

Expressão do fator de necrose tumoral (TNF- α) em membranas ovulares de partos prematuros

Expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in ovular membranes with premature rupture

Sílvia Regina Piza Ferreira Jorge¹, Sebastião Piato², Lilian de Paiva Rodrigues³, Maria Antonieta Longo Galvão da Silva⁴, Tsutomu Aoki⁵

Resumo

Objetivo: Comparar a frequência da imunoexpressão do TNF- α nas membranas ovulares em partos prematuros e a termo. **Casística e método:** O grupo em que ocorreu parto prematuro foi formado por 29 parturientes e aquele em que o parto se deu à termo por 34 parturientes. Foram excluídas do estudo parturientes com diagnóstico clínico de infecção ou de outros fatores de risco para prematuridade. A análise da presença do TNF- α nas membranas foi feita por técnica de imunoistoquímica. **Resultados:** Encontramos em 100% dos casos a presença de expressão do TNF- α no grupo em que o parto foi prematuro e em aproximadamente 65%, naqueles em que foi a termo. A análise estatística pelo método de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre os grupos. **Conclusão:** Pelo ensaio verificamos que

o TNF- α encontrou-se presente em membranas ovulares de elevado número de partos prematuros nos quais não se detectou infecção.

Descritores: Trabalho de parto prematuro, Inflamação, Membranas extra-embriônicas, Fator de necrose tumoral alfa

Abstract

Objectives: To compare the frequency of TNF- α 's immunoeexpression in the ovular membranes in preterm and term deliveries. **Methodology:** The group in which occurred preterm delivery was formed by 29 pregnant women and in the group in which occurred term deliveries was formed by 34 pregnant women. All pregnant with clinical diagnosis of infection or other risk factors to pregnancy were excluded of the study. The analysis of TNF- α 's presence in the membranes was made by immunoistochemistry method.

Results: It was found 100% of immunoeexpression in the group in which occurred preterm delivery, and 65% in the group that occurred term delivery. The statistical analysis (Mann-Whitney) showed a significant difference between the groups. **Conclusion:** The present study led us to conclude that TNF- α was found in the ovular membranes in the preterm deliveries in which no infections identified.

Key words: Obstetric labor, premature; Inflammation; Extraembryonic membranes; Tumor necrosis factor-alpha

Introdução

Apesar dos avanços tecnológicos observados na prática obstétrica, permanecem significativamente elevadas as taxas de prevalência do parto prematuro, inclusive nas regiões mais desenvolvidas do mundo.^{1,2} Como consequência, são igualmente altos os índices de perdas neonatais decorrentes das complicações da prematuridade.^{1,3}

Condutas preventivas, que se constituem nas estratégias com possibilidade de ocasionar maior impacto na redução da incidência do parto prematuro

1. Professor instrutor da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia. Médica Segundo Assistente, Chefe do Setor de Gestação de Baixo Risco do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

2. Professor titular da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

3. Professor assistente da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia. Médico Primeiro Assistente da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Chefe da Clínica de Obstetrícia de Alto Risco no Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

4. Professor assistente da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, Departamento de Ciências Patológicas. Professora convidada no curso de graduação em Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na disciplina de Moléstias Transmissíveis.

5. Professor adjunto da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia. Diretor do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Irmandade da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

Trabalho realizado: Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e Departamento de Ciências Patológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

Endereço para correspondência: Sílvia Regina Piza Ferreira Jorge. Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1021 – apt° 71 – Vila Mariana – 04014-012 – São Paulo – SP – Brasil

esbarram no fato de que em parcela considerável dos casos não são evidenciados fatores de risco para a ocorrência do mesmo, por meio de avaliações clínicas ou laboratoriais.⁴

Existem comprovações de que processos inflamatórios decorrentes de infecções sistêmicas ou do trato genital inferior desempenham relevante papel na etiopatogenia do parto prematuro.^{5,6} Com base em tal fato, algumas investigações têm sido realizadas com o propósito de estimar a possível existência de inflamação em compartimentos maternos e do produto da concepção, em gestações que se interrompem prematuramente, sem que se possa detectar causa inflamatória.

No sentido de detectar eventual inflamação oculta, tem-se pesquisado a presença do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em diferentes compartimentos, especialmente sangue materno e líquido amniótico, uma vez que esta citocina constitui-se em sensível marcador de resposta inflamatória.⁷ Os resultados obtidos têm evidenciado que a concentração do TNF- α apresenta-se com frequência maior nesses compartimentos em mulheres com parto prematuro do que naquelas com parto à termo, nos quais não existem indícios de inflamação.

