZET, V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. **Mol Microbiol**, v.54, p.23-3, 2004.

Duke, R. C.; Ojcius, D. M.; Young J. D. Cell suicide in heath and disease. **Sci Am**; Dez: 48-55, 1996.

FEIKIN, D.R.; THORSEN, P.; ZYWICKI, S.; ARPI, M.; WESTERGAARD, J.G.; SCHUCHAT, A. Association between colonization with group B streptococci during pregnancy and preterm delivery among Danish women. **Am J Obstet Gynecol**, v.184, p.427-433, 2001.

GARLAND, S.M.; CHUILEANNAIN, F.; SATZKE, C.; ROBINS-BROWNE, R. Mechanisms, organisms and markers of infection in pregnancy. **J Reprod Immunol**; v.57, p.169-172, 2002.

GHOSH, D.; SHARKEY, A.M.; CHARNOCK-JONES, D.S.; *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PIGF) in conceptus and endometrium during implantation in the rhesus monkey. **Mol Hum Reprod**, v.6, n.10, p.935-941, 2000.

GIBBS, R.S. Obstetric factors associated with infections of the fetus and newborn infant. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN, J.O. **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 3. ed. Philadelphia, W.B. Saunders, p.981 - 90, 1990

GIBBS, R.S.; ROMERO, R.; HILLIER, S.L.; ESCHENBACH, D.A.; SWEET, R.L. A review of premature birth and subclinical infection. **Am J Obstet Gynecol**, v.166, p.1515-1528, 1992.

GOLDENBERG, R.L.; HAUTH, J.C.; ANDREWS, W.W. Mechanisms of Disease: Intrauterine Infection and Preterm Delivery. **New Engl J Med**, v.342, p.1500-1507, 2000.

GOLDSTEIN, I.; COPEL, A.; HOBBS, J.C. Fetal Behavior in preterm premature rupture of the membranes. **Clin. Perinatol**, v. 16 (3): 735 - 54, 1989.

GOMES, M. S. Características gerais das infecções do RN. In: SEGRE, C. M.; ARMELLINI, P. A. RN. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1985. p. 266-9. **Revised Guidelines from CDC - Recommendations and Reports**, v. 51, n. RR-11, ago. 2002.

GRIMBERG, J. *et al.* A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. **Nucleic Acids Res.**, v. 17, p. 83-90, 1989.

GULLER, S., LACHAPELLE, L.:The role of placental Fas ligand in maintaining immune privilege at maternal-fetal interfaces. **Semin. Reprod. Endocrinol.** 17: 39-44, 1999.

HEIN, M.; HELMIG, R.B.; SCHONHEYDER, H.C.; GANZ, T.; ULDBJERG, N. An in vitro study of antibacterial properties of the cervical mucus plug in pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v.185, p.586-592, 2001.

HICKMANM.E., RENCH M.A., FERRIERI P., BAKER C. CHANGING Epidemiology of Group B Streptococcal Colonization . **Pediatrics**; vol 104, no. 2:203-209, 1999

HORDNES, K.; TYNNING, T.; KVAM, A.I.; JONSSON, R.; HANEBERG, B. Colonization in the rectum and uterine cervix with group B streptococci may induce specific antibody responses in cervical secretions of pregnant women. **Infect Immun**, v.64, p.1643-1652, 1996.

HUNT, J. S.; VASSMER, D.; FERGUSON, T.A.; MILLER, L.: Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. **J. Immunol.** 158: 4122-4128, 1997.

JACKSON, R. J.; K. L.; GATES, R. J.; SHERIDAN, AND D. V. LIM. Degradation of amniotic collagen fibrils by group B streptococci. **Curr. Microbiol.**, v.26, p.141-145, 1993.

KA KURUVILLA, N. T.; JESUDASAN, M. V.; JANA, A. K. Neonatal group B streptococcal bacteraemia i India: ten years' experience. **Acta Padiatr**, v. 88, p.1031-1032, 1999.

