

Antônio Rodrigues Braga Neto

**Influência do Índice Apoptótico e da Imuno-Expressão da Survivina
no Prognóstico de Pacientes com Mola Hidatiforme Completa**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia,
Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista, UNESP, para
obtenção do Título de Doutor em Obstetrícia.**

Orientadora: Professora Titular Doutora Marilza Vieira da Cunha Rudge

Co-orientadora: Professora Doutora Izildinha Maestá

Co-orientadora: Professora Doutora Maria Aparecida Custódio Domingues

Botucatu – São Paulo

2009



unesp

FACULDADE DE MEDICINA

Antônio Rodrigues Braga Neto

**Influência do Índice Apoptótico e da Imuno-Expressão da Survivina
no Prognóstico de Pacientes com Mola Hidatiforme Completa**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia,
Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista, UNESP, para
obtenção do Título de Doutor em Obstetrícia.**

Orientadora: Professora Titular Doutora Marilza Vieira da Cunha Rudge

Co-orientadora: Professora Doutora Izildinha Maestá

Co-orientadora: Professora Doutora Maria Aparecida Custódio Domingues

Botucatu – São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Braga Neto, Antonio Rodrigues.

Influência do índice apoptótico e da imuno-expressão da survivina no prognóstico de pacientes com mola hidatiforme completa / Antonio Rodrigues Braga Neto. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientadora: Marilza Vieira Cunha Rudge

Co-orientadora: Izildinha Maestá

Assunto CAPES: 40101150

1. Gravidez 2. Placenta - Doenças

CDD 618.3

Palavras chave: Caspase-3; Gravidez; Índice apoptótico; Mola hidatiforme completa; Neoplasia trofoblática; Prognóstico; Survivina



*À velha Misericórdia, casa mais que quaticentenária,
onde notáveis se plasmaram, nesse templo do saber,
o reconhecimento por ter-me acolhido entre seus mestres,
quando já me bastava o orgulho de ser um dos seus discípulos.*

*À minha avó amada,
Maria da Glória Braga,
presença mais forte de Deus em minha vida,
que na simplicidade de sua existência,
forjou-me o Homem que sou,
o agradecimento eterno
do neto que sempre te amará.*

*Ao meu amor
Martha Brandão,
por caminhar ao meu lado,
vencendo os desafios da vida,
fazendo valer à pena,
terá para sempre meu coração.*

*A Professora Izildinha Maestá,
grande Mestra, docente, médica,
amiga, confidente, conselheira,
trofoblasta das mais capazes e dedicadas.
Sem você os caminhos impérvios
da pós-graduação seriam mais árduos e espinhosos.
Que agradecimento é maior que a Gratidão?
Sou-lhe eternamente Grato.
Seu sempre e fiel Aluno e Amigo.*

À Professora Titular Doutora Marilza Vieira da Cunha Rudge, Pró-Reitora de Pós-graduação da Universidade Estadual Paulista - UNESP, orientadora dessa tese, pela pedagogia com que sempre me apoiou e pela ajuda incondicional na feitura dessa tese. Seu humanismo e competência iluminam minha vida pessoal e acadêmica. Sua existência é dádiva que tenho a oportunidade de privar. Obrigado pela amizade

À Professora Assistente Doutora Maria Aparecida Custódio Domingues, co-orientadora dessa tese, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Pelo compartilhar conhecimentos sobre tema hermético, minha gratidão. Pela confiança depositada, minha amizade.

Ao Professor Assistente Doutor Luis Fernando Barbisan, do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociência de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista, pela ajuda fundamental dispendida na elaboração e confecção dessa tese, exaltando os valores da equipe multiprofissional, minha gratidão.

Ao Professor Doutor Odair Carlito Michelin, não obstante imenso conhecimento oncológico, contempla-me com amizade e valiosos conselhos. Tenho-o como meu Pai.

Ao Professor Titular Doutor José Carlos Peraçoli, pelo apoio sempre dispensado, a cordialidade perene, a preocupação constante e os valorosos conselhos dados ao longo da pós-graduação, meus agradecimentos e gratidão.

Ao Professor Hélio Rubens de Carvalho Nunes, do Grupo de Auxílio à Pesquisa da Universidade Estadual Paulista - UNESP, pela competente análise estatística.

À Professora Adjunta Iracema de Matos Paranhos Calderón, Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista - UNESP, pela presteza com que sempre me auxiliou nas múltiplas demandas ao longo dessa etapa da minha vida acadêmica e profissional.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, em especial o Professor Doutor Rogério Dias e o Professor Doutor Marcos Consonni, pelos valorosos ensinamentos ministrados ao longo do curso, fundamentais aos que aspiram a promoção da Ciência e à Academia.

