

C 646466  
R 1335871  
03/10/00

**JÚLIO AUGUSTO GURGEL ALVES**

**DISTRIBUIÇÃO DE MACRÓFAGOS, LINFÓCITOS T E  
LINFÓCITOS B NAS VILOSIDADES PLACENTÁRIAS  
DE GRAVIDEZES HUMANAS A TERMO.**

Dissertação apresentada como pré-requisito a obtenção do título de MESTRE  
ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal do Ceará .

**ORIENTADORA:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Neile Torres de Araújo

TESE  
616.079  
R 479 d  
1999

Fortaleza –Ce

1999

ALVES, Júlio Augusto Gurgel

Dissertação de Mestrado – Curso de Mestrado em Patologia - Departamento de Patologia e Medicina Legal – Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará – 1999.

Palavras-chaves: Placentas, Macrófagos, Linfócitos, Parto Normal e Cesárea, Imunofenotipagem, CD68, CD43 e CD20.

UFC	BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
Nº. R 1335871	
03 / 10 / 2000	

OK

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**Faculdade de Medicina**  
**Departamento de de Patologia e Medicina Legal**

**DISTRIBUIÇÃO DE MACRÓFAGOS, LINFÓCITOS T E LINFÓCITOS B NAS  
VILOSIDADES PLACENTÁRIAS DE GRAVIDEZES HUMANAS A TERMO.**

Dissertação apresentada à Coordenação do  
Curso de pós-graduação em Patologia, do  
Departamento de Patologia e Medicina  
Legal da Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal do Ceará, como  
requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre em Patologia.

**Mestrando:**

**Júlio Augusto Gurgel Alves**

**Orientadora:**

**Prof.<sup>a</sup> Maria Neile Torres de Araújo**

**Fortaleza - Ceará**  
**1999**

**DISTRIBUIÇÃO DE MACRÓFAGOS, LINFÓCITOS T E  
LINFÓCITOS B NAS VILOSIDADES PLACENTÁRIAS DE  
GRAVIDEZES HUMANAS A TERMO.**

Esta dissertação foi submetida ao Curso de Pós - Graduação em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Patologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na biblioteca da Faculdade de Medicina da referida Universidade.

---

JÚLIO AUGUSTO GURGEL ALVES

**Data da aprovação: 29/10/1999**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Lília Maria Carneiro Câmara**

---

**Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho**

---

**Prof. Dr. Eugênio Pacceli de Barreto Teles**

## SUMÁRIO

Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo /Abstract	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>3. AMOSTRA, MATERIAS E MÉTODOS</b>	
3.1 AMOSTRA	16
3.2 PREPARAÇÃO DAS PLACENTAS	17
3.3 REAGENTES	17
3.4 TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE	19
3.5 LEITURA DE LÂMINAS	20
3.6 ESTUDO ESTATÍSTICO	21
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1 DADOS GERAIS	22
4.2 GRUPO I – PARTOS NORMAIS	31
4.3 GRUPO II – CESÁREAS ELETIVAS	34
4.4 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS GRUPOS	37
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>39</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>45</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>46</b>
<b>ANEXOS</b>	

## LISTA DE TABELAS

página

Tabela 1- Médias da idade materna, da idade gestacional e do peso fetal, segundo o tipo de parto.	22
Tabela 2 – Frequência de células marcadas e não marcadas nas vilosidades das 31 placentas, segundo o anticorpo monoclonal utilizado (anti-CD68, anti-CD43 e anti-CD20).	23
Tabela 3 – Resultado em percentual das células marcadas pelos anticorpos monoclonais anti-CD68, anti-CD43 e anti-CD20 no estroma das vilosidades das placentas e estatísticas da amostra.	24
Tabela 4- Frequência de placentas segundo o percentual de células CD68+ no estroma das suas vilosidades.	25
Tabela 5- Frequência de placentas segundo o percentual de células CD43+ no estroma das suas vilosidades.	27
Tabela 6- Frequência de placentas segundo o percentual de células CD20+ no estroma de suas vilosidades.	29
Tabela 7- Frequência (%) de células marcadas pelo anticorpo anti-CD68 nas vilosidades das placentas obtidas após parto normal.	31
Tabela 8. Frequência (%) de células marcadas pelo anticorpo monoclonal anti-CD 43 nas vilosidades das 20 placentas obtidas após parto normal.	32
Tabela 9- Frequência de células marcadas pelo anticorpo anti-CD20 nas vilosidades placentárias das 20 pacientes.	33
Tabela 10. Frequência (%) de células marcadas pelo anticorpo monoclonal CD 68 nas vilosidades das 11 placentas obtidas após parto	34

cesariano.

Tabela 11. Frequência (%) de células marcadas pelo anticorpo anti-CD43 nas vilosidades das 11 placentas obtidas após parto cesariano. **35**

Tabela 12- Frequência (%) de células marcadas pelo anticorpo anti-CD20 nas vilosidades das 11 placentas obtidas após parto cesariano. **36**

Tabela 13- Resultados do teste de Mann-Whitney comparando as placentas do grupo I e do grupo II quanto a distribuição das células marcadas pelos anticorpos monoclonais anti-CD68, anti-CD43 e anti-CD20. **37**

Tabela 14 – Distribuição dos dados estatísticos referentes a marcação de células pelos anticorpos anti CD43, anti-CD20 e anti-CD68 nas vilosidades de placentas do grupo I-parto normal e do grupo II- cesáreas. **38**

## LISTA DE FIGURAS

página

- Figura 1** – Ilustração representando uma gravidez tópica inicial em um útero seccionado transversalmente. Estão sendo evidenciadas as três formas de decídua (basal, capsular e parietal) e a vascularização decidual pelas artérias e veias uterinas. Figura retirada do livro “Sonography in Obstetrics and Gynecology – principles & practice” (Fleischer e cols., 1996). 2
- Figura 2-** Diagrama de uma gravidez no curso da 5ª semana de idade gestacional. Estão representados o embrião e os vasos sanguíneos embrionários que se comunicam com os vasos das vilosidades. Estão demonstrados também os sinusóides maternos, que ao serem invadidos pelo citotrofoblasto, extravasam sangue para os espaços intervilosos. Figura baseada em outras figuras do livro de Embriologia Clínica (Moore e Persaud, 1994). 4
- Figura 3-** Diagrama de uma placenta, com a finalidade de mostrar a circulação fetal se comunicando com os capilares das vilosidades flutuantes, estas sendo banhadas pelo sangue materno nos espaços intervilosos e as vilosidades de ancoragem atingindo a decídua basal. Figura retirada do livro Embriologia Clínica ( Moore e Persaud, 1994). 5
- Figura 4-** Desenho ilustrativo de uma secção transversal de uma vilosidade de ancoragem invadindo a decídua basal. 6
- Figura 5** - Frequência das placentas segundo o percentual de células CD68+ no estroma das vilosidades em cada placenta. 25

- Figura 6** - Microfotografias de corte histológico de vilosidades placentárias com células marcadas pelo anticorpo anti-CD68 em aumento de 200x (a) e 400x (b). As células marcadas aparecem encobertas pelo cromógeno, diaminobenzidina, conferindo-lhes a coloração marrom. 26
- Figura 7** - Distribuição das freqüências de placentas segundo o percentual de células CD43+ no estroma das suas vilosidades. 27
- Figura 8** - Microfotografias de corte histológico de vilosidades placentárias com células marcadas pelo anticorpo anti-CD43, em aumento de 200x (a) e 400x (b). As células marcadas aparecem encobertas pelo cromógeno, diaminobenzidina, conferindo-lhes a coloração marrom. 28
- Figura 9** - Distribuição das freqüências de placentas segundo o percentual de células CD20+ no estroma das suas vilosidades. 29
- Figura 10** - Microfotografias de corte histológico de vilosidades placentárias com células marcadas pelo anticorpo anti-CD20 em aumento de 400x. As células marcadas aparecem encobertas pelo cromógeno, diaminobenzidina, conferindo-lhes a coloração marrom. 30
- Figura 11** - Comparação entre as estatísticas do grupo I e do grupo II, onde a mediana está representada por uma faixa preta, a área de maior concentração por uma caixa colorida e a amplitude das proporções por um tracejado. 38

## LISTA DE ANEXOS

página

Anexo 1- Ofício do Comitê de Ética em Pesquisa Clínica do Centro de Ciências da Saúde do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará.	57
Anexo 2 – Dados Clínicos das pacientes.	58
Anexo 3 – Formulário de coleta de dados utilizado na pesquisa.	59

## RESUMO

A placenta é um órgão fetal e materno, constituído por células de dois organismos antigenicamente diferentes. As células do sistema imunológico materno e fetal estão presentes na placenta humana e o desenvolvimento fetal e placentário depende de uma interação favorável entre estas células. O interesse científico pelo estudo anátomo-fisiológico da placenta é antigo e, mesmo após várias pesquisas, ainda hoje não estão esclarecidos muitos conceitos, como por exemplo, os mecanismos responsáveis pela tolerância materna aos aloantígenos fetais durante a gravidez e o exato mecanismo envolvido no desencadeamento do trabalho de parto. Os trabalhos sobre a distribuição de macrófagos e linfócitos na placenta humana apresentam resultados divergentes, por isso decidimos verificar a distribuição de macrófagos e linfócitos no estroma das vilosidades coriônicas em placentas da nossa região.

Em nossa pesquisa, estudamos trinta e uma placentas de gestantes a termo, através de método imunohistoquímico. Vinte placentas (64,5%) foram obtidas após parto normal e 11 (35,5%) após cesáreas eletivas. Entre os resultados obtidos, verificamos que os macrófagos, células marcadas pelo anticorpo anti-CD68, estão presentes em 17% das células do estroma das vilosidades placentárias. Observamos que a proporção de macrófagos dentre as células das vilosidades variou de 4,51% a 63,03%. A identificação dos linfócitos T e B foi realizada pelo uso dos anticorpo anti-CD43 e anti-CD20, respectivamente. Verificamos os linfócitos T e B presentes no estroma das vilosidades na proporção de 4,90% e 0,81%, respectivamente. As placentas não apresentaram grandes variações quanto a proporção de linfócitos T e de linfócitos B nas vilosidades. Observamos uma tendência a ausência de células marcadas pelo anticorpo anti-CD20 (linfócitos B) nas vilosidades. Concluimos, portanto, que os macrófagos são mais freqüentes do que os linfócitos T e os linfócitos B e que, apesar do trabalho de parto ter sido associado ao aumento da concentração intra-amniótica das citocinas inflamatórias, não está associado às modificações nas porcentagens de macrófagos e de linfócitos nas vilosidades das placentas humanas a termo.

## ABSTRACT

The placenta contains histoincompatible cells derived from mother and fetus. Despite intense investigation, it is poorly understood why the fetus and the placenta are not rejected by maternal immune system. The fetus can be considered a successful allograft. Macrophages and Lymphocytes can be found in the decidua and in the chorionic villous mesenchyme of placenta throughout pregnancy. Although there is general agreement about the existence of immune system cells within the placental chorionic villous mesenchyme, there are contradictory data regarding the relative percentage of macrophages and lymphocytes among the placental cell population.

In this research, thirty one placentas were studied by immunohistological technique. Twenty human term placentas (64,5%) were collected from normal vaginal deliveries and eleven placentas (35,5%) were from elective cesarean sections. The frequency and distribution of macrophages, T lymphocytes and B lymphocytes in chorionic villous mesenchyme of human term placentas were quantified and analyzed. Placenta cryostat sections were labeled using a panel of monoclonal antibodies specific for CD68, CD43 and CD20; and using avidin-biotin complex peroxidase method. In our results, the macrophages (CD68+), T lymphocytes (CD43+) and B lymphocytes (CD20+) comprised 17%, 4,9% and 0,81% of the cell population in chorionic vilous stroma, respectively. About the percentage of macrophages in chorionic vilous, the placentas were different and the range of variation was from 4,51% to 63,03%. We conclude that macrophages were more frequent than T lymphocytes and B lymphocytes. The B lymphocytes were rare in chorionic vilous stroma. And we didn't find change in percentage of these cells in association with labor.

## 1. INTRODUÇÃO

A gravidez evolui a partir da fecundação, que ocorre geralmente na região ampolar da tuba uterina. Depois, o concepto desloca-se para o útero através da região ístmica tubária, passa por mitoses sucessivas e torna-se a mórula, um aglomerado compacto de células (ou blastômeros). Pelo acúmulo gradual de líquido na região central da mórula, os blastômeros são afastados e passam a constituir uma camada periférica, o trofoblasto. Esta é a fase em que o produto conceptual passa a chamar-se de blastocisto, ocorrendo entre o quarto e o quinto dias após a fertilização, época em que chega ao útero e permanece por dois dias antes de se implantar. A implantação é a invasão da mucosa uterina pela camada periférica de células do blastocisto, o trofoblasto, que originará a porção fetal da placenta. A parte materna da placenta se originará da mucosa uterina invadida pelos trofoblastos, o endométrio decidualizado. A massa celular mais interna no blastocisto originará o embrião (Labarrere e Faulk, 1992; Moore & Persaud, 1994; Buster & Carson, 1996).

O endométrio é modificado durante a gravidez em resposta a estímulos hormonais e passa a chamar-se de decídua, que provém do latim “deciduus” e significa “que cai”, pois parte da decídua acompanha a placenta durante o parto. Na decídua, as células epiteliais e do tecido conjuntivo, aumentam de volume e tornam-se mais claras do que antes da decidualização, devido ao acúmulo de glicogênio e gorduras (Moore & Persaud, 1994; Buster & Carson, 1996).

A decídua é dividida em três regiões, denominadas de acordo com a sua relação com o sítio de implantação: a) decídua basal é a que está em contato com as vilosidades trofoblásticas; b) decídua capsular, que envolve o concepto, separando-o da luz uterina; e c) decídua parietal é o restante da mucosa uterina (figura 1) (Nahoum & Barcellos, 1991; Rezende & Montenegro, 1991). Entre as células deciduais, que são de origem materna, raramente são encontradas células fetais (Sutton, Mason e Redman, 1983).

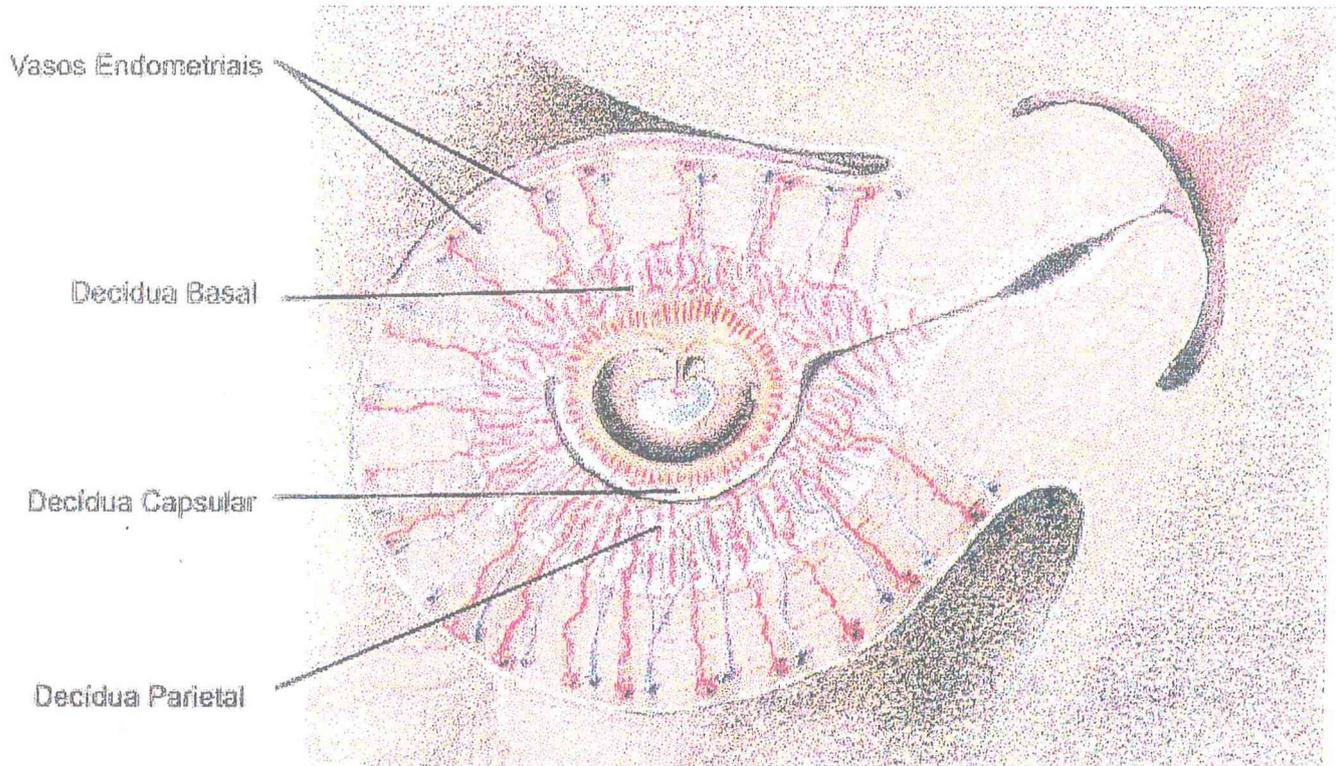


Figura 1 – Ilustração representando uma gravidez tópica inicial em um útero seccionado transversalmente. Estão sendo evidenciadas as três formas de decídua (basal, capsular e parietal) e a vascularização decidual pelas artérias e veias uterinas. Figura retirada do livro “Sonography in Obstetrics and Gynecology – principles & practice” (Fleischer e cols., 1996).