KANKURI, E.; KURKI, T.; CARLSON, P.; HIILESMAA, V. Incidence, treatment and outcome of peripartum sepsis. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v.82, p.730-735, 2003.

KENYON, S.; BOULVAIN, M.; NEILSON, J. Antibiotics for preterm rupture of membranes. **Cochrane Database Syst Rev**, (2): CD001058, 2003.

KEOGH, J.M.; BADAWI, N.; KURINCZUK, J.J.; PEMBERTON, P.J.; STANLEY, F.J. Group B Streptococcus infection, not birth asphyxia. **Aust N Z J Obstet Gynecol**, v.39, p.108-110, 1999.

KERR, J.F.R. Definition of apoptosis and overview of its incidence. In: LAVIN, M., WATTERS, D. **Programmed cell death: the cellular and molecular biology of apoptosis**. Switzerland: Harwood Academic Publishers, p.1-15, 1993.

KING, J.; FLENADY, V. Prophylactic antibiotics for inhibiting preterm labour with intact membranes. **Cochrane Database Syst Rev**, (4): CD000246, 2002.

KLEIN, J.O.; REMINGTON, J.S. Current concepts of infections of the fetus and newborn infant. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN, J.O., 3 ed. **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. Philadelphia, W.B. Saunders, p.1-14, 1990.

KLEIN, J.O.; MARCY, S.M. Bacterial sepsis and meningitis. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN, J.O. **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 3. ed. Philadelphia, W.B. Saunders, p.610-44, 1990.

KROHN, M.A.; HILLIER, S.L.; BAKER, C.J. Maternal peripartum complications associated with vaginal group B streptococcus colonization. **J Infect Dis**, v.179, p.1410-1415, 1999.

LAMONT, R.F.; FISK, N. The role of infection in the pathogenesis of preterm labor. **Prog Obstet Gynaecol**, v.10, p.135-158, 1993.

LIN, F.Y.; PHILLIPS, III J.B.; AZIMI, P.H.; WEISMAN, L.E.; CLARK, P.; RHOADS, G.G.; REGAN, J.; CONCEPCION, N.F.; FRASCH, C.E.; TROENDLE, J.; BRENNER, R.; GRAY, B.M.; BHUSHAN, R.; FITZGERALD, G.; MOYER, P.; CLEMENS, J.D. Level of maternal antibody required to protect neonates against early-onset disease caused by group B streptococcus type Ia: a multicenter, seroepidemiology study. **J Infect Dis**, v.184, p.1022-1028, 2001.

LIN, F.Y.; WEISMAN, L.E.; AZIMI, P.H.; PHILIPS, J.B. 3RD; CLARK, P.; REGAN, J.; *et al*. Level of maternal IgG anti-group B streptococcus type III antibody correlated with protection of neonates against early-onset disease caused by this pathogen. **J Infect Dis**, v.190, p.928-934, 2004.

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**. 88:3835-44, 2003.

MANNING, S.D.; WOOD, S.; KASHA, K.; MARTIN, D.; RIOUX, S.; BRODEUR, B.; DAVIES, D. Naturally occurring antibodies for the group B streptococcal surface

immunogenic protein (Sip) pregnant women and newborn babies. *Vaccine.*, v.24, p.6905-6912, 2006.

MANNING, S.D.; NEIGHBORS, K.; TALLMAN, P.A.; GILLESPIE B.; MARRS C.F.; BORCHARDT S.M. et al. Prevalence of group B streptococcus colonization and potential for transmission by casual contact in healthy young men and women. *Clin Infect Dis*, v.39, p.380-388, 2004.

MATORRAS, R. A. G.; PEREA, F.; OMEFNACA, J. A.; USANDIZAGA, A.; NIETO, and R HERRUZO. Group B Streptococcus and premature rupture of membranes and preterm delivery. *Gynecol. Obstet. Invest.* V.27, p.14-18, 1989.