Ao Professor Acadêmico Jorge de Rezende, in memoriam, pela generosa acolhida em seu Serviço modelar, quando me recebeu ainda imberbe, a gratidão pelas lições imutáveis de Obstetrícia, que hoje repito aos mais moços, exaltando sua voz que já não fala, mas que para sempre será ouvida, através de seus discípulos, herdeiros de sua Técnica, filhos de sua Arte.

Ao Professor Acadêmico Carlos Antônio Barbosa Montenegro, Titular de Obstetrícia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo apoio permanente e confiante incontestes. Tenho orgulho de ser seu aluno e amigo.

Ao Professor Jorge de Rezende Filho, Chefe da 33ª Enfermaria (Maternidade) da Santa Casa da Misericórdia do Rio de Janeiro, pela confiança depositada ao fazer-me seu assistente, a gratidão eterna,

À Cristiane Abe e Ana Cláudia Garcia Mira, secretárias da Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, durante meu Mestrado e Doutorado, pela eficiência e prontidão com que sempre tratarão minhas questões.

À Janete Aparecida Herculano Nunes Silva, Regina Célia Spadin e Nathanael Pinheiro Salles, da Secção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, pela ajuda sempre dispensada e carinho pessoal comigo, sempre diminuindo as dificuldades.

Aos Professores Patrícia Rangel Sobral Dantas e Renan Rocha Soares, amigos de todas as horas, provados em candentes batalhas, pela oportunidade de convivência harmoniosa, generosidade precisa e companheirismo inabalável.

Aos Padres Bernardo Thus (Paróquia de Nossa Senhora da Conceição – Matriz de Resende) e Medoro de Oliveira Souza Neto (Paróquia de Nossa Senhora da Glória – Catedral de Valença) e aos Bispos Waldyr Novaes Calheiros (Diocese de Barra-do-Piraí / Volta Redonda) e Elias Manning (Diocese de Valença), por lembrar o genuíno sentido de minhas buscas e a origem de minha fé.

Ao Professor Paulo Belfort, mestre maior da doença trofoblástica gestacional no Brasil, pelo ter-me introduzido ao estudo desses trofoblastomas e lapidado minha assistência às pacientes portadoras dessa moléstia tão invulgar. Tudo o que aprendi, fi-lo por suas mãos. Seu discípulo fui e sou. A ele, todo meu respeito e gratidão. Carinho que estendo aos membros da Sociedade Brasileira de Neoplasia Trofoblástica Gestacional, pelo lutarmos a mesma luta em prol de nossas pacientes.

Sumário

Capítulo I. Entendendo a apoptose em Obstetrícia	14
1. Introdução	15
2. As vias da apoptose	16
2.1 Via intrínseca – características da via mitocondrial na apoptose induzida pelo receptor de morte	16
2.2 Via extrínseca – características da família dos receptores de morte do fator de necrose tumoral (TNF)	18
3. Expressão trofoblástica e função da família dos receptores de morte do TNF e suas respectivas moléculas ligantes	20
3.1 Fas e FasL.....	20
3.2 TNF-R1 e TNF- α	21
3.3 TRAIL-R1 / TRAIL-R2 e TRAIL	22
4. O papel das caspases na diferenciação trofoblástica	23
5. Reguladores endógenos da apoptose trofoblástica	23
5.1 Proteína inibidora semelhante à flice (caspase-8) – FLIPs (<i>flice-like inhibitory protein</i>)	24
5.2 A família Bcl-2	26
5.3 Proteínas inibidoras de apoptoses (IAPs)	27
5.4 Inibidores das proteínas inibidoras de apoptose	29
6. Regulação exógena da apoptose no trofoblasto	30
6.1 Citocinas T helper1 (Th1) e T helper2 (Th2)	31
6.2 Fatores de crescimento	32
7. Papel dos monócitos / macrófagos na regulação da apoptose trofoblástica	32
7.1 Monócitos / macrófagos e o processo de remoção das células trofoblásticas apoptóticas	33
7.2 Monócitos / macrófagos como indutores de apoptose	35
8. Conclusão	36
9. Referências Bibliográficas	37