O trofoblasto cresce formando interdigitações de células para dentro da decídua. Estas interdigitações são denominadas de vilosidades trofoblásticas. Até o final da segunda semana de desenvolvimento embrionário, as vilosidades são chamadas de primárias porque são formadas exclusivamente por tecido trofoblástico. As vilosidades trofoblásticas invadem a decídua materna, inclusive os vasos decíduais, e o sangue dos vasos decíduais extravasa preenchendo os espaços intervilosos. As vilosidades, os espaços intervilosos e a decídua basal estão representados nas figuras 2 e 3 (Rezende & Montenegro, 1991; Moore e Persaud, 1994; Fleischer & Kepple, 1996; Spirt & Gordon, 1996).

Os tecidos trofoblásticos são epiteliais e podem ser classificados em dois tipos diferentes: o citotrofoblasto e o sinciciotrofoblasto. O sinciciotrofoblasto é uma camada tecidual mais externa das vilosidades, por isso, é a que mais entra em contato com os tecidos maternos. O sinciciotrofoblasto é constituído por células muito unidas, que apresentam microvilos na borda superior. Já o citotrofoblasto é constituído por células cúbicas, que inicialmente estão muito unidas, mas que após a 20ª semana de gestação tornam-se mais esparsas e numericamente bem reduzidas (Moore e Persaud, 1994; Rasheed e cols., 1992; McMaster e cols., 1995).

Quando o mesênquima de origem fetal cresce dentro das vilosidades primárias formando um eixo de tecido conjuntivo frouxo, as vilosidades são chamadas de secundárias. Na etapa seguinte, no estroma das vilosidades coriônicas, surgem capilares sanguíneos e as vilosidades tornam-se terciárias. As vilosidades terciárias são encontradas quando o embrião está com cerca de 20 dias após a fecundação (Moore & Persaud, 1994).

Nas vilosidades trofoblásticas secundárias, macrófagos foram detectados antes de se iniciar a angiogênese e, por isso, foi sugerido que os macrófagos fossem derivados das células mesenquimais das vilosidades (Fox, 1967; Wood, 1980). Redline & Patterson (1993) sugeriram que uma pequena proporção, variando de 0,9% a 3,2% das células nas vilosidades placentárias normais eram de origem materna, que atravessam a barreira trofoblástica em direção aos tecidos fetais. Em casos de inflamação (vilites), a quantidade de células mononucleares de origem materna nas vilosidades placentárias aumenta para cerca de 30 a 50% (Redline & Patterson, 1993).

As vilosidades trofoblásticas se ramificam de uma vilosidade tronco que originam as vilosidades flutuantes e as de ancoragem. As vilosidades trofoblásticas flutuantes constituem a grande maioria das vilosidades placentárias e, são assim chamadas, porque são banhadas pelo sangue materno do espaços intervilosos. O intercâmbio de oxigênio e dióxido de Carbono e a captação de nutrientes como glicose e aminoácidos são realizadas pelas vilosidades flutuantes (Sala & Matheus, 1984; Bosco e cols, 1997). No último trimestre de gravidez, as vilosidades flutuantes perdem a sua camada de sinciciotrofoblasto e a de citotrofoblasto torna-se descontínua, ficando a vilosidade constituída principalmente por estroma, o que facilita ainda mais a passagem de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto (Rasheed e cols. 1992; McMaster e cols. 1995; Bright & Ockleford, 1995; Oliveira e cols. 1996).

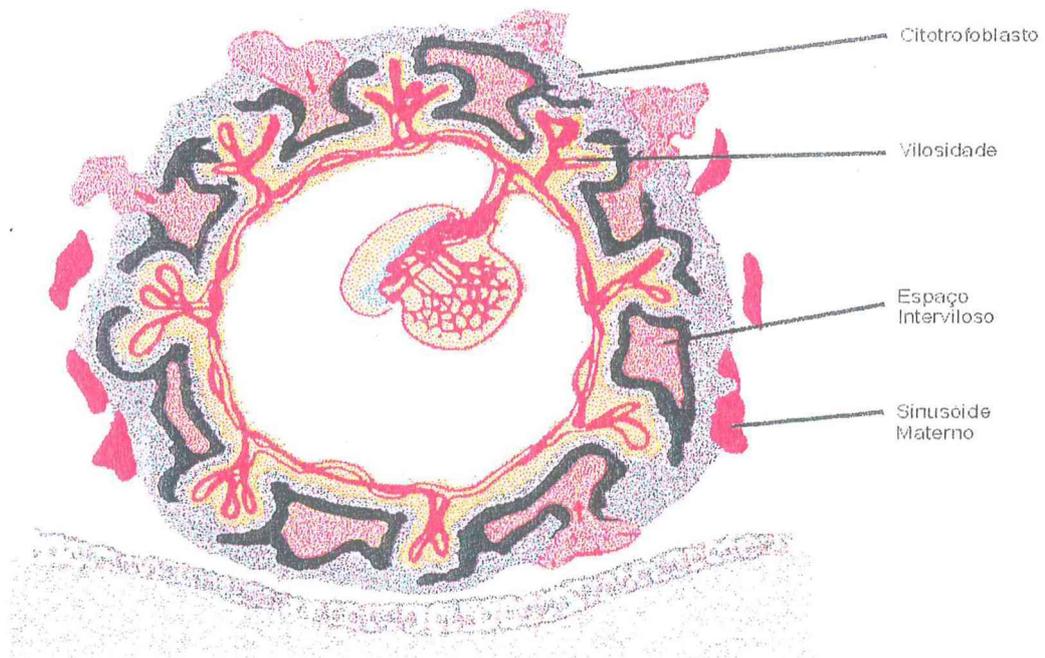


Figura 2- Diagrama de uma gravidez no curso da 5ª semana de idade gestacional. Estão representados o embrião e os vasos sanguíneos embrionários que se comunicam com os vasos das vilosidades. Estão demonstrados também os sinusóides maternos, que ao serem invadidos pelo citotrofoblasto, extravasam sangue para os espaços intervilosos. Figura baseada em outras figuras do livro de Embriologia Clínica ( Moore e Persaud, 1994).

As vilosidades de ancoragem são as que atingem a decídua basal e nela prendem-se firmemente por meio de seu revestimento citotrofoblástico. A camada de citotrofoblasto das vilosidades de ancoragem projeta-se além do sincitiotrofoblasto, ficando em contato direto com a decídua basal (Labarrere & Faulk, 1992). A representação gráfica das vilosidades de ancoragem podem ser encontradas nas figuras 3 e 4. Ocorrem duas ondas de migrações citotrofoblásticas que partem do topo das vilosidades de ancoragem. A primeira onda de

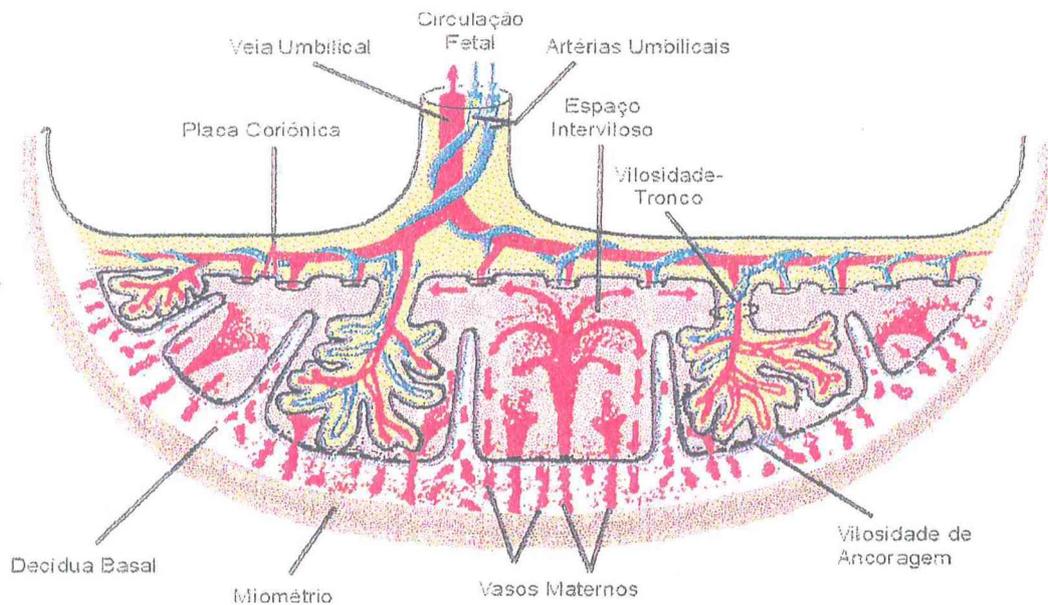


Figura 3- Diagrama de uma placenta, com a finalidade de mostrar a circulação fetal se comunicando com os capilares das vilosidades flutuantes, estas sendo banhadas pelo sangue materno nos espaços intervilosos e as vilosidades de ancoragem atingindo a decídua basal. Figura retirada do livro Embriologia Clínica ( Moore e Persaud, 1994).

migração ocorre entre a 6<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semana de idade gestacional e, a segunda, ocorre entre a 16<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana de idade gestacional. Estas ondas de migrações citotrofoblásticas atingem os vasos uterinos espiralados, substituem o endotélio e o tecido muscular arterial materno, diminuindo assim resistência vascular e aumentando o suprimento sanguíneo no interior dos espaços intervilosos. As conseqüentes alterações vasculares decorrentes a estas invasões citotrofoblásticas são de fundamental importância para o bom desenvolvimento fetal (Vinatier, & Monnier, 1990; Labarrere & Faulk, 1991; Mabie, W.C., 1991; Cerri, Molnar & Vezozzo, 1996).

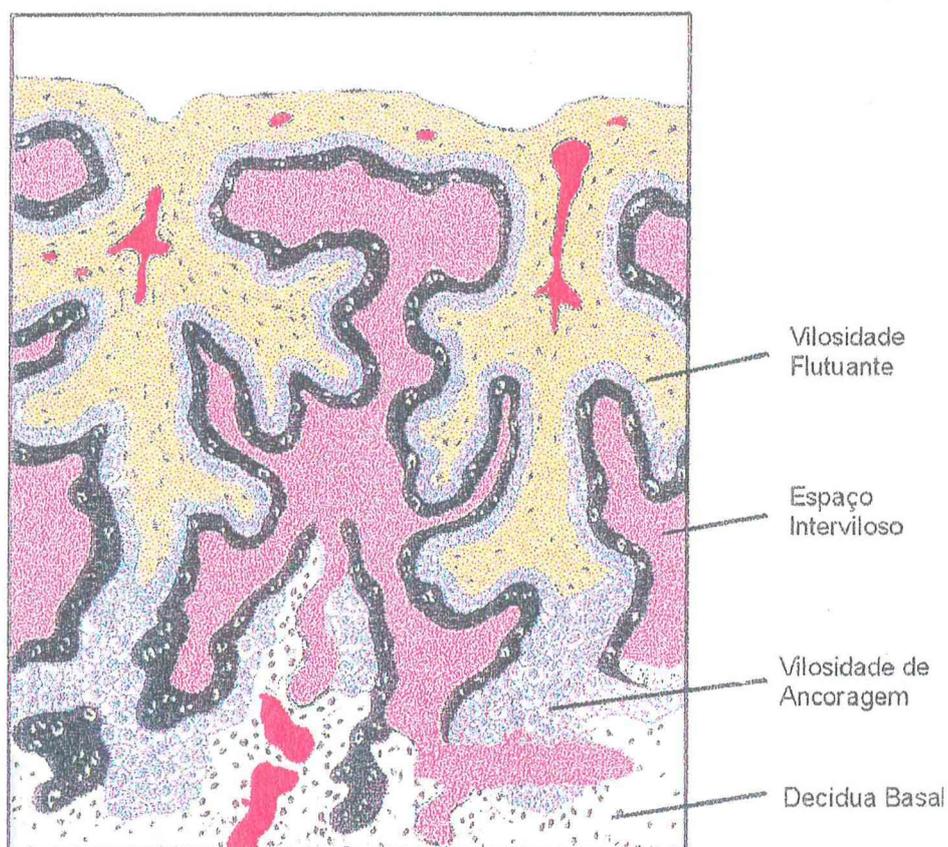


Figura 4- Desenho ilustrativo de uma secção transversal de uma vilosidade de ancoragem invadindo a decídua basal.

O feto e a placenta podem ser considerados aloenxertos no hospedeiro materno devido a presença de antígenos paternos. A placenta é um órgão de existência biológica curta, constituída por células de dois organismos genética e antígenicamente diferentes (a gestante e o conceito). Apesar da antigenicidade das células fetais, o feto não é rejeitado pelo organismo materno. Uma variedade de eventos hormonais e imunológicos que ocorrem durante a gravidez parecem modular a resposta imunológica materna aos antígenos fetais. Dentre estes eventos, podemos citar que a imunogenicidade dos tecidos fetais pode estar diminuída, pois o sinciciotrofoblasto, o principal constituinte da interface materno-fetal, não expressa os antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) da classe I (HLA-A, B e C) nem de classe II (HLA-DR, DQ, DP) (Bulmer, Morrinson & Smith, 1988(b); Labarrere & Faulk, 1991). A reação imunológica geralmente se inicia pela apresentação dos antígenos ligados às moléculas do CPH da classe I ou da classe II aos linfócitos T CD4+ ou CD8+, respectivamente; sendo assim, na ausência destas moléculas do CPH, a apresentação dos antígenos aos linfócitos fica prejudicada (Abbas, Lichtman & Pober, 1995). Entretanto, os citotrofoblastos que invadem o útero apresentam em sua superfície uma seqüência molecular 86% idêntica às moléculas do CPH da classe I e que foi denominada de HLA-G. A expressão do HLA-G pelos trofoblastos também pode ser importante para a imunotolerância materna já que as células que apresentam HLA-G são resistentes à lise das células NK e dos grandes linfócitos granulares, células muito encontradas na mucosa uterina no início da gravidez (McMaster e cols, 1995; McMaster e cols, 1998). A expressão do HLA-G também tem sido demonstrada no endotélio dos vasos fetais e nos macrófagos fetais (Yang e cols, 1996; Blaschitz e cols, 1997).

Outro aspecto importante para imunotolerância materna aos antígenos fetais é a concentração aumentada na corrente sanguínea materna de substâncias imunossupressoras como a Progesterona e a Alfa-fetoproteína. Assim também como a produção de citocinas pelas células decíduais, tais como a Prostaglandina E2, o Fator Transformador do Crescimento- $\beta$  (TGF-beta), a interleucina-6 e a interleucina-10, as quais reduzem a resposta imunocelular local, diminuindo a ativação macrofágica e a produção de TNF (Fator de Necrose Tecidual) (Landers e cols., 1992; Hunt e Robertson, 1996; Sanchez e cols., 1997; Miller e Hunt, 1998).

A celularidade da placenta começou a ser estudada há cerca de um século. Em 1903, Hofbauer publicou um trabalho de descrição morfológica sobre os macrófagos das vilosidades coriônicas (Hofbauer *apud* Fox 1967). Devido a este trabalho, os macrófagos receberam o epônimo de células de Hofbauer (Fox, 1967; Goldstein e cols, 1988). Este epônimo foi contestado porque os macrófagos das vilosidades placentárias já haviam sido descritos, em 1885 e em 1888, por Katschenko e Minot, respectivamente (Fox, 1967; Enders & King, 1970; Wetzka e cols., 1997). A típica célula de Hofbauer tem dimensões de 10 a 40 micra, contém citoplasma abundante, projeções citoplasmáticas, vacúolos intracitoplasmáticos e núcleo excêntrico (Oliveira e cols, 1987; Enders & King, 1970; Goldstein e cols, 1988; Nakamura & Otha, 1990).