No presente ensaio clínico investigamos a presença do TNF- α nas membranas ovulares provenientes de partos prematuros e à termo, utilizando técnica de imunistoquímica para identificar a expressão desse marcador.

Casuística

O material utilizado neste estudo consistiu nas membranas ovulares provenientes de partos espontâneos de 63 mulheres que não apresentavam indícios clínicos ou laboratoriais de infecções ou de outros fatores de risco para parto prematuro.

O grupo de estudo foi formado por 29 parturientes que tiveram parto prematuro. Nenhuma delas recebeu corticoidoterapia, uma vez que chegaram ao atendimento em franco trabalho de parto, sem possibilidade de se inibir o mesmo. O grupo controle foi constituído por 34 parturientes cujos partos foram a termo.

Em ambos os grupos o cálculo da idade gestacional foi feito com base no exame ultra-sonográfico realizado no primeiro trimestre da gravidez. O tempo de gestação das parturientes do primeiro grupo variou entre 24,2 e

36,4 semanas, com média de $31,1 \pm 3,76$ desvios-padrão, e as do grupo controle entre 37,1 e 41,3 semanas, com valor médio de $39,0 \pm 0,97$ desvios padrão.

Método

Preparo do material

Para a obtenção dos cortes das membranas ovulares destinados à pesquisa do TNF- α pela técnica de imunistoquímica procedeu-se a confecção de rolos de membranas denominados *jelly roll*. As fitas obtidas das membranas, com aproximadamente 3 cm de largura, foram enroladas, mantendo-se os sítios de ruptura das mesmas no centro do rolo.

Após blocagem dos rolos em parafina foram obtidos dos mesmos cortes com espessura de 3 μ m. Os cortes foram montados em lâminas de vidro, previamente preparadas com o adesivo poli-D-lisina, para evitar o seu descolamento durante a imunocoloração pela técnica de imunistoquímica.

Pesquisa do TNF- α por imunistoquímica

Foi utilizado o método streptavidina-biotina-peroxidase lábil, LSAB. Empregaram-se para a realização do mesmo anticorpo primário anti-TNF- α (código AS210NA, RD System®, USA) e *kit* de visualização contendo anticorpo secundário conjugado à peroxidase e cromógeno (Envision®, DAKO, USA). Os passos da técnica foram aqueles habitualmente utilizados.

A positividade da reação para identificação do TNF- α foi marcada pela coloração sépia, tomando-se como controle positivo da mesma o padrão de coloração do TNF- α presente no citoplasma de macrófagos em cortes de tonsila palatina humana.

Resultados

Na tabela 1 e na figura 1 apresentamos a relação entre a expressão do TNF- α nas membranas ovulares das gestantes dos grupos Estudo e Controle.

Pode-se observar que a mediana do grau de imunexpressão do TNF- α foi significativamente maior nas membranas ovulares do Grupo Estudo, quando comparada com a mediana do Grupo Controle ($p=0,000$).

Tabela 1

Relação entre a imunexpressão do TNF- α nos Grupos Estudo e Controle

IMUNOEXPRESSION DE TNF- α	MEDIANA	VALOR MÁXIMO	VALOR MÍNIMO	MANN-WHITNEY (p)
ESTUDO (n=29)	2	3	1	
CONTROLE (n=34)	1	3	0	0,000

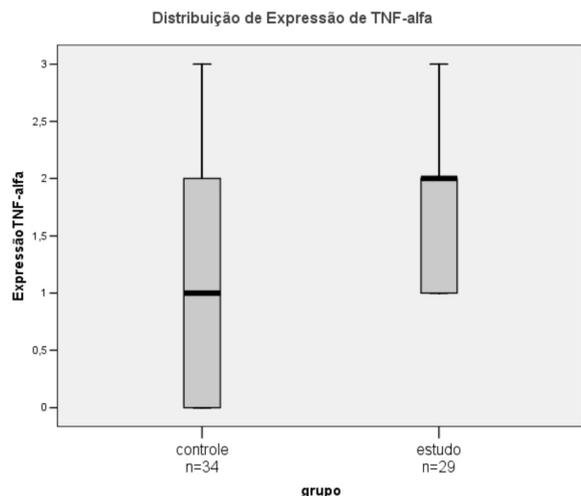


Figura 1. Relação entre imunexpressão de TNF- α nos Grupos Estudo e Controle.

Discussão

Numerosas investigações sustentam a relevância da participação da resposta inflamatória no aparecimento de contrações uterinas. Quando a mesma ocorre em grávidas em que a idade gestacional é inferior a 37 semanas, são responsáveis por partos prematuros.