Capítulo II. Papel da Apoptose em Obstetrícia – Normal e Desvios	48
1. Introdução	49
2. Apoptose na gestação normal	50
2.1 Aposição e adesão do trofoblasto	51
2.2 Invasão do trofoblasto extra-viloso e transformação da arteríola espiralada	52
2.3 Tolerância imunológica materna	53
2.4 Diferenciação e renovação do trofoblasto viloso	55
3. Apoptose e Complicações na Gravidez	56
3.1 Apoptose na toxemia gravídica	57
3.2 Apoptose e crescimento intra-uterino restrito	59
3.3 Apoptose e parto pretermo	60
3.4 Apoptose e diabetes gestacional	61
3.5 Apoptose e abortamento	62
3.6 Apoptose e gravidez ectópica	63
3.7 Apoptose e doença trofoblástica gestacional	65
4. Conclusão	67
5. Referências Bibliográficas	68
Capítulo III. Influência do Índice Apoptótico e da Imuno-Expressão da Survivina no Prognóstico de Pacientes com Mola Hidatiforme Completa	78
Resumo	79
Abstract	80
1. Introdução	81
2. Metodologia	83
3. Resultados	88
4. Discussão	90
5. Referências Bibliográficas	94
6. Tabelas	99
7. Figuras	104
6. Anexo (Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa)	107

Entendendo a Apoptose em Obstetrícia

1. Introdução

Depende o desenvolvimento placentário normal da capacidade trofoblástica de diferenciação e invasão. Nesse processo, há rápida divisão celular a fim de formar a interface entre a mãe e o conceito, bem como invadir a decídua e remodelar os vasos uterinos, transformando-os de estruturas de resistência para de capacitância, garantindo adequado aporte sanguíneo para o desenvolvimento do feto (Straszewski-Chavez et al., 2005). Sob esta égide, a placenta apresenta-se como órgão em constante remodelamento tecidual, em que a apoptose é o processo-chave dessas modificações (Mayhew, 2001).

É apoptose a morte celular programada, epíteto cunhado por Lockshin & Williams, 1964, em alusão ao grego “queda das folhas das árvores”. Trata-se de mecanismo fisiológico universal nos mamíferos, que regula o equilíbrio entre a proliferação e morte das células, a fim de manter a homeostase tecidual (Kiechle & Zhang, 2002).

A apoptose envolve caminhos sinalizadores e micro-ambiente mui especializados, descrito pormenorizadamente, vez primeira, por Kerr et al., 1972. A similaridade no processo de apoptose entre diferentes espécies e tecidos sugere mecanismo de controle altamente preservado, cujo entendimento é fundamental ao tocólogo, mercê de suas repercussões na etiopatogenia obstétrica. Sabe-se que anomalias nesse processo fisiológico estão arroladas na toxemia, crescimento intra-uterino restrito, parto pretermo, diabete gestacional, abortamento, gravidez ectópica e transformação maligna da mola hidatiforme,

tornando o tema *apoptose* de alta importância em Obstetrícia. Compreender sua bioquímica na gravidez será objeto deste artigo.

2. As vias da apoptose

A depender do estímulo, a apoptose poderá ser iniciada intrinsecamente, por uma via mitocondrial ou extrinsecamente, mediada por receptor de morte ou em resposta a elementos exógenos como citocinas. Trata-se de processo não excludente, mas que pode ser complementar e cursar com ativação cruzada (Fadeel & Orrenius, 2005). Ambas as vias culminam na ação de cisteína protease aspartato específica, apelada caspase (*cysteine – **aspartic acid** – protease*), encarregada de mediar a morte celular, por proteólise no resíduo aminoácido aspartato.

2.1 Via intrínseca – características da via mitocondrial na apoptose induzida pelo receptor de morte

Diferente da via extrínseca, que depende da sinalização do receptor de morte para iniciar a apoptose, na via intrínseca este sinal é promovido ou direcionado para a mitocôndria. Em resposta ao estresse celular, como na lesão ao ácido desoxirribonucléico (*deoxyribonucleic acid* – DNA), ou na ausência de fator de crescimento, a via mitocondrial pode ser iniciada pelo p53, proteína supressora tumoral, que ativa fatores pró-apoptóticos como os membros da família Bcl-2 (Miyashita & Reed, 1995). Pode ainda essa via ser deflagrada pela atuação da caspase-8 ao clivar uma proteína, Bid, membro da família pró-apoptótica Bcl-2,

resultando na translocação da molécula Bid clivada para a mitocôndria, com conseqüente ativação da via intrínseca (Li et al, 1998). Haverá atuação de outros membros da família pró-apoptótica Bcl-2, como Bax e Bak (Narita et al., 1998; Phillips et al., 2001; Sharpe, 2004), que aumentarão a permeabilidade da membrana mitocondrial a fim de liberar o citocromo-c, fator indutor de apoptose (Susin et al., 1996), bem como outros fatores pró-apoptóticos, DIABLO (Verhagen et al., 2000), Smac (Du et al., 2000) e HtrA2 (Suzuki et al., 2001). Como resultado, o citocromo-c promove a ligação entre o adaptador protéico e a protease ativadora do fator-1 apoptótico (APAF-1), como molécula de dATP, com conseqüente recrutamento e ativação da caspase-9, iniciadora, formando complexo macromolecular apelado apoptossomo (Li et al., 1997).