Em 1956, Rodway e Marsh, *apud* Fox (1967), realizaram um estudo morfológico em placentas e encontraram as células de Hofbauer em apenas 20% das placentas. Em 1967, Fox estudou 667 placentas a termo através do método de coloração hematoxilina e eosina e detectou a célula de Hofbauer em 81,4% das placentas, sendo que na maioria dos casos (66%) em apenas 1% das vilosidades.

Wood, em 1980, quantificou os macrófagos em uma suspensão de células placentárias humanas. Foram estudadas 71 placentas humanas e, em cada caso, este autor lavou e fragmentou a placenta, realizou uma digestão enzimática e obteve uma suspensão de células. Das placentas, quarenta eram de gravidezes do primeiro trimestre, vinte e cinco eram de gravidezes do segundo trimestre e seis eram de gravidezes do terceiro trimestre. Os macrófagos foram identificados como as células que formavam rosetas com hemácias de carneiro encobertas por anticorpo de coelho anti-carneiro. Este autor sugeriu que os macrófagos eram aproximadamente 70% das células placentárias. Comparou este resultado com um estudo morfológico destas células em suspensão, após serem submetidas a coloração de Wright. Examinou morfológicamente no mínimo 200 células para cada caso, e encontrou um resultado semelhante ao obtido com as formações de rosetas. Wood (1980) também sugeriu que esta porcentagem de macrófagos permanecia constante na placenta humana durante toda a gravidez.

Wood (1980), em outra pesquisa, quantificou os macrófagos nos tecidos uterinos e na placenta durante a gestação em camundongos. Utilizando soro de coelho anti-macrófagos

de camundongos, através do método de imunofluorescência indireta, observou que os macrófagos são abundantes nos tecidos uterinos e são raros nas placentas murinas.

Bulmer e Johnson (1984) estudaram 20 placentas, sendo a metade constituída por placentas do 1º trimestre e a outra por placentas de gravidez a termo. Estes autores utilizaram o método de imunohistoquímica indireta e a marcação pelo anticorpo monoclonal anti-CD14 para identificar macrófagos e encontraram que a quase totalidade das células do estroma das vilosidades e a maioria das células decíduais, independente da idade gestacional, eram macrófagos.

Bulmer e cols., em 1988a, utilizando o método de imunohistoquímica em 10 placentas de gravidezes humanas a termo, observaram que os macrófagos, identificados pelo anti-CD14, foram as células predominantes na decídua basal e expressaram os antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II. Bulmer e cols. (1988b) observaram também que os linfócitos T foram pouco encontrados na decídua basal, sendo que 75% dos linfócitos foram marcados pelo anticorpo anti-CD4 e apenas 25% pelo anticorpo anti-CD8; e os linfócitos B, identificadas como células marcadas pelo anticorpo anti-CD22, foram praticamente ausentes.

Após a introdução da imunohistoquímica, foi observado que a clássica célula de Hofbauer era apenas uma das formas do macrófago fetal (Bulmer e cols., 1988a; Faulk e Labarrere, 1992).

Considerando a morfologia como um critério muito subjetivo para definir a presença de macrófagos em tecidos placentários, a imunohistoquímica pode ser considerada um dos grandes avanços científicos porque passou a permitir a identificação de marcadores celulares e de outras substâncias em um tecido, a partir da visualização da reação antígeno e anticorpo. A importância dos anticorpos monoclonais foi reconhecida mundialmente pelo prêmio Nobel em 1984, com mérito ao trabalho publicado, em 1975, pelos seguintes pesquisadores: Georges Kohler e Cesar Milstein (Abbas e cols., 1995; Steward & Male, 1998).

Os estudos imunohistoquímicos iniciais na placenta revelaram que os macrófagos eram as células mais frequentes, na decídua e nas vilosidades, independente da idade gestacional (Bulmer & Johnson, 1984; Bulmer e cols., 1988a). Wood (1980), por isso, considerou a placenta um órgão do Sistema Retículo Endotelial e sugeriu como uma das

funções deste órgão a defesa do conceito contra substâncias lesivas e infecções provenientes do organismo materno.

Nas vilosidades placentárias, os macrófagos identificados como células marcadas pelo anticorpo anti-CD14, foram considerados as células predominantes nas placentas do primeiro e do terceiro trimestres (Bulmer & Johnson, 1984; Bulmer e cols. 1988a). Goldstein e cols. (1988) estudaram 10 placentas de primeiro trimestre e 10 placentas de terceiro trimestre, também utilizando o anticorpo monoclonal anti-CD14 pelo método de imunohistoquímica, e observaram que os macrófagos representaram 40% das células do estroma das vilosidades e que a distribuição era a mesma nas diferentes idades gestacionais.

Nakamura e Ohta (1990) estudaram 15 placentas, utilizando o anticorpo monoclonal anti-CD14 como marcador de macrófagos, e afirmaram haver diferenças no número de macrófagos dependendo da idade gestacional das vilosidades. Estes autores encontraram 0 a 4% de macrófagos dentre as células das vilosidades de primeiro trimestre e 40 a 55% de macrófagos dentre as células das vilosidades de terceiro trimestre.

Na decídua de primeiro trimestre de gravidez, entretanto, os estudos mostraram que os grandes linfócitos granulares são as células predominantes (Fay & Grudzinskas, 1991; King e cols., 1996; Mincheva-Nilsson e cols., 1997), seguidos numericamente pelos macrófagos e linfócitos T (Hill e cols., 1995). Starkey e cols. (1988) descreveram que 75% das células deciduais de gravidez humana inicial são leucócitos, dos quais 45% são grandes linfócitos granulares, 19% são macrófagos e 8% são linfócitos T.

Mincheva-Nilsson e cols, em 1997, encontraram que grandes linfócitos granulares eram escassos e menos numerosos do que os macrófagos, durante o terceiro trimestre de gravidez. Rasheed e cols., em 1992, encontraram que 96% das células deciduais no terceiro trimestre eram leucócitos, dos quais a grande maioria eram macrófagos, identificados pelos anticorpos anti-CD68 (36,7%) e anti-CD14 (16,6%). Os linfócitos T, que foram identificados como as células marcadas pelo anticorpo monoclonal anti-CD3, foram considerados o segundo tipo celular mais freqüente na decídua do terceiro trimestre (Bulmer e Sunderland, 1984; Bulmer e cols., 1988a; Hunt e Robertson, 1996).

Os grandes linfócitos granulares, células predominantes na decídua do primeiro trimestre, são caracterizados antigenicamente pela marcação positiva com anticorpos anti-CD2 e anti-CD56 e pela marcação negativa aos anticorpos anti-CD3, anti-CD7, anti-CD4,

anti-CD8 e anti-CD16. Os marcadores celulares CD2 e CD56, que estão presentes no grandes linfócitos granulares, são encontrados em linfócitos T e em células NK, respectivamente (Male, e cols., 1991; Abbas e cols., 1995). Os grandes linfócitos granulares podem possuir uma função de células NK (“Natural Killer”) (Fay & Grudzinskas, 1991), mas diferem das clássicas células NK porque não são marcados pelos anticorpos anti-CD16 e anti-CD57 (King e cols., 1996; Mincheva-Nilsson e cols., 1997).

Os linfócitos T estão presentes na placenta humana e representam cerca de 1 a 3% das células decíduais (Lessin e cols., 1988; Mues e cols., 1989) e 2 a 5% das células do estroma das vilosidades placentárias (Nakamura e Olta, 1990). A maioria dos linfócitos T são marcados pelo anticorpo anti-CD8, ou seja, são linfócitos citotóxico-supressores (Bulmer, 1988; Mues e cols., 1989). Greco e cols. (1992) utilizaram o anticorpo anti-CD45Ro para identificar linfócitos T no estroma das vilosidades placentárias e não observaram positividade nas células, mesmo quando havia vilite, situação em que se esperava que estas células estivessem presentes em grande quantidade. Redline e Patterson (1993) repetiram a pesquisa em vilosidades normais e com vilite porém utilizando o anticorpo anti-CD3. Estes pesquisadores encontraram que 0,4 a 3,2% das células do estroma das vilosidades normais estavam marcadas pelo anticorpo anti-CD3 e quando havia vilite a proporção mudava para 30 a 54% das células.

Os linfócitos B são raramente encontrados na decídua e no estroma das vilosidades placentárias de gravidezes humanas. Os anticorpos anti-CD20 e anti-CD22 foram utilizados para identificar os linfócitos B em placentas humanas e estas células estavam presentes em apenas 0 a 2% das células placentárias (Mues e cols., 1989; Nakamura e Olta, 1990, Dietl e cols., 1992; Greco e cols., 1992; Bondarenko e cols., 1998).

Pesquisadores investigaram a interface materno-fetal em camundongos e demonstraram que os macrófagos (Van Oostveen e cols., 1992; Brandon, 1995) e os linfócitos T e B foram raramente encontrados (Van Oostveen e cols., 1992; Hunt e cols., 1997). Na decídua basal de gravidezes murinas, os macrófagos apareceram apenas ao final da gestação, quando da degeneração placentária, o que sugeriu que estas células não eram importantes para o ambiente imunológico da gravidez inicial (Brandon, 1995). Moskalewski e cols. (1974) encontraram macrófagos numa suspensão de células placentárias de camundongos na proporção de 3 a 10% das células. Pesquisadores relataram que as células

deciduais de gravidezes em roedores liberaram substâncias, tais como a progesterona, que inibiam a atividade dos macrófagos e dos linfócitos (Redline e cols., 1990; McKay e cols., 1992; Szekeres-Bartho e cols., 1997).

Além da identificação do tipo de celularidade presente na placenta, os pesquisadores têm investigado a função destas células em relação aos eventos clínicos durante a gravidez. Um dos aspectos analisados foi a tolerância imunológica materna aos aloantígenos do concepto. O concepto contém antígenos herdados do seu pai, que são estranhos ao organismo materno e, mesmo assim, a gestante não apresenta reação de rejeição (Lewis e cols; 1986; Yagel e cols; 1990; Van Oostveen e cols, 1992). É aceito que os antígenos a serem rejeitados são processados por macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e células endoteliais antes de serem apresentados aos linfócitos. Os linfócitos T quando ativados por estes antígenos processados liberam citocinas inflamatórias. Porém, os principais constituintes da interface materno-fetal, o citotrofoblasto e o sinciciotrofoblasto, não contém antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade, o que deve contribuir para que as células maternas não os reconheçam como aloantígenos (Faulk & McIntery, 1983).

Hill (1995) procurou demonstrar a expressão dos antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I e de classe II pelas células trofoblásticas como causa de abortamento espontâneo, porém esta hipótese não foi confirmada. Não foi observada também diferença nas frequências percentuais das células do sistema imunológico nas decíduas de gravidezes normais e de abortamentos espontâneos (Vassiliadou & Bulmer 1998); porém, foi detectada uma maior ativação dos linfócitos T (Maruyama e cols., 1992) e dos macrófagos (Hill e cols., 1995), caracterizada pela marcação positiva destas células com o anticorpo anti-HLA-DR (Labarrere e Faulk, 1992).

Lachapelle e cols. (1996) estudaram 35 amostras endometriais, sendo que 20 pertenciam a pacientes com abortamento de repetição e 15 pertenciam a pacientes férteis normais. Estes autores observaram que, nos casos de abortamento de repetição, há um aumento da quantidade de grandes linfócitos granulares, células marcadas pelo anticorpo anti-CD16, e de linfócitos B, identificados como células marcadas pelo anti-CD20, e também há um aumento na proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em relação aos CD8<sup>+</sup>. Ficou caracterizado por estes autores também que os linfócitos granulares que predominam no endométrio de mulheres férteis e na decídua de gravidez inicial normal são anti-CD56<sup>+</sup> e anti-CD16<sup>-</sup>. Os

grandes linfócitos granulares, CD16+, são citotóxicos para o trofoblasto e são mais encontrados normalmente no sangue periférico.

Greco e cols., em 1997, relataram que nos casos de vilites, os macrófagos aumentam em quantidade nas vilosidades trofoblásticas acometidas e que os linfócitos T, normalmente escassos, também tornam-se mais presentes, mais às custas dos linfócitos T auxiliares (CD4+). E, os linfócitos B, pesquisados pela marcação positiva com o anti-CD19, não foram encontrados. As vilites de origem inespecífica são áreas de necrose fibrinóide associadas a infiltrado de células mononucleares no estroma das vilosidades coriônicas sem que tenha sido detectada qualquer infecção. Cerca de 1,7% das vilosidades coriônicas de placentas normais contém evidências de vilite. Quando as vilites inespecíficas atingem mais de 50% das vilosidades coriônicas, estas lesões estão associadas ao Retardo de Crescimento fetal Intra-Útero (RCIU), a pré-eclâmpsia e a perdas gravídicas repetidas (Labarrere, McIntyre & Faulk, 1990).

Os macrófagos decíduais e as células estromais da decídua, na presença de Fator alfa de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) produzem trinta vezes mais prostaglandinas, o que sugere que a estimulação com TNF- $\alpha$  seja um possível mecanismo desencadeante do trabalho de parto (Norwitz e cols., 1992; Romero e cols., 1990 e Gravett e cols., 1994). Shimonovitz e cols., em 1995, encontraram que o Fator alfa de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) e a Interleucina-1 são citocinas secretadas principalmente pelos macrófagos e estimulam a produção de prostaglandinas que são associadas ao aumento da contratilidade uterina (Norman e Reddi, em 1990).

Então, algumas teorias do desencadeamento do trabalho de parto se baseiam na produção de citocinas inflamatórias e de prostaglandinas pelas células do sistema imunológico da placenta. Por isso, em nosso estudo, resolvemos analisar se o trabalho de parto está associado a modificações na distribuição destas células do sistema imunológico dentro das vilosidades coriônicas de placentas humanas a termo. Na literatura, não encontramos estudos que comparassem a distribuição de células do sistema imunológico em vilosidades placentárias de pacientes que desencadearam o trabalho de parto com as de pacientes que não entraram em trabalho de parto. O fato de ser uma investigação inédita nos estimulou ainda mais a execução desta pesquisa.

Escolhemos os tecidos fetais placentários para o nosso estudo porque existem evidências de que os sinais que desencadeiam o parto são provenientes do feto. Por exemplo, o aumento da expressão dos receptores de interleucina-8, citocina produzida principalmente pelos macrófagos vilosos da placenta, foi considerada importante para a instalação da atividade contrátil uterina (Kliman & Meaddough, 1995; Maradny e cols., em 1996). O fator ativador das plaquetas (PAF) foi mencionado como um outro possível gatilho para o desencadeamento do trabalho de parto, pois a sua concentração estava duas vezes aumentada no líquido amniótico e nas membranas fetais durante o trabalho de parto. O PAF é secretado pelos rins e pelos pulmões do feto quando maduro. O PAF também é produzido pelos macrófagos, neutrófilos e plaquetas das membranas placentárias (Coulan 1992).

Como não encontramos na literatura mundial nenhuma pesquisa que comparasse placentas obtidas de parto normal e placentas obtidas de cesáreas eletivas quanto à proporção de macrófagos e linfócitos em suas vilosidades, levantamos uma hipótese de estas células pudessem estar em maior quantidade em tecidos placentários de pacientes que desencadearam o trabalho de parto.

Porque os dados sobre a distribuição de células do sistema imunológico nas vilosidades de placentas humanas são escassos na literatura científica mundial e porque não encontramos nenhum trabalho realizado em nosso país sobre este assunto, decidimos entrar nesta linha de pesquisa.

## **2. OBJETIVOS**

**2.1 GERAL:** Verificar a distribuição de macrófagos e linfócitos em vilosidades placentárias humanas a termo e saudáveis.

### **2.2 ESPECÍFICOS :**

**2.2.1** -Verificar, em vilosidades placentárias humanas de gestação a termo, a distribuição das células marcadas pelos seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD68 (macrófagos), anti-CD43 (linfócitos T) e anti-CD20 (linfócitos B).

**2.2.2** – Verificar se existe uma homogeneidade entre as placentas quanto às proporções de células marcadas pelos anticorpos anti-CD68, anti-CD43 e anti-CD20.

**2.2.3** - Analisar comparativamente a distribuição destas células em vilosidades coriônicas de placentas obtidas após partos normais e após cesáreas eletivas.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 AMOSTRA

A amostra foi constituída de 31 placentas obtidas de pacientes sem evidências de intercorrências clínico-obstétricas. As pacientes estavam com gestação a termo (37 a 42 semanas de gestação) e foram atendidas no Centro Obstétrico da Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC) da Universidade Federal do Ceará e na maternidade do Hospital da Polícia Militar do Ceará no período de julho/98 a fevereiro/99.

As placentas foram divididas em dois grupos:

Grupo 1- parto normal. Este grupo foi constituído por 20 placentas (64,51% da amostra), obtidas de parturientes que evoluíram satisfatoriamente para o parto normal, ou seja, tiveram o período de dilatação do colo numa velocidade de 1cm por hora e o período expulsivo e o delivramento duraram menos de 30 minutos cada.