MCDONALD, H.M.; O'LOUGHLIN, J.A.; JOLLEY, P.; VIGNESWARAN, R.; MCDONALD, P.J. Vaginal infection and preterm labour. *Br J Obstet Gynaecol*, v.98, p.427-435, 1991.

MCGREGOR, J.A.; FRENCH, J.L.; LAWELLIN, D.; TODD, J.K. Preterm birth and infection: pathogenic possibilities. *Am J Reprod Immunol Microbiol*, v.16, p.123-132, 1988.

MENON R, LOMBARDI SJ, FORTUNATO SJ. TNF-alpha promotes caspase activation and apoptosis in human fetal membranes. *J Assist Reprod Genet.* 19:201-4, 2002.

McCRACKEN, G.H.; FREIJ, B.J. Bacterial and viral infections of the newborn. In: AVERY, G.B. *Neonatology pathophysiology and management of the newborn*. 3. ed. Philadelphia, J.B. Lippincott, p.917 - 43, 1987.

McCRACKEN, .H.; REIJ, B.J. Infectious diseases of the fetus and newborn: perinatal bacterial diseases. In: FEIGIN, R.D.; CHERRY, J.D. *Textbook of pediatric infectious diseases*. 2. ed. Philadelphia, W.B. Sanders, p. 940-65, 1990.

MOHAMMAD, M.; MAHDY, Z.A.; OMAR, J.; MAAN, N.; JAMIL, M.A. Laboratory aspects of asymptomatic bacteriuria in pregnancy. *South Asian J Trop Med Public Health*, v.33, p.575-580, 2002.

MUSSI-PINHATA, M. M. *et al.* Infecções congênitas e perinatais. *J. Pediatr.*, v. 75, 1, jul./ago. 1999. Suplemento, p. 15-30.

ODDIE, S.; EMBLETON, N.D. Risk factors for early onset neonatal group B streptococcal sepsis: case-control study. *BM*, v.325, p.308-312, 2002.

PASS, M. A. B. M.; GRAY, S.; KHARE, and H. C. DILLON, JR. Prospective studies of group B streptococcal infections in infants. *J. Pediatr*, v.95, p.437-443, 1979.

PAYNE, S. G.;SMITH, S. C.;DAVIDGE, S. T.; BAKER, P.N.; GUILBERT, L. J.: Death receptor Fas/Apo-1/CD95 expressed by human placental cytotrophoblast does not mediated apoptosis. *Biol. Reprod.* v60: p.1144-1150, 1990.

REGAN, J.A.; KLEBANOFF, M.A.; NUGENT, R. P. The epidemiology of group streptococcal colonization in pregnancy. *Obstet Gynecol*, v.77, p.604-610, 1991.

REGAN, J.A.; KLEBANOFF, M.A.; NUGENT, R.P.; ESCHENBACH, D.A.; BLACKWELDER, W.C.; LOU, Y., *et al.* Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. **Am J Obstet Gynecol**; v.174, p.1354-1360, 1996.

ROMERO, R.; MAZOR, M. Infection and preterm labor. **Clin Obstet Gynecol**, v.31, p.553-584, 1988.

ROMERO, R.; GUIDINI, A; MAZOR, M.; BEHNKE, E. Microbial invasion of the amniotic cavity in premature rupture of membranes. **Clin. Obstet. Gynecol**, v. 34 (4): 769 - 78, 1991.

ROMERO R, CHAIWORAPONGSA T, ESPINOZA J. Micronutrients and intrauterine infection, preterm birth and the fetal inflammatory response syndrome. **J Nutr**, v.133, p.1668-1673, 2003.

RUNIC, R.; LOCKWOOD, C. J.; MAR, Y.;DIPASQUALE, B.; GULLER, S.: Expression of Fas ligand by human cytotrophoblast: implications in placentation and fetal survival. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 81: 3119-3122, 1996.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, p.221, 1998.

SANTOS, V. P. Estreptococcias. In: FARHAT, C. K. *et al.* (Eds). **Infectologia pediátrica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 242-53.