Têm-se demonstrado que os processos relacionados com a resposta inflamatória têm fundamental envolvimento na fisiopatologia referente ao desencadeamento do parto prematuro, uma vez que as prostaglandinas resultantes da cascata de eventos têm direta participação no aparecimento das contrações uterinas.^{5,9,10}

A síntese de prostaglandinas que atuam na atividade do útero, especialmente a PGE₂, a PGD₂ e a PGF_{2 α} ocorre pela via da COX-2.^{9,10} Nesse processo, as citocinas que exercem papel preponderante são o TNF- α e a interleucina 1 (IL-1), produzidos principalmente por macrófagos ativados.^{5,9}

Nos partos prematuros em que o fator causal consiste em processo inflamatório, a prostaglandina que tem maior participação no desencadeamento do trabalho de parto é a PGE₂.^{5,9} No miométrio submetido à atuação desta prostaglandina ocorre progressivo aumento dos pontos de união intercelular (*gaps junctions*), que têm grande importância na condução do estímulo contrátil.^{11,12}

Somando-se a outros ensaios clínicos, que identificaram indiretamente a presença de inflamação em partos pré-termo sem causa aparente, por meio da identificação de seu marcador TNF- α no sangue materno e no líquido amniótico, acreditamos que os resultados desta nossa investigação possa ser de utilidade na prática obstétrica.

Nossa constatação de que a frequência da expres-

são do TNF- foi significativamente mais elevada nas membranas ovulares do grupo de partos prematuros, quando comparado com aqueles a termo possibilitamos estimar que em parte considerável dos casos em que o desencadeamento do parto pré-termo é catalogado como de etiologia desconhecida, a verdadeira causa consiste em processo inflamatório em compartimento do produto da concepção que, no nosso estudo foram as membranas ovulares.

Assim sendo, acreditamos que o exame das membranas ovulares, por meio da metodologia por nós utilizada, em número mais elevado de casos, possa criar paradigma para a inclusão de maior percentagem de partos prematuros como tendo por causa processo inflamatório.

Referências Bibliográficas

1. Steer P. The epidemiology of preterm labor – a global perspective. J Perinat Med. 2005; 33:273-6.
2. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. Lancet. 2008; 37:75-84.
3. American College of Obstetricians and Gynecologists - ACOG Committee Opinion number 419 October 2008 (replaces no. 291, November 2003). Use of progesterone to reduce preterm birth. Society for Maternal Fetal Medicine Publications Committee. Obstet Gynecol. 2008; 112:963-5.
4. Goldenberg RL. The management of preterm labour. Obstet Gynecol. 2002; 100: 1020-37.
5. Sato TA, Keelan JA, Mitchell MD. Critical paracrine interactions between TNF- α and IL-10 regulate lipopolysaccharide-stimulated human choriodecidual cytokine and prostaglandin E₂ production. J Immunol. 2003; 170:158-66.
6. Gucer F, Balkanli-Kaplan P, Yukse M, Yüce MA, Türe M, Yardim T. Maternal serum tumor necrosis factor-alpha in patients with preterm labour. J Reprod Med. 2001; 46:232-6.
7. Hillier SL, Witkin SS, Krohn, MA, Watts DH, Kiviat NB, Eschenbach DA. The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis and chorioamnion infection. Obstet Gynecol. 1993; 81:941-8.
8. Vitoratos N, Papadias K, Makrakis E, Christodoulakos G, Panoulis K, Creatas G. Association between serum tumor necrosis factor-alpha and corticotrophin-releasing hormone levels in women with preterm labour. J Obstet Gynecol. 2006; 32:497-501.
9. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Inflamação aguda e crônica. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins e Cotran - Patologia - bases patológicas das doenças. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 49-89.
10. Hanna N, Bonifácio L, Reddy P, Hanna I, Weinberger B, Murphy S, et al. IFN- γ mediated inhibition of COX-2 expression in the placenta from term and preterm labor pregnancies. Am J Immunol. 2004, 51: 311-8.
11. Slater DM, Astle S, Woodcock N, Chivers JE, Wit NCJ, Thornton S, et al. Anti-inflammatory and relaxatory effects of prostaglandin E₂ in myometrial smooth muscle. Molec Human Reprod. 2006; 12: 89-97.
12. Challis JR, Sloboda DM, Alfaidy N, Lye SJ, W Gibb, Patel FA, et al. Prostaglandins and mechanisms of preterm birth. J Soc Reprod Fertil. 2002; 124:1-17.

Trabalho recebido: 12/08/2009

Trabalho aprovado: 11/11/2009