Grupo 2- parto cesariano. Este grupo foi constituído por 11 placentas (35,49 % da amostra) obtidas de pacientes que não haviam desencadeado o trabalho de parto e foram submetidas a cesáreas eletivas devido as seguintes indicações: apresentação pélvica (2 casos), cesárea anterior (4 casos), desproporção céfalo-pélvica (5 casos).

Os critérios descritos anteriormente para a aceitação do caso em cada um dos grupos deste estudo são conceitos estabelecidos em Obstetrícia (Friedman, 1971; O'Brein & Cefalo, 1996; Maestá e cols., 1999).

Foram excluídos os casos com intercorrências clínico-obstétricas, tais como: amniorrexe prematura, sinais de infecção intra-parto, Doença Hipertensiva Específica da Gravidez (DHEG) e diagnóstico prévio de qualquer patologia. Foram excluídos também os casos em que os recém-nascidos foram de baixo peso, ou seja, peso abaixo do percentil 10 para idade gestacional (Usher, R & McLean, F, 1969; Bernstein, I & Gabbe, S.G., 1996); como também foram excluídos os casos em que os recém-nascidos que pesaram acima de 4000 gramas, porque este peso já caracteriza a macrossomia fetal (Spellacy, W.N. et al, 1985; Varner, M.V, 1991; Landon, M.B. 1996).

### 3.2 PREPARAÇÃO DAS PLACENTAS

As placentas selecionadas não apresentavam quaisquer alterações morfológicas e, logo após o delivramento, eram submetidas a uma dissecação com tesoura de um cotilédone central a fim de se obter um fragmento de 1cm<sup>3</sup> de vilosidades coriônicas. Para identificar as vilosidades coriônicas era necessária uma lavagem exaustiva do fragmento em água corrente a fim de retirar coágulos e restos de decídua. O fragmento era então acondicionado em papel laminado e congelado à -70°C até a sua utilização no ensaio. Cortes histológicos de 5 micra foram realizados no criostato IEC (International Equipment Company/ Minotome plus), a uma temperatura de -25° C e preparadas 10 a 12 lâminas de cada caso. Pelo menos uma lâmina representativa do material foi corada com hematoxilina e eosina para ser verificada a qualidade da amostra e afastar alterações histológicas como hidropsia, vilites, necrose e outras. Em seguida, as lâminas eram acondicionadas em recipiente fechado à temperatura de -20°C durante um período que variou de 1 a 10 dias, quando então eram submetidas a fixação e coloração pela técnica de imunoperoxidase .

### 3.3 REAGENTES

#### 3.3.1 SOLUÇÃO FIXADORA

Foi preparada volume a volume com acetona ( Synth, Diadema- SP) e metanol (Reagen, Rio de Janeiro - RJ).

#### 3.3.2 SOLUÇÃO TAMPÃO: TBS (Tris Buffered Salina)

Inicialmente, foram dissolvidos 60,57 gramas de tris (Reagen, Rio de Janeiro-RJ) em 500 ml de água destilada. Depois foram dissolvidos 32,33ml de ácido clorídrico( Merck, São Paulo-SP) em 344 ml de água destilada. As duas soluções foram misturadas e, em seguida, foi ajustado o pH a 7,6 e completado a solução com água destilada para um total de 1000 ml (solução-mãe). Para cada 500ml desta solução-mãe, foi acrescentado 40g de cloreto de sódio (Vetec, Rio de Janeiro- RJ) e completado o volume com água destilada até 5000 ml (solução de trabalho).

### 3.3.3 SOLUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

O peróxido de hidrogênio foi diluído ( Reagen, Rio de Janeiro - RJ) em metanol (Reagen, Rio de Janeiro- RJ) na concentração de 4%.

### 3.3.4 SOLUÇÃO TBS/BSA

A albumina bovina (Sigma, Steinheim - Alemanha) foi diluída em TBS na concentração de 5%.

### 3.3.5 SOLUÇÃO DE SORO NORMAL DE COELHO

O soro normal de coelho foi diluído em solução de BSA na concentração de 1:5.

### 3.3.6 ANTICORPOS MONOCLONAIS :

1. anti-CD68 – Como marcador de macrófagos, utilizamos o soro de camundongo anti-humano, clone KP1, fabricado pela DAKO, código nº MO814, Dinamarca, diluído a 1:50 em solução de BSA (Pulford e cols, 1989; Ramprasad e cols, 1995; Greco e cols.,1992).

2. anti-CD20 - Como marcador de linfócitos B, utilizamos o soro de camundongo anti-humano, clone L26, fabricado pela Dako, código nº MO755, Dinamarca, diluído a 1:50 em solução de BSA ( Greco e cols, 1992; Emmrich e cols, 1998).

3. anti-CD43 (marca linfócitos T) - Como marcador de linfócitos T, utilizamos o soro de camundongo anti-humano, clone DF-T1, fabricado pela DAKO, código MO786, Dinamarca, diluído a 1:50 em solução de BSA, ( Borch e cols, 1987; Stross e cols, 1989; Cobbold e cols, 1986; Kruse e cols, 1998; Stockton e cols, 1998; Thurman e cols, 1998) .

4. anticorpo de coelho anti-imunoglobulina de camundongo biotilado- fabricado pela DAKO, código nº EO354. Utilizado como anticorpo secundário da reação, diluído a 1:200 em solução de BSA.

### 3.3.7 COMPLEXO AVIDINA-BIOTINA (ABC)

A avidina foi diluída a 1:100 em solução de BSA e a biotina diluída do mesmo modo. Foi calculado o volume para uso no dia, considerando 200 microlitros para cada corte histológico.

### 3.3.8 DIAMINOBENZIDINA-

O comprimido de 10mg de diaminobenzidina foi dissolvido em 10 microlitros de peróxido de hidrogênio e, a seguir, diluído em 10 ml de TBS.

### 3.3.9 HEMATOXILINA DE HARRIS

Foram dissolvidos 7g de cristais de hematoxilina em 50 ml de álcool absoluto. Foram dissolvidos 100 gramas de amônia em 1000 ml de água destilada, e aquecidos a 80°C. As duas soluções foram misturadas e aquecidas até a ebulição, que não excedeu 1 minuto. A seguir, 2,5g do óxido amarelo de mercúrio foram adicionados lentamente. Depois, a solução foi agitada e aquecida até adquirir a cor púrpura. A seguir, a solução, foi resfriada em água fria. Finalmente, foram adicionados 5 ml de ácido acético glacial para cada 200 ml da solução.

## 3.4 TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE

As lâminas foram inicialmente descongeladas em temperatura ambiente por um período de 10 minutos e então imersas na solução fixadora durante 2 minutos. Após a fixação, as lâminas foram lavadas com solução de TBS durante 5 minutos e, a seguir, foram lavadas duas vezes em solução de peróxido de hidrogênio por 10 minutos cada lavagem. Depois disso, foram lavadas em solução de TBS durante 5 minutos e em seguida incubadas em solução de soro normal de coelho por 20 minutos. Passado este tempo, as lâminas foram recobertas com 200 microlitros do anticorpo primário camundongo anti-humano (anti-CD68 ou anti-CD43 ou anti CD20) e incubadas em câmara úmida a 4° C durante 16 a 18 horas. Foram preparadas, no mínimo, três lâminas de cada caso e cada uma das lâminas foi corada com um dos anticorpos monoclonais primários. No outro dia, as lâminas eram lavadas duas vezes na solução de TBS, cada lavagem com a duração de 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo de coelho anti-camundongo biotilado em câmara úmida, por 30 minutos. A seguir, as lâminas foram banhadas durante 5 minutos em solução de TBS e, depois, incubadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase em câmara úmida durante 30 minutos. Após este tempo, as lâminas eram lavadas em solução de TBS e depois incubadas com a substância reveladora diaminobenzidina (DAB) em câmara úmida durante 7 minutos. Na etapa seguinte,

as lâminas eram lavadas em água corrente durante 5 minutos, depois submetidas a uma contracoloração com a hematoxilina de Harris por 1 minuto. A seguir, desidratadas com uma bateria de concentrações crescentes de álcool e xilol e montadas com lamínulas em bálsamo do Canadá para a leitura ao microscópio óptico.

#### CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO

Como controle positivo da reação, foram utilizados linfonodos. Para cada bateria de lâminas de placenta coradas para um certo anticorpo monoclonal, foi incluída uma lâmina do linfonodo como controle positivo, pois todas as células pesquisadas poderiam ser encontradas neste tecido.

Como controle negativo da reação, utilizamos cortes histológicos de placenta, nos quais não foram utilizados os anticorpos monoclonais primários.

#### 3.5 LEITURA DAS LÂMINAS

Para cada caso, foram coradas três lâminas, sendo uma lâmina para cada anticorpo monoclonal primário (anti-CD68, anti-CD43 e anti-CD20). Foram observados, em média, 24 vilosidades coriônicas terminais em cada lâmina para determinação do percentual de células marcadas com cada anticorpo monoclonal. As células foram consideradas marcadas pelo anticorpo monoclonal quando a superfície delas estava completamente contornada pelo cromógeno.

A contagem das células foi realizada ao microscópio óptico com o aumento de 40x e 100x. Foram contadas todas as células do estroma das vilosidades placentárias e discriminadas a quantidade de células marcadas por um dos anticorpos monoclonais primários.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, consideramos as frequências percentuais de células marcadas em relação ao total de células no estroma das vilosidades por placenta.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para analisar a normalidade da distribuição das placentas quanto a proporção de células marcadas pelos anticorpos anti-CD68, anti-CD43 e anti-CD20 nas suas vilosidades.

O teste de Mann-Whitney foi realizado para estudar a igualdade de distribuição entre as placentas do grupo I e do grupo II, quanto a proporção de células marcadas pelos anticorpos anti-CD68, anti-CD43 e anti-CD20 nas suas vilosidades.

Todos os testes foram feitos com um nível de significância de 0,05. Utilizamos os Programas estatísticos de computador SPSS 7.5 para windows (Tukey, 1977) para a realização dos testes e confecção de algumas tabelas e gráficos. Utilizamos o programa Excel 97 para Windows para confecção de tabelas e gráficos e o programa Windows 95 para redigir o texto.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 DADOS GERAIS

As pacientes estavam com a gravidez a termo (37 a 42 semanas de gestação), sem anormalidades clínicas detectáveis, na faixa etária entre 14 e 36 anos (média =  $22,68 \pm 5,49$ ) e foram atendidas no Centro Obstétrico da Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC) da Universidade Federal do Ceará e na maternidade do Hospital da Polícia Militar do Ceará no período de julho/98 a fevereiro/99 (anexo 1). Os recém-nascidos destas gestantes pesaram entre 2600 e 3990 gramas (média de  $3.282g \pm 299g$ ) e não apresentaram quaisquer intercorrências clínicas no berçário.

As médias das idades maternas, das idades gestacionais e do peso fetal segundo o tipo de parto estão demonstradas na tabela 1. Observando por estes aspectos, o grupo 1- partos normais e o grupo 2 – cesáreas foram muito semelhantes.

TABELA 1- Médias da idade materna, da idade gestacional e do peso fetal, segundo o tipo de parto.

<i>Dados Clínicos</i>	<i>Parto normais (n=20)</i>	<i>Cesáreas (n=11)</i>
Idade materna (anos)	$22 \pm 5$	$24 \pm 5$
Idade gestacional (semanas)	$39,57 \pm 0,99$	$39,27 \pm 0,65$
Peso fetal (gramas)	$3.280 \pm 319$	$3.280 \pm 275$

Considerando os resultados da contagem de células marcadas pelo anticorpo anti-CD68 nas vilosidades das 31 placentas, encontramos 1.184 células marcadas em 6.649 células contadas, significando que 17,80% das células do estroma das vilosidades são macrófagos. A contagem de células marcadas pelo anticorpo anti-CD43 nas 31 placentas somou 500 células dentre 10.080 células contadas, significando que 4,96% das células do estroma das

vilosidades são linfócitos T. Quanto a marcação de células pelo anticorpo anti-CD20, obtivemos apenas 59 células marcadas em 7.193 células contadas nas vilosidades das 31 placentas, tornando evidente que os linfócitos B são raros, presentes numa proporção de 0,82% das células das vilosidades (tabela 2).

Tabela 2 – Frequência de células marcadas e não marcadas nas vilosidades das 31 placentas, segundo o anticorpo monoclonal utilizado (anti-CD68, anti-CD43 e anti-CD20).

<i>Frequência de células</i>	<i>Marcadas</i>		<i>não marcadas</i>		<i>total</i>	
	<i>f</i>	<i>%</i>	<i>f</i>	<i>%</i>	<i>f</i>	<i>%</i>
CD68+	1.184	17,80	5.465	82,20	6.649	100
CD43+	500	4,96	9.580	95,04	10.080	100
CD20+	59	0,82	7.134	99,18	7.193	100

Analisando-se os resultados de proporções de células marcadas por placenta, evidenciamos que as placentas apresentaram uma variação na proporção de células CD68+ de 4,51% e 63,03%, implicando numa amplitude de variação de 58,51%. A média e a mediana das proporções de células CD68+ por placenta foram 21,72% e 16,56%, respectivamente (tabela 3). Consideramos que as placentas variaram muito quanto a porcentagem de macrófagos nas suas vilosidades. Quanto à marcação de células pelo anticorpo anti-CD43, as placentas variaram de 2,84% a 8,00%, implicando numa amplitude de variação de 5,16%. A média e a mediana das proporções de células CD43+ por placenta foram 5,01% e 4,66%, respectivamente (tabela 3). O resultado da marcação de células CD20+ por placenta revelou que 11 placentas (35,48% dos casos) não apresentaram células marcadas e que as placentas variaram de 0,00% a 2,86% de células marcadas. A média e a mediana dos percentuais por placenta de células CD20+ foram 0,82% e 0,68%, respectivamente (tabela 3).

Tabela 3 – Resultado em percentual das células marcadas pelos anticorpos monoclonais anti-CD68, anti-CD43 e anti-CD20 no estroma das vilosidades das placentas e estatísticas da amostra.

<i>Placentas</i> <i>N<sup>o</sup></i>	<i>Células CD68+ (%)</i>	<i>Células CD43+ (%)</i>	<i>Células CD20+ (%)</i>
1	15,46	4,66	0,25
2	61,65	4,34	0,00
3	37,28	5,17	2,38
4	15,84	5,43	0,53
5	16,00	4,57	0,00
6	27,89	7,22	1,11
7	11,53	4,90	0,00
8	5,77	4,12	0,64
9	15,41	6,49	1,46
10	20,46	4,89	0,00
11	9,61	4,23	1,43
12	15,75	6,30	2,56
13	28,22	4,85	0,74
14	52,58	7,83	0,00
15	9,74	8,00	2,22
16	25,00	2,92	0,60
17	45,94	6,02	1,50
18	16,26	7,71	2,86
19	13,80	4,22	1,44
20	22,45	5,28	0,00
21	63,03	6,04	0,69
22	14,00	4,23	0,00
23	12,66	4,48	0,87
24	21,14	5,90	0,58
25	4,51	2,84	0,00
26	7,98	3,70	1,11
27	49,92	4,19	1,06
28	13,22	4,10	0,00
29	5,84	4,00	0,00
30	7,45	3,13	0,89
31	6,97	3,53	0,00
Amplitude	58,51	5,16	2,86
Mediana	16,56	4,66	0,68
Média	21,72	5,01	0,82

Analisando-se os resultados das células marcadas pelo anticorpo anti-CD68, observamos que vinte e cinco placentas (80,64% dos casos) apresentaram percentuais de macrófagos entre 4% e 30% dentre as células das vilosidades (figuras 5). Observamos que três placentas (9,68%) apresentaram proporções de células CD68+ entre 30% e 50% e outras três placentas (9,68%) apresentaram proporções de células CD68+ acima de 50% do total de células das vilosidades (tabela 4).

O teste de Kolmogorov-Smirnov para analisar a normalidade da distribuição das placentas quanto a marcação de células CD68+ rejeitou a hipótese de normalidade com uma probabilidade de significância menor do que 0,05.

Tabela 4- Frequência de placentas segundo o percentual de células CD68+ no estroma das suas vilosidades.