SAVOIA, M. C. Doenças bacterianas, fúngicas e parasitárias durante a gravidez. In: BURROW, G. N.; FERRIS, T. F. **Complicações clínicas durante a gravidez**. 4. ed. São Paulo: ROCA, 1996. p. 339-74.

SCHRAG, S.J.; ZYWICKI, S.; FARLEY, M.M.; REINGOLD, A.L.; HARRISON, L.H.; LEFKOWITZ, L.B., *et al.* Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. **N Engl J Med**, v.342, p.15-20, 2000.

SCHUCHAT A, Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigmas. **Clin Microbiol Rev**, v.11, p.497-513, 1998.

SCHUCHAT, A.; ZYWICKI, S. S.; DINSMOOR, M. J.; MERCER, B.; ROMAGUERA, J.; O'SULLIVAN, M. J. *et al.* Risk factors and opportunities for prevention of early-onset neonatal sepsis: a multicentre case-control study. **Pediatrics**, v.105, p. 21-26, 2000.

SCHUCHAT, A., HILGER, T., ZELL, E., FARLEY, M. M., REINGOLD, A., HARRISON, L. *et al.* - Active bacterial core surveillance of the emerging infections program network. **Emerg Infect Dis**. 7(1):92-9, 2001.

SCHWARTZ-LINEK, U.; HOOK, M.; POTS. J.R. The molecular basis of fibronectin mediated bacterial adherence to host cells. **Molec Microbiol**, v.52, p.631-641, 2004.

SIEGEL, J.D.; McCracken, G.H. Sepsis neonatorum. **N. Engl. J. Med**, v. 304 (11): 642-7, 1981.

SMITH R.S.; SMITH, T.J.; BLIEDEN, T.M.; PHIPPS, R. P. Fibroblast as sentinel cells: synthesis of chemokines and regulation of inflammation. **Am. J. Pathol**, 1997.

SPELLERBERG, B. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. **Microbes Infect**, 2:1733-42, 2000.

TCHARNIAKOVSKY, I. Estreptococcias. In: VERONESI, R. (Eds). **Doenças infecciosas e parasitárias**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976. p. 254-9.

TOLOCKIENE E.; MORSING E.; HOLST E.; HERBST A.; LJUNGH A.; SVENNINGSSEN N. et al. Intrauterine infection may be a major cause of stillbirth in Sweden. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v.80, p.511-518, 2001.

TYRRELL, G.J.; KENNEDY, A.; SHOKOPLES, S.E.; SHERBURNE, R.K. Binding and invasion of HeLa and MRC-5 cells by *Streptococcus agalactiae*. **Microbiol.**, v.148, p.3921-3931, 2002.

UCKAN, D.; STEELE, A.; CHERRY WANG, B. Y.; CHAMIZO, W.; KOUTSONIKOLIS, A.; GILBERT-BARNES, E.; GOOD, R. A.: Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. **Mol. Hum. Reprod**. 3: 655-662, 1997.

VASCONCELOS, A. C. ; VASCONCELOS, M. M. A. . Apoptose Ou Morte Celular Programada - Um Novo Conceito Em Patologia?. **Rev Méd Minas Gerais**, Belo Horizonte, MG, v. 5, n. 2, p. 103-108, 1996.

VOLUMENIE, J.L.; FERNANDEZ, H.; VIAL, M.; LEBRUN, L.; FRYDMAN, R. Neonatal group B streptococcal infection. Results of 33 months of universal maternal screening and antibioticoprofilaxis. **Eur J Gynecol Reprod Biol**, v.94, p.79-85, 2001.

WILSON, C.B. Developmental immunology and role of host defenses in neonatal susceptibility. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN, J.O. **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 3. ed. Philadelphia, W. B. Saunders, p.17 - 56, 1990.