<i>Intervalos de frequências percentuais de células CD68+ no estroma das vilosidades por placenta</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
0%  -----10%	8	25,81
10%  -----20%	11	35,48
20%  -----30%	6	19,35
30%  -----40%	1	3,23
40%  -----50%	2	6,45
50%  -----60%	1	3,23
60%  -----70%	2	6,45

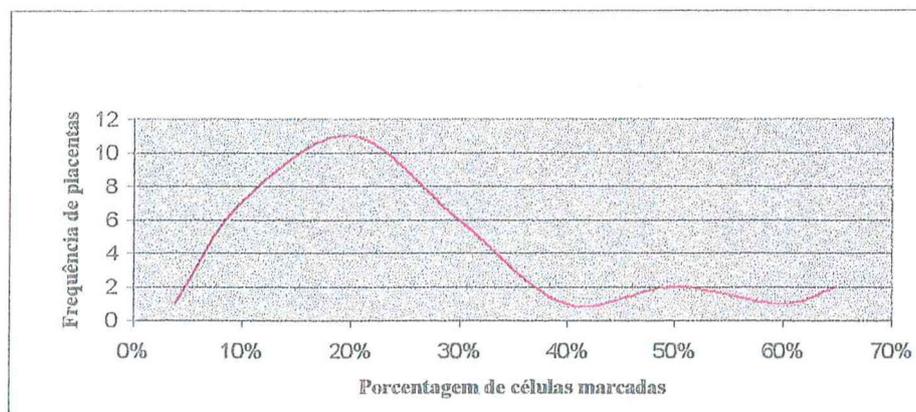


Figura 5 - Frequência das placentas segundo o percentual de células CD68+ no estroma das vilosidades em cada placenta.

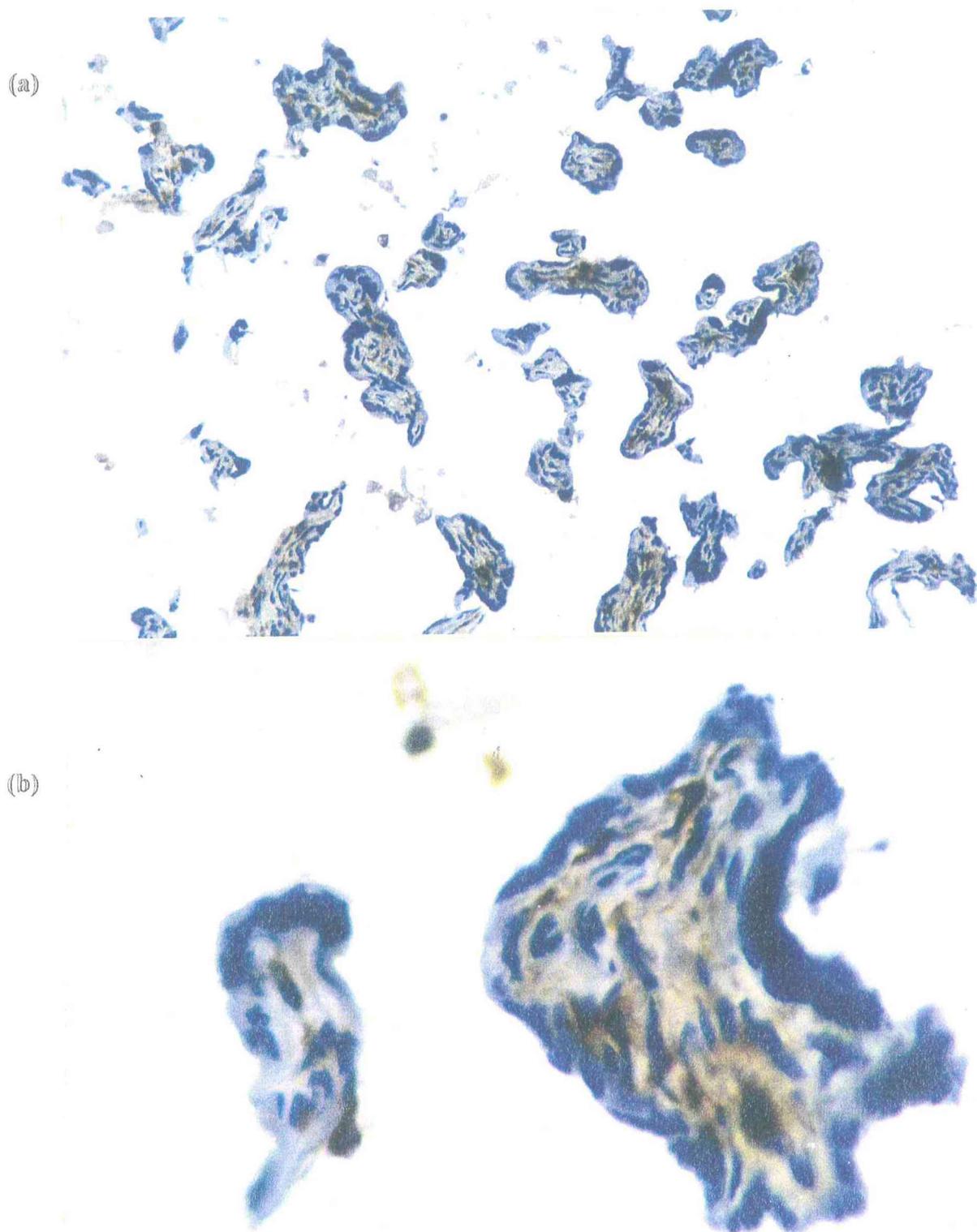


Figura 6 - Microfotografias de corte histológico de vilosidades placentárias com células marcadas pelo anticorpo anti-CD68 em aumento de 200x (a) e 400x (b). As células marcadas aparecem encobertas pelo cromógeno, diaminobenzidina, conferindo-lhes a coloração marrom.

Analisando-se os resultados das células marcadas pelo anticorpo anti-CD43, observamos uma forte concentração de placentas apresentando percentuais entre 4% e 5% de células CD43+ nas suas vilosidades. As demais placentas apresentaram percentuais de células CD43+ próximos a esta faixa de maior concentração (tabela 5). O teste de Kolmogorov-Smirnov para a normalidade da distribuição das placentas quanto a proporção de células CD43+ não rejeitou a hipótese de normalidade, apresentando um nível de significância menor do que 0,05. Portanto, a distribuição das placentas quanto a proporção de células CD43+ foi considerada normal (figura 7).

Tabela 5- Frequência de placentas segundo o percentual de células CD43+ no estroma das suas vilosidades.

<i>Intervalo de frequências percentuais de células CD43+ no estroma das vilosidades</i>	<i>Frequência de placentas</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
2% ----- 3%		2	6,45
3% ----- 4%		3	9,67
4% ----- 5%		14	45,18
5% ----- 6%		4	12,90
6% ----- 7%		4	12,90
7% ----- 8%		3	9,67
8% ----- 9%		1	3,23

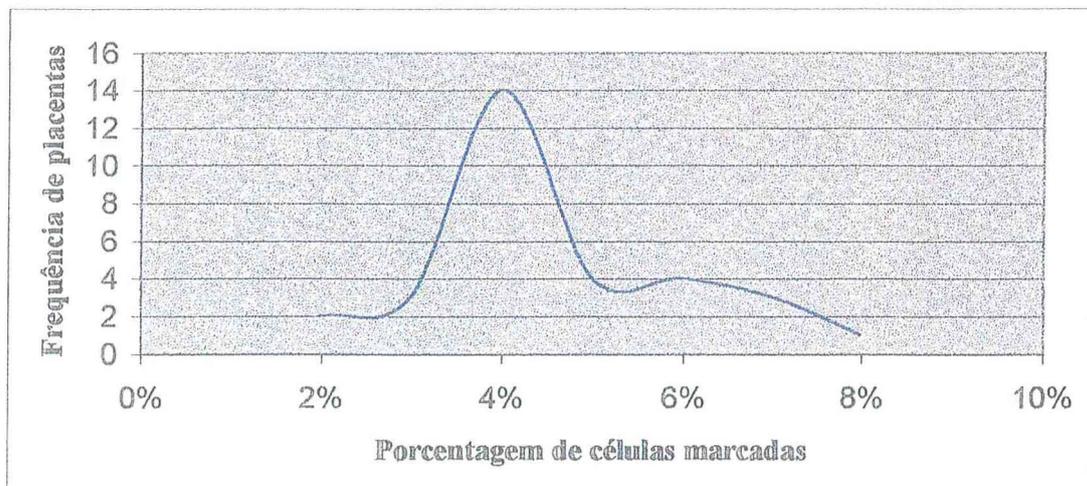


Figura 7 - Distribuição das frequências de placentas segundo o percentual de células CD43+ no estroma das suas vilosidades.

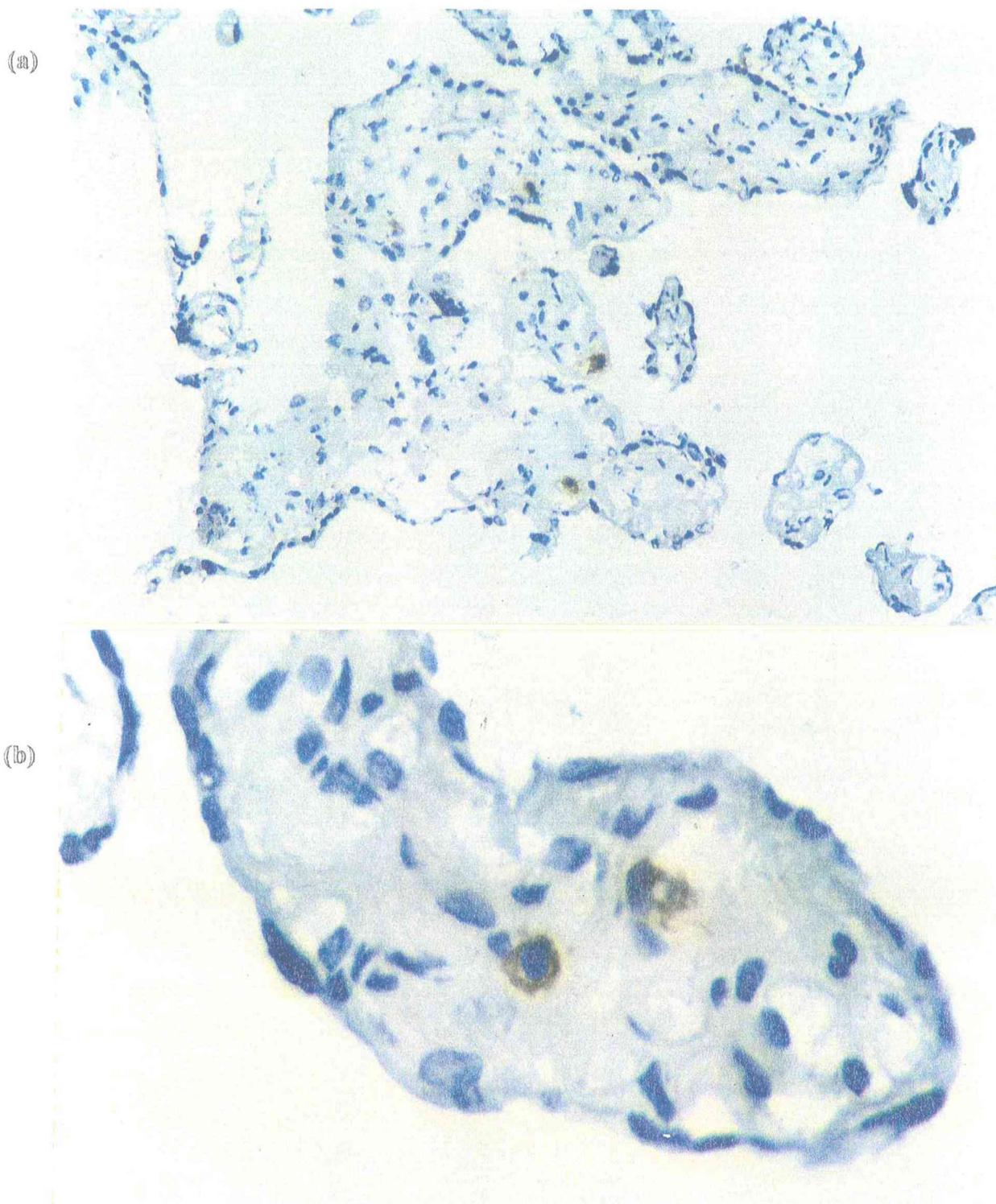


Figura 8- Microfotografia de corte histológico de vilosidades placentárias com células marcadas pelo anticorpo anti-CD43, em aumento de 200x (a) e 400x (b). As células marcadas aparecem encobertas pelo cromógeno, diaminobenzidina, conferindo-lhes a coloração marrom.

Analisando-se os resultados da marcação de células CD20+ nas placentas (figura 8), evidenciamos que vinte e seis placentas (83,87% dos casos) apresentaram percentuais entre 0,0% e 1,5%. Vale ressaltar que onze placentas (32,25% dos casos) não apresentaram células marcadas pelo anticorpo anti-CD20 (tabela 6). Evidenciamos que três placentas (9,67% dos casos) apresentaram percentuais de células CD20+ nas suas vilosidades entre 1,5% e 2,5% e apenas duas placentas apresentaram células CD20+ numa proporção acima de 2,5% (tabela 6). O teste de Kolmogorov-Smirnov rejeitou a hipótese de normalidade da distribuição das placentas quanto a marcação de células CD20+, com um nível de significância menor do que 0,05 (gráfico 3).

Tabela 6- Frequência de placentas segundo o percentual de células CD20+ no estroma de suas vilosidades.

<i>Intervalo de frequências percentuais de células CD20+ no estroma das vilosidades</i>	<i>Frequência de placentas</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
0,0% ----- 0,5%	11		35,48
0,5% ----- 1,0%	9		29,04
1,0% ----- 1,5%	6		19,35
1,5% ----- 2,0%	2		6,45
2,0% ----- 2,5%	1		3,23
2,5% ----- 3,0%	2		6,45

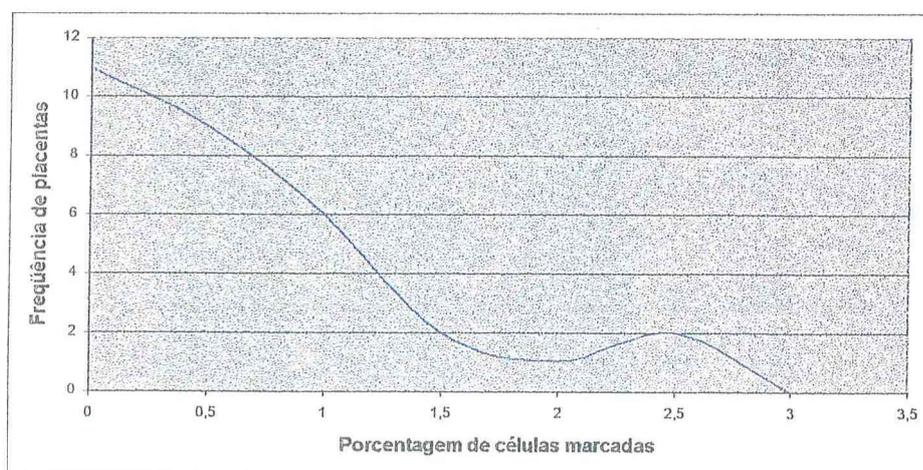


Figura 9- Distribuição das frequências de placentas segundo o percentual de células CD20+ no estroma das suas vilosidades.

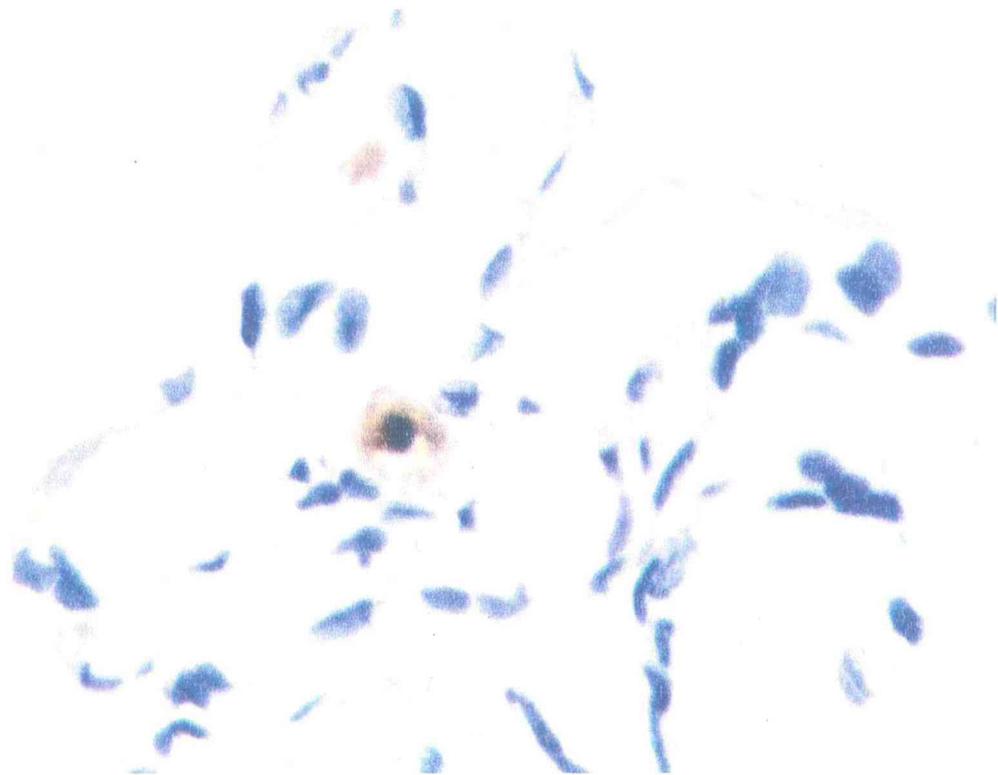


Figura 10 - Microfotografia de corte histológico de vilosidades placentárias com células marcadas pelo anticorpo anti-CD20 em aumento de 400x. As células marcadas aparecem encobertas pelo cromógeno, diaminobenzidina, conferindo-lhes a coloração marrom.

## 4.2 GRUPO I – PARTOS NORMAIS

Os resultados da marcação de células com o anticorpo monoclonal anti-CD68 nas vilosidades das placentas deste grupo mostraram que 772 células foram CD68-positivo dentre 4.345 células contadas. Este dado significa que os macrófagos, portanto, representaram 17,76% das células do estroma das vilosidades de placentas de partos normais (tabela 7).

Observamos que as placentas variaram, quanto ao percentual de células CD68+ nas suas vilosidades, entre 5,77% e 63,03%. A amplitude de variação foi de 57,26%. A média e a mediana das proporções de células CD68+ por placenta foram 22,34% e 15,73%, respectivamente (tabela 7).

Tabela 7- Frequência de células marcadas pelo anticorpo anti-CD68 nas vilosidades das placentas do grupo I e estatísticas da amostra.

<i>Placentas</i>	<i>Células marcadas</i>	<i>Células contadas.</i>	<i>% de células marcadas</i>
1	58	375	15,46
5	28	175	16,00
6	41	147	27,89
8	16	277	5,77
9	35	227	15,41
10	44	215	20,46
11	35	364	9,61
14	61	116	52,58
15	27	277	9,74
16	30	120	25,00
17	51	111	45,94
18	40	246	16,26
21	75	119	63,03
22	35	250	14,00
23	19	150	12,66
24	37	175	21,14
27	70	142	49,92
28	25	189	13,22
29	18	308	5,84
30	27	362	7,45
Soma	772	4345	
Amplitude			57,26
Mediana			15,73
Média			22,36

Os resultados da marcação de células com o anticorpo monoclonal anti-CD43 nas vilosidades das placentas deste grupo mostraram que 378 células foram CD43-positivo dentre 7.424 células contadas. Este dado significa que os linfócitos T, portanto, representaram 5,09% das células do estroma das vilosidades de placentas de partos normais (tabela 8).

Observamos que as placentas variaram, quanto ao percentual de células CD43+ nas suas vilosidades, entre 2,92% e 7,83%. A amplitude de variação foi de 4,91%. A média e a mediana das proporções de células CD43+ por placenta foram 5,24% e 4,62%, respectivamente (tabela 8).

Tabela 8- Frequência de células marcadas pelo anticorpo anti-CD43 nas vilosidades das placentas do grupo I e estatísticas da amostra.

<i>Placentas</i>	<i>Células marcadas</i>	<i>Células contadas.</i>	<i>% de células marcadas</i>
1	16	343	4,66
5	8	175	4,57
6	24	332	7,22
8	47	1140	4,12
9	18	277	6,49
10	9	184	4,89
11	50	1180	4,23
14	21	268	7,83
15	16	200	8,00
16	11	376	2,92
17	15	249	6,02
18	49	635	7,71
21	13	215	6,04
22	13	307	4,23
23	13	290	4,48
24	18	305	5,90
27	13	310	4,19
28	9	215	4,10
29	8	200	4,00
30	7	223	3,13
Soma	378	7.424	
Amplitude			4,91
Mediana			4,62
Média			5,24

Os resultados da marcação de células com o anticorpo monoclonal anti-CD20 nas vilosidades das placentas deste grupo mostraram que 42 células foram CD20-positivo dentre 4.983 células contadas. Este dado significa que os linfócitos B, portanto, representaram 0,84% das células do estroma das vilosidades de placentas de partos normais (tabela 9).

Observamos que as placentas variaram, quanto ao percentual de células CD20+ nas suas vilosidades, entre de 0,00% a 2,86 %,.. A média e a mediana das proporções de células CD20+ por placenta foram 0,68% e 0,84%, respectivamente (tabela 9).

Tabela 9- Frequência de células marcadas pelo anticorpo anti-CD20 nas vilosidades das placentas do grupo I e estatísticas da amostra.

<i>Placentas</i>	<i>Células marcadas</i>	<i>Total de células contadas.</i>	<i>% de células marcadas</i>
1	1	400	0,25
5	0	200	0,00
6	2	180	1,11
8	3	471	0,64
9	3	205	1,46
10	0	184	0,00
11	6	418	1,44
14	0	179	0,00
15	5	225	2,22
16	2	333	0,60
17	3	200	1,50
18	5	175	2,86
21	2	289	0,69
22	0	199	0,00
23	3	344	0,87
24	1	170	0,58
27	3	283	1,06
28	1	147	0,00
29	0	158	0,00
30	2	223	0,89
Soma	42	4.983	
Amplitude			2,86
Mediana			0,66
Média			0,80

### 4.3 GRUPO II –CESÁREAS ELETIVAS

Os resultados da marcação de células com o anticorpo monoclonal anti-CD68 nas vilosidades das placentas deste grupo mostraram que 412 células foram CD68-positivo dentre 2.304 células contadas. Este dado significa que os macrófagos, portanto, representaram 17,89% das células do estroma das vilosidades de placentas de partos cesarianos (tabela 10).

Observamos que as placentas variaram, quanto ao percentual de células CD68+ nas suas vilosidades, entre 4,51% e 61,65%, implicando numa amplitude de variação de 57,14%. A média e a mediana das proporções de células CD68+ por placenta foram 22,34% e 15,73%, respectivamente (tabela 10).

Tabela 10. Frequência de células marcadas pelo anticorpo anti-CD68 nas vilosidades das placentas do grupo II e estatísticas da amostra.

<i>Placentas</i>	<i>Células marcadas</i>	<i>Total de células contadas.</i>	<i>% de células marcadas</i>
2	82	133	61,65
3	44	118	37,28
4	32	202	15,84
7	24	208	11,53
12	23	146	15,75
13	35	124	28,22
19	53	384	13,8
20	75	334	22,45
25	8	177	4,51
26	21	263	7,98
31	15	215	6,97
Soma	412	2.304	
Amplitude			57,14
Mediana			15,75
Média			20,54

Os resultados da marcação de células com o anticorpo monoclonal anti-CD43 nas vilosidades das placentas deste grupo mostraram que 122 células foram CD43-positivo dentre 2.656 células contadas. Este dado significa que os linfócitos T, portanto, representaram 4,59% das células do estroma das vilosidades de placentas de partos cesarianos.

Observamos que as placentas variaram, quanto ao percentual de células CD43+ nas suas vilosidades, entre 2,84% a 6,30%, implicando numa amplitude de variação de 3,46%. A média e a mediana das proporções de células CD43+ por placenta foram 5,24% e 4,62%, respectivamente (tabela 11).

Tabela 11. Freqüência de células marcadas pelo anticorpo anti-CD43 nas vilosidades das placentas do grupo II e estatísticas da amostra.

<i>Placentas</i>	<i>Células marcadas</i>	<i>Total de células contadas.</i>	<i>% de células marcadas</i>
2	17	391	4,34
3	13	251	5,17
4	10	184	5,43
7	10	201	4,97
12	14	221	6,33
13	12	247	4,85
19	13	308	4,22
20	11	208	5,28
25	5	176	2,84
26	9	243	3,70
31	8	226	3,53
TOTAL	122	2656	
Soma	42	4.983	
Amplitude			2,86
Mediana			4,85
Média			4,61

Após a soma dos dados das 11 placentas deste grupo, encontramos apenas 17 células marcadas pelo anticorpo anti-CD20 em 2.210 células do estroma das vilosidades estudadas. Este achado mostra que os linfócitos B são encontrados em apenas 0,76% das células do estroma das vilosidades de placentas obtidas após cesáreas eletivas. Demonstramos os dados individuais das placentas obtidas de parto cesariano na tabela 12 e observamos que a amplitude de variação entre as placentas, quanto a porcentagem de células marcadas, foi de 0,00% a 2,56 %. A média e a mediana das proporções de células CD20+ por placenta foram 0,79% e 0,53%, respectivamente.

Tabela 12- Frequência de células marcadas pelo anticorpo anti-CD20 nas vilosidades das placentas do grupo II e estatísticas da amostra.

<i>Placentas</i>	<i>Células marcadas</i>	<i>Total de células contadas.</i>	<i>% de células marcadas</i>
2	0	236	0,00
3	4	168	2,38
4	1	188	0,53
7	0	174	0,00
12	5	195	2,56
13	2	268	0,74
19	3	207	1,44
20	0	180	0,00
25	0	191	0,00
26	2	180	1,11
31	0	223	0,00
Soma	17	2.210	
Amplitude			2,56
Mediana			0,53
Média			0,79

#### 4.4 ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS GRUPOS

O teste de Mann-Whitney foi realizado para estudar a igualdade de distribuição entre as placentas do grupo I e do grupo II, quanto a proporção de células marcadas pelos anticorpos anti-CD68, anti-CD43 e anti-CD20 nas suas vilosidades. Este teste é um teste não-paramétrico que analisa a igualdade ou não de distribuição entre dois grupos, avaliando-se as localizações dos “postos” de cada grupo. A igualdade entre as distribuições das placentas do grupo I e do grupo II foi considerada a hipótese nula do teste, a qual não foi rejeitada porque as probabilidades de significância encontradas foram bem acima do nível de significância 0,05 (tabela 13).

Tabela 13- Resultados do teste de Mann-Whitney comparando as placentas do grupo I e do grupo II quanto a distribuição das células marcadas pelos anticorpos monoclonais anti-CD68, anti-CD43 e anti-CD20.

<i>Anticorpo monoclonal</i>	<i>Probabilidade de significância (p)</i>	<i>Resultado do teste de Mann-Whitney nas placentas do grupo I e do grupo II</i>
Anti-CD20	0,611	A diferença entre as distribuições não foi estatisticamente significativa
Anti-CD43	0,476	A diferença entre as distribuições não foi estatisticamente significativa
Anti-CD68	0,761	A diferença entre as distribuições não foi estatisticamente significativa

As variabilidades foram calculadas pela distância entre os mínimos e os máximos valores obtidos. A variabilidade entre os dois grupos de placentas foi semelhante, quanto a proporção de células marcadas pelos anticorpos anti-CD68 e anti-CD20. Em relação a proporção de células CD43-positivo, a variabilidade foi maior no grupo I, pois os dados variaram de 2,93% a 8,00%, enquanto que no grupo II variou apenas de 2,84% a 6,33%. Assim como as médias das proporções de células marcadas foram também discretamente maiores nas placentas do grupo I- partos normais (tabela 14), porém estas diferenças não foram estatisticamente significantes.

Tabela 14 – Distribuição dos dados estatísticos referentes a marcação de células pelos anticorpos anti-CD43, anti-CD20 e anti-CD68 nas vilosidades de placentas do grupo I- parto normal e do grupo II- cesáreas.

Dados estatísticos das proporções de células marcadas.	CD68+		CD43+		CD20+	
	GrupoI	GrupoII	GrupoI	GrupoII	GrupoI	GrupoII
Média (%)	22,36	20,54	5,24	4,61	0,80	0,79
Mediana (%)	15,73	15,75	4,62	4,86	0,66	0,53
Desvio-padrão (%)	18,14	16,74	1,56	1,00	0,77	0,89
Mínimo (%)	5,78	4,52	2,93	2,84	0,00	0,00
Máximo (%)	63,02	61,65	8,00	6,33	2,86	2,56
Faixa de maior Concentração (%)	5,00 a 27,00	4,00 a 28,00	4,00 a 4,80	4,20 a 4,90	0,00 a 1,40	0,00 a 0,70

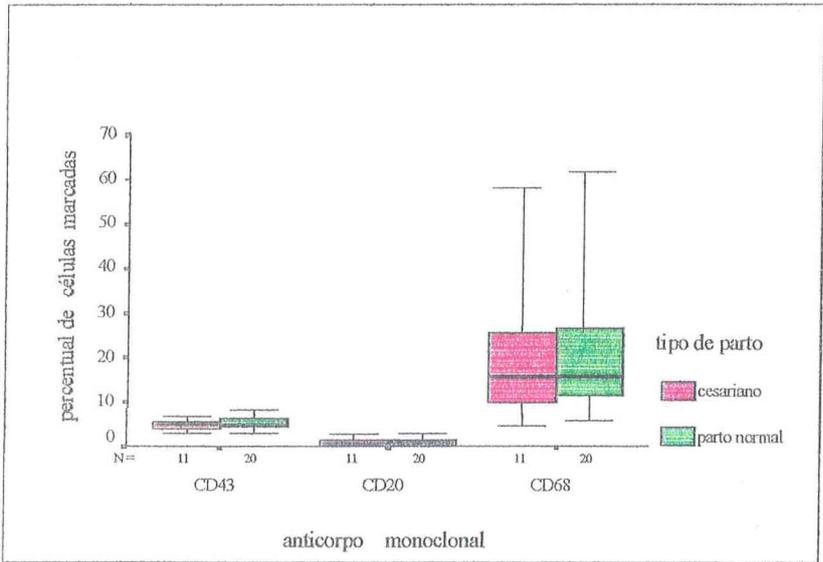


Figura 11 – Comparação entre as estatísticas do grupo I e do grupo II, onde a mediana está representada por uma faixa preta, a área de maior concentração por uma caixa colorida e a amplitude das proporções por um tracejado.

## 5.0 DISCUSSÃO

O número de placentas estudadas em trabalhos imunohistoquímicos é muito variável. Goldstein e cols. (1988) estudaram 20 placentas para pesquisa de macrófagos das vilosidades placentárias; Nakamura e Ohta (1990) estudaram 15 placentas, sendo cinco de cada trimestre de gravidez, para observar a distribuição numérica de células como macrófagos e linfócitos no decorrer da gravidez e outros autores como Mues e cols. (1989), Dietl e cols. (1992) e Wetzka e cols. (1997) analisaram 36, 12 e 7 placentas, respectivamente, em estudos imunohistoquímicos. Baseando-se nestas referências bibliográficas, a quantidade de 31 placentas como a amostra do nosso trabalho foi considerada uma amostra satisfatória para uma análise imunohistoquímica de algumas células.

Padronizamos para o nosso estudo a análise de 25 vilosidades em média por lâmina de cada placenta. Observamos, pelo menos, uma lâmina para cada um dos três anticorpos monoclonais utilizados e contamos cerca de 250 células por lâmina de cada placenta. Consideramos uma quantidade representativa das células das vilosidades pois Wood (1980) analisou 200 células para cada caso e Redline e Patterson (1993) analisaram 100 células em cada placenta do seu estudo.

Com este trabalho, iniciamos uma linha de pesquisa em nosso departamento. Vale ressaltar que não encontramos trabalhos nacionais que tenham realizado um estudo sobre células do sistema imunológico nas placentas humanas. E não encontramos qualquer estudo na literatura mundial que comparasse placentas de parto normal e de parto cesariano eletivo quanto à distribuição de células do sistema inflamatório/imunológico nas suas vilosidades.

A padronização da técnica de imunohistoquímica foi inicialmente muito difícil. Utilizamos primeiramente o APAAP (técnica da fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina), porém surgiu uma intensa marcação inespecífica nas margens de todas as vilosidades porque a partir do segundo trimestre de gravidez os trofoblastos produzem a fosfatase alcalina. Resolvemos trocar de técnica porque não conseguimos bloquear a fosfatase alcalina endógena com o levamisole e não adquirimos um outro bloqueador mais potente, a fenilalanilglicilglicina, testada com êxito em tecidos placentários por Bulmer e cols., em 1988. Passamos a utilizar a imunoperoxidase e tivemos muitas dificuldades para obtermos os primeiros bons resultados devido a grande quantidade de sangue que é próprio do tecido

placentário. Utilizamos o peróxido de hidrogênio em crescentes concentrações até conseguirmos um bloqueio satisfatório da peroxidase endógena.