YANCEY, M.K.; DUFF, P.; CLARK, P.; KURTZER, T.; FRENTZEN, B.H.; KUBILIS, P. Perinatal infection associated with vaginal group B streptococcal colonization. **Obstet Gynecol**, v.84, p.816-819, 1994.

YANCEY, M.K.; DUFF, P.; KUBILIS, P.; CLARK, P.; FRENTZEN, B.H. Risk factors for neonatal sepsis. **Obstet. Gynecol.**, v.87, p.188-194, 1996.

ZANGWILL KM, SCHUCHAT A, WENGER JD. Group B streptococcal disease in the United States, 1990: report from a multistate active surveillance system. CDC Surveillance Summaries. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v.41, p.25-32, 1992.

Anexos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa médico-científica.

Você decidirá se quer participar ou não.

Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo, qualquer dúvida que você tiver.

Este estudo está sendo realizado pela Aluna de mestrado Laís de Lima Franco do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

A finalidade deste estudo é estudar a correlação de apoptose como fator de maturação em placentas de mulheres com e sem hipótese de infecção por *Streptococcus sp.* Essa pesquisa apresenta relevância científica posto que as infecções neonatais envolvendo os microorganismos em estudo atingem 70% do total de sepses dos recém nascidos. A identificação precoce e específica do processo trará benefícios eminentes no seu processo terapêutico aumentando assim as suas chances de sobrevivência.

Um outro propósito é conseguir fazer o diagnóstico desta infecção no Recém nascido de uma maneira mais rápida, permitindo assim, iniciar prontamente o tratamento específico, aumentando a chance de cura do bebê.

Poderão participar deste estudo todas as gestantes que possam ter apresentado infecção em algum momento desta gestação ou em outra (anterior), mesmo que tenha sido tratada ou gestação de gêmeos.

Os sinais de infecção são: Febre, Infecção de Vias Urinárias (ou dor para urinar), Rompimento precoce da bolsa d'água (antes do início do trabalho de parto), parto difícil (normal ou cesariana) ou ainda que tenham partos prematuros.

Você poderá participar voluntariamente, consentindo que após o nascimento do seu bebê, seja colhida um pequeno fragmento da placenta, mas precisamente o Hilo placentário, para os exames e responder alguns dados sobre a sua gravidez. O material que será utilizado na pesquisa é normalmente descartado após o parto. Será extraído o material genômico dessas amostras de placentas, ou seja, o DNA e o mesmo será armazenado para posterior pesquisa de dados.

Isto permitirá pesquisarmos se há infecção em seu organismo e se ela passou ao seu bebê. Você estará colaborando para conhecermos a frequência destas infecções e como diagnosticá-las rapidamente.

Caso concorde em participar, o seu nome será mantido em absoluto sigilo, sendo o acesso a ele permitido apenas à pesquisadora e ao Conselho de Ética da Universidade Federal do MG.

Voltamos a lembrar que a sua participação é voluntária e que não perderá qualquer benefício a que tenha direito caso não concorde em participar deste estudo, podendo mesmo até participar de outros estudos desta Universidade.

Após ler, entender e esclarecer todas as dúvidas assine o termo anexo se concordar em participar voluntariamente desta pesquisa.

Se tiver dúvidas a respeito deste estudo poderá ligar para Laís de Lima Franco, no telefone (31) 3498-2406 ou 8428-1594, Anilton César Vasconcelos, no telefone 3499-2887 ou 9114-7841.

Para qualquer eventualidade poderá entrar em contato com o COEP, no telefone 3499-4592 que se encontra na Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade administrativa II, 2º andar, sala 2005, 31270-901, BH – MG

TERMO DE CONSENTIMENTO, LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, RG nº _____ SSP/____ responsável pela paciente _____, com registro nº _____, no Hospital _____, voluntariamente dou o meu consentimento para a participação no estudo: Índice apoptótico em placentas de mulheres com hipótese de infecção por *Streptococcus sp*". Conheço os objetivos do mesmo e estou ciente da sua realização. Deram-me oportunidade de esclarecer todas e quaisquer dúvidas.