Coletamos 110 amostras placentárias, cada uma de pacientes diferentes, porém apenas 31 casos foram aproveitados para este estudo. A maioria dos fragmentos placentários foram desprezados devido a erro da coleta, pois os fragmentos continham muito sangue e fibrina. Outras amostras foram desprezadas devido a demora na conservação durante o período em que estávamos padronizando a técnica. E também havia casos de fragmentos que continham vilosidades hidrópicas ou grande infiltrado leucocitário. O grupo II, formado por placentas obtidas de cesáreas eletivas, ficou constituído por apenas 11 placentas porque são raros os casos de cesáreas eletivas em pacientes sadias nos serviços de obstetria de urgência da Maternidade Escola Assis Chateaubriand, serviço de referência regional.

Não há um consenso entre os pesquisadores quanto a proporção de macrófagos dentre as células do estroma das vilosidades coriônicas. Entre 1980 e 1990, os pesquisadores identificaram os macrófagos em tecidos placentários e em suspensão de células placentárias, pela morfologia, pela presença de receptores Fc, C3 e HLA-DR, pela demonstração da atividade da esterase inespecífica e pela capacidade de realizar fagocitose. Através destes métodos de estudo, Wood (1980), Loke e cols. (1992), Wilson e cols. (1983), Goldstein e cols. (1988) e Yagel e cols. (1990) encontraram macrófagos em cerca de 70%, 29%, 35% , 40% e 15% das células das vilosidades placentárias, respectivamente.

Yagel e cols. (1990) afirmaram que os trofoblastos compartilham características utilizadas para identificar os macrófagos, quais sejam, possuem atividade de esterase inespecífica, realizam fagocitose e expressam os receptores Fc e CD14. Yagel e cols. (1990) sugeriram que em alguns trabalhos as células trofoblásticas foram confundidas com macrófagos e, por isso, a proporção de macrófagos nas placentas atingiu cifras que variaram entre 40% e 70% das células placentárias (Wood, 1980; Bulmer e Johnson, 1984; Wilson e cols, 1983). Para evitar marcação inespecífica na identificação dos macrófagos, escolhemos o anticorpo anti-CD68 ao invés do anti-CD14. O anticorpo anti-CD68 tem boa especificidade para macrófagos e tem sido muito utilizado em tecidos placentários (Greco e cols., 1992; Dietl e cols., 1992; Wetzka e cols., 1997). Em nosso estudo, a proporção de 17% de macrófagos dentre as células das vilosidades está de acordo com os resultados publicados por

Yagel e cols.(1990) e por Greco e cols. (1992), que encontraram macrófagos na proporção de 15% e de 5% a 25% entre as células do estroma das vilosidades, respectivamente.

Raramente, observamos macrófagos às margens do estroma das vilosidades e não observamos uma predominância de macrófagos ao redor dos vasos fetais, fatos mencionados por Mues e cols. (1989). Observamos que, realmente, os macrófagos apresentam uma morfologia muito variada (Goldstein e cols. 1988), o que impossibilita identificá-los pela morfologia.

Os linfócitos T, caracterizados em nosso trabalho como células marcadas pelo anticorpo anti-CD43, foram encontradas dentro das vilosidades placentárias na proporção média de  $5,01 \pm 1,40\%$  das células. Os nossos percentuais de linfócitos T por placenta foram muito homogêneos. A proporção de linfócitos T obtida em nosso trabalho aproxima-se dos valores percentuais obtidos por outros pesquisadores: 1 a 3% (Lessin e cols., 1988), 2 a 5% (Nakamura e Ohta, 1990), 0,4 a 3,2% (Redline e Paterson, 1993). Em nosso estudo, não observamos que os linfócitos T localizam-se preferencialmente nas proximidades dos vasos fetais, como afirmou Nakamura e Ohta (1990).

Nossos resultados referentes aos linfócitos B nas vilosidades placentárias documentaram uma quase ausência de células marcadas pelo anticorpo monoclonal anti-CD20. Nossos achados coincidem com os de outros autores que não encontraram linfócitos B ou que os encontraram em proporção menor do que 2% das células do estroma das vilosidades, ao utilizarem os anticorpos anti-CD19 (Labarrere, McIntyre & Faulk, 1990; Labarrere & Faulk, 1991), anti-CD20 e anti-CD22 (Lessin e cols. 1988; Nakamura e Ohta 1990, Greco e cols. 1992, Bondarenko e cols. 1997, Jacques e Qureshi, 1998).

Sabendo que os macrófagos e os linfócitos T estão envolvidos na resposta imunológica celular, seria de se esperar que qualquer estímulo que promovesse a proliferação e a ativação de macrófagos, também promovesse a proliferação e ativação de linfócitos T. Porém em nosso estudo não encontramos uma inter-relação uniforme entre a porcentagem de macrófagos e a proporção de linfócitos T em cada placenta. As placentas com grande proporção de macrófagos não necessariamente continham grande proporção de linfócitos T e vice-e-versa.

Quanto à proporção de macrófagos, as 31 placentas se distribuíram de maneira heterogênea formando grupos de placentas estatisticamente diferentes segundo ficou

demonstrado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Não conseguimos identificar uma possível causa para explicar esta diferença, porém acreditamos existir uma variável responsável por este fenômeno e que por nós não foi controlada. Entretanto, quanto a proporção de linfócitos nas vilosidades, as placentas não se mostraram heterogêneas. Que variável clínica, então, modificaria a proporção de macrófagos nas vilosidades coriônicas e não modificaria a proporção de linfócitos?

Além de se estudar a celularidade, os pesquisadores têm investigado a relação das células com várias entidades clínicas. Por exemplo, Lachapelle e cols. (1996) observaram que, nos casos de abortamento de repetição, há um aumento da quantidade de linfócitos granulares anti-CD16+, de linfócitos B anti-CD20+ e um aumento na proporção de linfócitos T anti-CD4+ em relação aos anti-CD8+. Estes autores afirmaram que no endométrio de mulheres férteis e na decídua de gravidez inicial normal predominam os grandes linfócitos granulares anti-CD56+ e anti-CD16-, pois os grandes linfócitos granulares anti-CD16+ são citotóxicos para o trofoblasto.

As células do sistema imunológico também foram estudadas em casos de vilites – inflamação das vilosidades placentárias. As vilites são áreas de necrose fibrinóide associadas a um infiltrado de células mononucleares no estroma das vilosidades coriônicas que podem ocorrer em resposta a uma infecção (sífilis, citomegalovirose e outras) ou podem ser de origem desconhecida (Greco e cols., 1992; Redline & Patterson, 1993). Cerca de 1,7% das vilosidades coriônicas de placentas normais contém evidências de vilite. Quando as vilites inespecíficas atingem mais de 50% das vilosidades coriônicas, estas lesões estão associadas ao Retardo de Crescimento fetal Intra-Útero (RCIU), a pré-eclâmpsia e a perdas gravídicas repetidas (Labarrere, McIntyre & Faulk, 1990). Nos casos de vilites, os macrófagos que são células freqüentes nas vilosidades, aumentam em quantidade. Os linfócitos T, que normalmente são escassos, também tornam-se mais presentes, mais às custas dos linfócitos T auxiliares (anti-CD4+). E, os linfócitos B (anti-CD19+) não foram encontrados (Labarrere, McIntyre & Faulk, 1990; Greco e cols., 1992).

Em nosso trabalho, as placentas do grupo I (partos normais) e do grupo II (cesáreas eletivas) foram semelhantes segundo a proporção de macrófagos, linfócitos T e linfócitos B nas vilosidades placentárias. Bulmer e cols. (1988) também não haviam encontrado diferenças entre 6 placentas obtidas de parto normal e 4 placentas obtidas de cesáreas, quanto a

proporção de leucócitos (anti-CD45+), macrófagos (anti-CD14+), linfócitos T (anti-CD3+), linfócitos T auxiliares (anti-CD4+), linfócitos T citotóxicos/supressores (anti-CD8+) e linfócitos B (anti-CD20+) na decídua. Outros autores, entretanto, descreveram que nas placentas obtidas após parto normal, ocorre uma maior infiltração leucocitária decidual e um aumento na concentração intra-amniótica de interleucinas inflamatórias tipo interleucina-1, interleucina-6 e fator de necrose tumoral (Romero e cols, 1989; Romero e cols, 1990; Gravett e cols, 1994). Maradny e cols. (1996) estudaram 15 placentas obtidas após partos normais e 15 placentas obtidas após cesáreas eletivas, através de imunohistoquímica, e observaram que os receptores da IL-8 estão significativamente mais presentes nas membranas fetais, na decídua e no estroma das vilosidades coriônicas das placentas obtidas após parto normal. A interleucina-8 é uma citocina inflamatória, produzida principalmente por macrófagos (Kliman & Meaddough, 1995).

Observamos que duas das vinte placentas do grupo I e uma das onze placentas do grupo II apresentaram mais de 50% de macrófagos dentre as células das vilosidades placentárias. Logo, em ambos os grupos, 10% das placentas apresentaram alta proporção de macrófagos.

Mesmo que fosse excluída dentre as onze placentas do grupo II, a placenta que apresentou grande proporção de macrófagos, não seriam encontradas diferenças estatisticamente significantes segundo o teste de Mann-Whitney. Pois, realmente, as placentas de ambos os grupos apresentaram semelhante diversidade de proporções de macrófagos e semelhante homogeneidade nas proporções de linfócitos nas suas vilosidades coriônicas.

Acreditamos que, durante o trabalho de parto, existam alterações locais na função celular dos macrófagos e dos linfócitos T, porém os nossos resultados mostram que a proporção e a distribuição destas células não se modificam. Possivelmente, os macrófagos e os linfócitos T tornam-se mais ativados e estimulem também os trofoblastos e as células endoteliais a produzirem uma maior quantidade de interleucinas inflamatórias e prostaglandinas.

Propomos que a partir deste nosso trabalho, seja aproveitada a padronização da técnica em nosso departamento e seja ampliado o número de casos para tentarmos identificar o motivo da heterogeneidade entre as placentas quanto a proporção de macrófagos nas vilosidades placentárias. Sugerimos que seja realizado um estudo semelhante com placentas

de gravidezes complicadas com pré-eclâmpsia a fim de analisarmos se o fator imunológico é um componente etiológico identificável através da modificação na celularidade. E sugerimos também elaborar um trabalho que associe a infecção e o desencadeamento do trabalho de parto prematuro, analisando o índice de líquido amniótico e a distribuição e proporção de células envolvidas na resposta imunológica celular na decídua e nas vilosidades coriônicas.

## 6.0 CONCLUSÕES

- Nosso estudo detectou que os macrófagos, linfócitos T e linfócitos B representaram 17,80%, 4,96 % e 0,82% das células das vilosidades placentárias de gestações a termo, respectivamente.
- As placentas apresentaram-se bastante heterogêneas quanto a proporção de macrófagos em suas vilosidades. Por outro lado, os percentuais de linfócitos T apresentaram valores muito aproximados em todas as placentas. E, quanto a marcação para linfócitos B, houve uma tendência a ausência destas células no estroma das vilosidades placentárias.
- Não observamos uma predominância dos macrófagos ao redor dos vasos fetais mencionada por Mues e cols. (1989), nem sequer predominância em outras regiões das vilosidades.
- Observamos também que a quantidade de macrófagos, linfócitos T e linfócitos B nas vilosidades placentárias é semelhante nas placentas obtidas após parto normal e naquelas obtidas após cesáreas eletivas.

- villits of unknown etiology: complement components and  $\gamma$  immunoglobulins in chorionic villi. *Journal of Perinatal Medicine*. 1992, 129-134.
- ARCK, P; DIETL, J. CLARK, D. From the decidual cell internet: trophoblast-recognizing T cells. *Biol Reprod*, 1999, 227-233.
- ASAHINA, T; KOBAYASHI, T, Y, OKADA; ITOH, M; YAMASHITA, M; INAMATO, Y; TERAQ, T. Studies of the role of adhesive proteins in maintain pregnancy, *Horm Res*, 1998, 37-45.
- BARINI, R. ; EGGLE, R. S. T.; LEIBER, S. R.; BATISTA, S. C.; SILVA, J. L. P.: Abortamento recorrente de causa imunológica: Avaliação de um protocolo de investigação e tratamento. *Revista Bras. Gin & Obstet.*, 1998, 20 (2): 83-89.
- BUSTER, J. & CARSON, S. A.; *Endocrinology and Diagnosis of pregnancy*. In: Gabbe, S.G.; NZEBYL, J.R. ; SIPSON, J.L *Obstetrics normal e Problem pregnancies*, third edition, Churchill Livingstone, USA, 1996, 31-64.
- BENNET, W.A.; LAGOO-DEENADAYALAN, S.; STOPLE, J.Á.; BARBER, W.H.; HALE, E.; BRACKIN, M.N.; COWAN, B.D.: Cytokine expression by first-trimester human chorionic villi. *Am J Reprod Immunol*, 1998, 309-318.
- BELFORT, P. & NAHOUM, J.C.: *Patologia do sistema amniótico* In: REZENDE, J.: *Obstetrícia*. Ed. Guanabara Koogan, 6ª edição, Rio de Janeiro, 1991, 627-639.
- BERNSTEIN, I & GABBE, S.G.: *Intrauterine Growth restriction in: Gabbe, S.G.; Niebl, J.R. e Simson, J.L. : Obstetrics normal and problem pregnancies 3ª edição, New York 1996*

Ginecologia, 1997, 249-256.

- BRANDOM, J. M.. Macrophage distribution in decidual tissue from early implantation to the periparturient period in mice as defined macrophage differentiation antigens F4/80, macrosialin and the type 3 complement. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1995, 9-16.
- BRIGHT, N. A. & OCKLEFORD, C.D. Citotrophoblast cells: A barrier to maternofetal transmission of passive immunity? *Journal of Histochemistry and Histochemistry*, 1995, 933-944.
- BULMER, J.N & JOHNSON, P.M. Macrophage populations in the human placenta and amniocorion. *Clinical and Experimental Immunology*, 1984, 393-403.
- BULMER, J.N. & SUNDERLAND, C.A. Immunohistological characterization of lymphoid cell populations in the early human placental bed. *Immunology*, 1984, 349-57.
- BULMER, J.N., MORRINSON, L., SMITH, J.C.: Expression of class II MHC gene products by macrophage in human uteroplacental tissue. *Immunology*, 1988(b), 707-714.
- BULMER, J.N., MORRINSON, L., SMITH, J.C.; WELLS, M.: Maternal and fetal cellular relationships in the human placental basal plate. *Placenta* 1988(a), (9), 237-246.
- BULMER, J.N. *Immunology of the uterine decidual response*: COULAM, C.B.; FAULK, W.P. E MCINTYRE, J.A.: *Immunological Obstetrics*, W. W Norton & Company. New York, 1992, 245-255.

- M. ; KAISERLING, E. ; GRIESSER, H. ; KABELITZ, D.. The decidual of early human pregnancy: Immunohistochemistry and function of immunocompetent cells. *Gynecol Obstet Invest*, 1992, 197-204.
- EMMRICH, P; FREDRICH, T; DALITZ, H.: Genesis and importance so-called inflammatory infiltration of the placenta. *Immunohistochemical findings. Anat.Anz.*, 1998, 203-209.
- ENDERS, A. C; KING, B.F; The citology of Hofbauer cells. *Anote Record*, 1970, 231-252.
- FAY, T. N. & GRUDZINSKAS, J. G.: Human endometrial peptides: a review of their potential role implantation and placentation, 1991.1311-1326.
- FOX, H; The incidence and significance of Hofbauer cells in the nature human placenta. *The Journal of the pathology and Bacteriology*, 1967, 710-717.
- FRIEDMAN, E.A : The funcional divisions of labor. *Am J Obstet Gynecol* 109:274, 1971.
- GEISELHART, A; DIETL, J; MARZUSCH, K; RUCK, P; RUCK, M; HORNY, HP; KAISERLING, H; HANDGRETING, R.: Comparative analysis of the immunophenotypes of decidual and peripheral blood large granular lymphocytes and T cells during early human pregnancy, *Am J. Reprod Immunology*, 1995, 315-322.
- GERMAIN, A. M.: Mecanismo del parto. *Revista Chil Obstet Ginecol*, 1995, 376-383.
- GOLDHARDT, R. ; ECKERT, G.M.; REMIÃO, J.O: Anticorpos. In SCROFERNEKER, M. L. e POHLMANN, P.R.: *Imunologia Básica e Aplicada*. Ed. Sagra Luzatto. 1ª Edição, Porto Alegre/RS-Brasil, 1998 63-80.