Estou ciente de que poderei deixar de participar do estudo sem que com isto tenha o meu tratamento médico prejudicado.

Autorizo que os dados possam ser utilizados pela pesquisadora ou instituição (UFMG), com finalidade de publicação em órgão de divulgação científica.

Se tiver dúvidas a respeito deste estudo poderei ligar para a Laís de Lima Franco, no telefone (31) 3498-2406 ou 8428-1594, Anilton César Vasconcelos, no telefone 3499-2887 ou 9114-7841.

Para qualquer eventualidade poderá entrar em contato com o COEP, no telefone 3499-4592 que se encontra na Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade administrativa II, 2º andar, sala 2005, 31270-901, BH – MG

Este documento foi realizado em duas vias, uma ficará comigo e outra com a pesquisadora.

Belo Horizonte (MG), ____ de _____ de 2007.

Assinatura da parturiente ou do responsável legal

PROTOCOLO PARA IDENTIFICAÇÃO DE INFECÇÃO NEONATAL

HOSPITAL: _____
MÃE: _____ IDADE _____
RG Nº _____ SSP/ _____
PAI: _____ IDADE _____

1. ANTECEDENTES MATERNNOS

- Gestação na adolescência (18 anos incompletos)
- Gestação gemelar
- Prematuridade
- Febre em qualquer momento da gestação
- Diagnóstico de infecção Urinária nesta ou em gestação anterior
- Bolsa rota há **18 horas ou mais**

Gesta _____ Para _____ Abortos _____ Natimortos _____
Prematuros _____ Filhos Vivos _____ Filhos Mortos _____
Teve problemas de saúde durante as gestações? _____
Tomou medicamentos? _____
Quais? _____

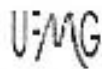
2. GESTAÇÃO ATUAL

DUM _____ Duração da Gestação _____ semanas.
Apresentou algum problema de saúde? _____
Teve febre? _____
Tomou algum medicamento? _____
Quais? _____
Ruptura da Bolsa _____ Sofrimento Fetal _____
Data do Nascimento ___ / ___ / ___ Hora ___ : ___ Minutos
Parto _____ Apresentação _____
Bolsa rota _____ horas do parto
Líquido Amniótico: Claro _____ Esverdeado _____ Fino _____ Espesso _____
Grumos _____ Odor (Fétido/ característico) _____
Condições ao nascer _____

Índice de APGAR 1º minuto _____ 5º minuto _____
Aspiração (tipo resultado) _____

Antes do 1º movimento respiratório? _____
Reanimação? _____
Observações: _____

Pediatra Assistente (Neonatologista)



Parecer nº. ETIC 312/07

Interessado(a): Prof. Anilton César Vasconcelos
Departamento de Patologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 16 de agosto de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**índice apoptótico em placenta de mulheres com hipótese de infecção por *Streptococcus sp***" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

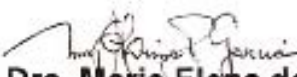

Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Coordenadora do COEP-UFMG

Tabela de Quantificação do DNA total

N° Original	$\lambda = 260$	$\lambda = 280$	Concentração
			($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) diluição 1/20
1	1,720	0,982	1756
2	0,271	0,163	1663
3	0,591	0,341	1733
4	0,631	0,367	1719
5	0,002	0,002	1000
6	0,122	0,069	1768
7	0,010	0,007	1429
8	0,117	0,068	1721
9	1,017	0,011	1545
10	0,044	0,026	1692
11	0,027	0,017	1588
12	0,045	0,027	1667
13	0,112	0,066	1697
14	0,210	0,122	1721
15	0,060	0,037	1622
16	1,140	0,658	1733
18	0,552	0,322	1714
19	0,904	0,524	1725
20	0,002	0,003	0,667
21	0,288	0,195	1477
22	0,118	0,071	1662
23	0,986	0,576	1712
24	1,823	1,043	1748
25	0,991	0,607	1633