- HOFBAUER, J.: Ueber das Konstant vorkommen bisher unbekannter zellinger formelement in der chorionzotte der menschlichen plazenta und uber embriothophe. Wien. Klin.Wschr, 1903, 871-873.
- HILL, J. A., MELLING, G. C., JOHNSON, P. M. Immunohistochemical studies of human uteroplacental tissues from first-trimester spontaneous abortion. J. Obstet. Gynecol, 1995, 90-96.
- HUNT, J. S. & POLARD, J.W. Macrophages in the uterus and placenta. Macrophage Biology and Activation 1992, 40-63.
- HUNT, J. S. & ROBERTSON, S. A.: Uterine macrophages and environmental programming for pregnancy success. Journal of Reproductive Immunology, 1996, 1-24.
- HUNT, J. S.. Current topic: the role of macrophages in the uterine response the pregnancy. Placenta, 1990, 467-475.
- HUNT, J. S.; VASSNER, D. ; FERGUSON; MILLER, L.: Fas- ligand is positioned in mouse in uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and concepts. The Journal of Immunology, 1997, 4123-4128
- JERNE, N.K.: The natural selection theory of antibody formation. Proc Natl. Acad Sci, USA, 1955, 41-849.
- JONES, M., MACPEOD, A. M.; DILLON, D. M.; CATTO, G.R.: The maternal immune response, In: COULAM, C.B.; FAULK, W.P. E MCINTYRE, J.A.: Immunological

Immunology, 1996, 41-52.

KLIMAN, H. J. & MEADDOUGH, E. L.: placental interleucin-8 is predominantly made by villous macrophages, not trophoblasts. 42<sup>nd</sup> Annual meeting of Society for Gynecologic Investigation, 1995.

KOHLER, G & MILSTEIN, C: Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975, 256-495.

KRUSE, S.; KUEHR, J.; FORSTER, J.; DEICHAMANN, K.A.: Two common polymorphisms in the coding part of the CD43 gene are not associated with atopy. Int. Arch Allergy Immunol. 1998, 244-247.

LABARRERE, C. A. & FAULK, W. P. Immunopathology of human extraembryonic tissues, In: Immunological Obstetrics, W. W Norton & Company. New York, 1992, 440-463.

LABARRERE, C. A. maternal trophoblastic immunological balance. American Journal of Reproductive Immunology. 1989, 26-25.

LABARRERE, C. A. & FAULK, W. P., Anchoring villi human placental basal plate: Lymphocytes, macrophages and coagulation. Placenta, 1991, 173-182.

LABARRERE, Carlos A, , MCINTYRE, John A, and FAULK, W. Page,; Immunohistologic evidence that vilitis in human normal term placenta is an immunologic lesion. Basic Science Section 1990, 515-522.

LACHAPELLE, M.; MIRON, P.; HEMMINGS, R.; ROY, D. C.: Endometrial T,B and NK

- maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol Microbio*, 1988, 1-7.
- LEWIS, J. E.; COULAM, C.B.; MOORE, S.B.; Immunologic mechanism in the maternal-fetal relationship. *Mayo Clin. Proc.*, 1986, (61), 655-665.
- LIN, H.; MOSMAN, T. R.; GUILBERT, L.; TUNTIPOPITAT, S.; WEGMANN, T. G.: Synthesis of helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J. Immunol.*, 1993, 4562-4573.
- LOKE, Y. W.; EREMIN, O.; ASHBY, J.; DAY S.: Characterization of the phagocytic cells isolated from the human placenta. *Journal of the Reticuloendotelial Society*, 1982, 317-324.
- MABIE, W.C: Critical care Obstetrics. In: Gabbe, S.G.; NZEBYL, J.R. ; SIPSON, J.L. Obstetrics normal e Problem pregnancies, third edition, Churchill Livingstone, USA, 1996, 533-560.
- MAESTÁ, I; RUDGE, M.V.C.; CALDERON, I.M.P.; BORGES, V.T.M.: Uso do Partograma na Assistência clínica ao Parto. *Femina*. (3) 27: 257-261, 1999.
- MARADDNY, E. E.; KANAYAMA, N.; MAEHARA, K.; KOBAYASHI, T.; TERAQ, T.: Expression of interleukin-8 receptors in the gestational tissues before and after initiation of labor: Immunohistochemical study. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 1996, 790-796.
- MEDAWAR, P. B.: Some immunological and endocrinological problems raised by the Evolution of viviparity in vertebrates. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1953; 7: 320.

- S., HAMMANSTRON, M. & BARANOV, V.: Evidence for local Proliferation, phenotypic heterogeneity, and extrathymic differentiation. *Journal of Immunology*, 1997, 3267-3277.
- MILLER, L. & HUNT, J. S.: Regulation of TNF-alfa production in activated mouse macrophages by progesterone. *Journal of Immunology*, 1998, 5099-5104.
- MONIER, J.C; VINATIER, D. Interface feto-maternelle: description des éléments dans une perspective immunologique. *Journal Gynécologie Obstétrique*. 1990, 691-700.
- MOORE, K. L.; PERSUAD, T.V.N.: A placenta e as membranas fetais, *Embriologia Clínica*, 1994, 110-117.
- MUNN, D.H.; ZHOU, M.; ATTWOOD, J.T.; BONDAREV, I.; CONWAY, S.J.; MARSHALL, B. BROWN, C.; MELLOR, A.L.: Prevention of allogeneic fetal rejection tryptophan catabolism. *Science*, 21; 281 (5380):1191-1193, 1998.
- MOSKALEWSKI, S.; PTAK, W.; STRYZEWSKA, J.: Macrophage in mouse in placenta: morphologic and functional identification. *Journal of Reticuloendothelial Society*, 1974, 9-14.
- MUES, B.; LANGER, D.; ZWADLO & SORG, C.: Phenotypic characterization of macrophages in human term placenta. *Immunology*, 1989, 303-307.
- NAHOUM, J.C. & BARCELLOS, J.M. – Placenta. Cordão Umbilical. Sistema amniótico. In: Rezende, J. – *Obstetrícia*, Guanabara-Koogan, 6ª edição, 1991, 20-46.

- OLIVEIRA, J. A.; LEVY, R. A.; AVVAD, E.; PORTO, L. C.: Histologia placentária nas gestações de alto risco: lúpus eritematoso sistêmico e pré-eclâmpsia, *Journal Brasileiro de Ginecologia*, 1996, 323-334
- PULFORD, K.A.; RIGNEY, E.M.; MICKLEM, K.J.; JONES, M. STROSS, W. P.; GATTER, K. C.; MASON, D.Y.: kp1 - a new monoclonal antibody that detects a monocyte/macrophage associated antigen in routinely processed tissue sections. *J. Clin. Pathol.* 1989, 42:414.
- OLIVEIRA, L.H. Electron microscopy of hofbauer cells after embedding with placental erythrocytes. *Revis. Bras. Biology.* 1987, 213-215.
- RAMPRASAD, M.D.; FISCHER, W.; WITZTUM, J.L.; SAMBRANO, G.R.; QUEHENBERGER, O; STEINBERG, D.: the 94 to 97 k Da mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1995, 92: 9580.
- POLLARD, J.K.; MITCHEL, M.D.: Intrauterine Infection and the effects in inflammatory mediators on prostaglandin production by myometrial cells from pregnant women. *Am J. Obstet. Gynecol.* 1996, 682-686.
- RASHEED, F.N.: isolation of placentas for use in vitro functional assays. *Journal of Immunological methods.* 1992, 185-193.
- REDLINE R W & PATTERSON P · Villitis of unknown etiology is associated with major

- ROMERO, R.; AVILA, C.; SANTHANAM U.; SEHGAL, P.B.: Amniotic fluid Interleukin 6 in preterm labor. *Clinical Investigation*, 1990, 1392-1400.
- SALA, M. A. & MATHEUS, M. Exame de placenta. In : PIATO, S. & TEDESCO, J.A.A.: diagnóstico e terapêutica das patologias obstétricas. Ed. Atheneu, Rio de Janeiro/RJ, 1984, 105-114.
- SHARKEY, A.M.; CHARNOCK-JONES, D.S.; BOOCOCK, C.A.; BROW, K.D.; SMITH, S. K.. Expression of messenger RNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1993 (99) 609-615.
- SÁNCHEZ, A. G.; MORENO, J. G. MORENO; ARELLANO, C. A; VILLAGRANA, F. V.: Immunopatología del aborto temprano: lo actual. *Ginecología e Obstetricia de México*. 1997, 262-265.
- SHIRAIISHI, H; HYAKAWA, S; SATOH, K.: Murine experimental abortion by IL-2 administration is caused by activation of cytotoxic T lymphocytes and placental apoptosis, 1996, 93-108.
- SPELLACY W.N.& MILLER, S.: Macrosomia – maternal characteristics and infant complications. *Obstet. Gynecol* 66:185, 1985.
- STARKEY, P. M ; SARGENT I.L; RANDMEN; C.W.G. Cellpopulations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometric . *Immunology*, 1988, 129-134.

- STROSS, W. P.; WARNKE, R.A.; FLAVELL, D. J.; FLAVEL, S.U.; SIMMONS, D.; GATTER, E.: molecule detected in formalin fixed tissue by antibodies MT-1, DF-T1, and L60 (Leu-22) corresponds to CD43 antigen *J. Clin Pathol*, 1989,(1) 953-956.
- SUTTON, L.; MASON, D.Y.; REDMAN, C.W.: HLA-DR positive cells in the human placenta. *Immunology*, 1983, 103-12.
- SZEKERES-BARTHO, J.; PAR, G.; DOMBAY, G.; SMART, Y.C., VOLGYI, Z.: The antiabortive effect of progesterone-induced blocking factor in mice manifested by modulating NK activity. *Celular Immunology*, 1997, 194-199.
- TABIBZADEH, S. : Proliferative activity of limphoid cells in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1989, 437-443.
- THURMAN, E.C.; WALKER, J. JAYARAMAN, S; MANJUNATH, N.; ARDMAN, B.; GREN, J.M.: Regulation of in vitro and in vivo T cell activation CD43. *Int Immunol*. 1998,691-701.
- TUKEY, J.W.: *Exploratory data analysis*. ed. Addison – Wesley publishing Company , USA, 1977.
- UREN, S. & BOYLE, W.: Isolation of macrophages from human placenta. *Journal of Immunology*, 1985, 25-34.
- USHER, R. & MCLEAN, F.: Intrauterine growth of live-born Caucasian infants at sea level: standards obtained from measurements in 7 dimensions of infants born between 25 and 44 weeks of gestation. *J. Pediatr*. 74- 901, 1969.
- VAN OOSTEVEEN, D.C.; BERG V. D.; DAMOISEAUX, J.G.M.C.; RESS, V. E. P.: Macrophages subpopulations and reticulum cells in rat placenta – Na immunohistochemical study. *Cells & Tissue Research*, 1992, 513-519.
- VARNER, M.V. – Dispropotionate Fetal Growth in: PERNOLL, M.L.: *Current Obstetric & Gynecolgc*. Appleton & Lange, 341-351, 1991.
- VASSILIADOU, N & BULMER, J. N.: Characterization of endometrial T. Lymphocyte subpopulations in spontaneous early pregnancy loss. *Hum Reprod*, 1998, 44-47.
- VASSILIADOU, N. & BULMER J. N.: Characterization of tubal and decidual leukocyte populations in ectopic pregnancy: evidence that endometrial granulated lymphocytes are absent from the tubal implantation site. *Fertil Steril*, 1998, 760-767.

- VINATIER, D. & MONNIER, J. C.: Description des elements dans une perspective immunologique, , J. Obstet Gyneco, 1990, 671-700.
- WELLS, M. & FOX, H. Immunology and immunopathology of the maternofetal interface. In: COULAM, C.B.; FAULK, W.P. E MCINTYRE, J.A.: Immunological Obstetrics, W. W Norton & Company. New York, 1992, 166-176.
- WETZKA, B; CLARK, D.E; CHARNOCK-JONES, D.S; ZAHRANDNIK, H.P; & SMITH, S.K. Isolation of macrophages (Hofbauer cells) from human tem placenta and their prostaglandin E<sup>2</sup> and thromboxane production. Human Reproduction, 1997, 847-852.
- WILSON, C.B.; HASS, J.E.; WEAVER, W.M.: Isolation, purification and characteristics of mononuclear phagocyte from human placentas. Journal of Immunolgical methods, 1983, 305-317.
- WOOD, G.W.: Immunohistological identification of macrophages in murine placenta, yolk-sac membranes and pregnant uteri. Macrophages in Murine Placentae. 1980, 309-317.
- WOOD, G.W.: Mononuclear phagocytes in the human placenta. Placenta, 1980, 113-123.
- YANG, Y.; CHU, W.; GERAGTHY, D. E.; HUNT, J.S.: Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN- $\alpha$ . Journal of Immunology, 1996, 4224-4231.
- YAGEL, S.; LIVNI, N.; ZACUT, D.; GALILY, R.: Characterization and localization of human placental mononuclear phagocytes by monoclonal antibodies and other cell markers, 1990, 243-249.
- ZHU, X; BONET, B.; KNOPP, R.H.: 17  $\beta$ -Estradiol, progesterone testoterone inversely modulate low-density lipoprotein oxidation and citotoxicity in cultured placental trophoblast and macrophages. Am. Obstet Gynecol, 1997, 196-209



Universidade Federal Ceará  
Comitê de Ética em Pesquisa Clínica do Centro  
de Ciências da Saúde e do Complexo Hospitalar

Reunião: 18 de setembro de 1997

## PARECER DO RELATOR

**Solicitante:** Dr. Júlio Augusto Gurgel Alves

**Processo n°:** 035/97

**Projeto:**

**Relator:** Dr. Fernando Antônio Frota Bezerra

### **01. Parecer:**

O projeto encontra-se dentro das normas exigidas pelo Comitê de Ética, sendo aprovado sem restrição.

### **02. Recomendações Específicas / Restrições:**

### **03. Parecer Conclusivo:**

Favorável

Favorável com Restrições

Desfavorável

  
RELATOR DO PROCESSO



Universidade Federal Ceará  
Comitê de Ética em Pesquisa Clínica do Centro  
de Ciências da Saúde e do Complexo Hospitalar

Fortaleza, 22 de setembro 1997.

**Of. nº 075/97**

**Processo nº 035/97**

**Deptº/Serviço:** Departamento de Patologia e Medicina Legal do CCS/UFC

**Projeto:** "DISTRIBUIÇÃO DE MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS NA PLACENTA HUMANA DE PRIMEIRO E TERCEIRO TRIMESTRES"

Levamos ao conhecimento de V.Sa. que o **COMEPE** - Comitê de Ética em Pesquisa Clínica do Centro de Ciências da Saúde e Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde, Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, publicada no Diário Oficial da União em 16 de outubro de 1996, **aprovou** o projeto em apreço, na reunião do dia **18 de setembro de 1997**.

Atenciosamente,

**Dr. Fernando Antônio Frota Bezerra**  
Relator(a) do Processo

Anexo 1 - Distribuição dos dados clínicos referentes a cada caso do estudo.

<b>pacientes</b>	<i>idade (anos)</i>	<i>IG (semanas)</i>	<i>tipo de parto</i>	<i>peso fetal(g)</i>
1	16	40	PN	3990
2	22	39	CES	3000
3	36	39	CES	3100
4	28	39	CES	2800
5	18	40	PN	2960
6	27	39	PN	3240
7	23	39	CES	3360
8	26	37	PN	3020
9	16	39,5	PN	2600
10	32	40	PN	3570
11	21	38	PN	3000
12	21	39	CES	3020
13	22	39	CES	3200
14	20	40	PN	3050
15	33	39	PN	3300
16	15	40	PN	3420
17	29	39	PN	3250
18	17	40	PN	3540
19	24	41	CES	3600
20	29	40	CES	3350
21	26	42	PN	3200
22	26	39	PN	3200
23	20	40	PN	3040
24	14	40	PN	3100
25	23	39	CES	3560
26	18	39	CES	3500
27	18	40	PN	3680
28	19	40	PN	3500
29	23	40	PN	3710
30	19	39	PN	3280
31	22	39	CES	3600
<b>média</b>	23	39		3282
<b>mediana</b>	22	39		3250
<b>desvio padrão</b>	5	1		300

## FORMULÁRIO PARA COLETA

Nº \_\_\_\_\_

PRONTUÁRIO \_\_\_\_\_

NOME; \_\_\_\_\_

IDADE: \_\_\_\_\_ G \_\_\_ P \_\_\_ A \_\_\_ UR \_\_\_\_\_

IG(UR) \_\_\_\_\_

IG(US) \_\_\_\_\_

### PLACENTA DE TERCEIRO TRIMESTRE

A TERMO ( )

PRÉ-TERMO ( )

PARTO VAGINAL ( ) -----HORAS DE T. DE PARTO: < 4 ( )  
(ativo 4 a 10 cm) 4-8 ( )  
8-12 ( )

CESÁRIA ( ) -----INDICAÇÃO: \_\_\_\_\_

T. DE PARTO : ( )SIM ( )NÃO

Responsável: \_\_\_\_\_