De forma análoga ao complexo sinalizador de morte induzida (DISC – *death-inducing signaling complex*) da via extrínseca, o apoptossomo atua como complexo ativado para a caspase-9 na via intrínseca. Essa caspase-9 irá ativar as caspases-3, 6 e 7, efetoras, chegando ao ponto em que a via intrínseca se sobrepõe à via extrínseca (Hirata et al., 1998). Estas caspases efetoras vão clivar série de proteínas vitais ao funcionamento celular, como enzimas reparadoras de DNA, proteínas do citoesqueleto e lâmina nuclear, podendo explicar os achados microscópicos característicos da apoptose: condensação do núcleo, formação de bolhas na membrana plasmática e redução do volume celular. Ao final desse processo, há fragmentação celular múltipla, dando origem aos corpos apoptóticos, que serão fagocitados, na ausência de processo inflamatório ou qualquer dano celular circunvizinho, (diferentemente da necrose).

Vale salientar que as vias extrínsecas e intrínsecas não são excludentes. Pode o p53, por exemplo, da via intrínseca, regular a expressão de certos receptores de morte, da via extrínseca; ou ainda a via mitocondrial – via intrínseca, atuar amplificando o sinal deflagrado pelos receptores de morte – via extrínseca, verdadeira diafonia bioquímica, determinando morte celular programada (Schuler & Green, 2001; Sprick & Walczak, 2004).

2.2 Via extrínseca – características da família dos receptores de morte do fator de necrose tumoral (TNF)

Os membros da família dos receptores de morte do TNF caracterizam-se por exibir região C-terminal de aproximadamente 80 aminoácidos em comum, chamada de domínio de morte (Itoh & Nagata, 1993). Oito membros dessa família foram identificados: Fas (CD95 / APO-1), TNF-R1 (CD 120a), receptor de morte 3 (APO-3 / WSL-1 / TRAMP / LARD), receptor de morte 4 (TRAIL-R1), receptor de morte 5 (TRAIL-R2 / TRICK2), receptor de morte 6, EDAR e NGFR (Aggarwal, 2003). Entre esses receptores, alguns foram mais bem estudados e caracterizados: Fas, TNF-R1, TRAIL-R1 e TRAIL-R2. Muitos desses receptores encontram-se na membrana celular – prontos para atuar, ou sob forma transmembrana – sem atividade biológica, possivelmente para proteger a célula, em certas condições, da apoptose induzida por receptor de morte (Cheng et al., 1994).

A interação entre molécula ligante e seu receptor de morte, na membrana celular, ativar os processos associados àquele receptor a fim de promover a

apoptose (Chan et al. 2000). Para a transdução dos sinais apoptóticos, os receptores de morte do TNF têm regiões intracelulares, que mediam interações proteína-proteína com outras proteínas relacionadas à apoptose, como domínio de morte associado à Fas (*Fas-associated death domain* – FADD / MORT1) e domínio de morte associado à TNF-R (Chinnaiyan et al., 1996). Após a ligação do FADD à extremidade citoplasmática do receptor de morte, outras proteínas são recrutadas, incluindo pró-caspase-8 e pró-caspase-10 (Muzio et al., 1996; Wang et al., 2001), via domínio efetor de morte (*death-effector domain* – DED) para formar o DISC (Kischkel et al., 1995). Neste ponto ocorre a convergência da via dos receptores de morte do TNF. Uma vez expresso o DISC, caspases 8 e 10, iniciadoras, tornam-se ativas (Medema et al., 1997; Wang et al. 2001).

As caspases podem ser subdivididas em dois grupos: iniciadoras, encarregadas de ativar um segundo grupo de caspases, e outro apeladas efetoras, que, de fato, promovem a apoptose. De modo semelhante a outras proteases, as caspases são sintetizadas sob a forma de precursores inativos, as pró-caspases (Nunez et al., 1998). Sabe-se que grande concentração local de pró-caspase 8 ou 10, na presença de DISC, promove ativação auto-catalítica, resultando na formação de caspase-8 ou 10 (Muzio et al., 1998). Estudo recente observou, todavia, que a ativação da caspase-8 pode ocorrer independentemente da proximidade com DISC, em processo de dimerização, em detrimento da proteólise (Chen et al., 2002). Independente do modo de ativação, fato é que, uma vez ativadas, as caspases-8 e 10 deflagram a cascata apoptótica, via receptores de morte do TNF, pela ativação de caspases-3, 6 e 7, efetoras (Hirata et al., 1998), promovendo a morte celular programada.

3. Expressão trofoblástica e função da família dos receptores de morte do TNF e suas respectivas moléculas ligantes

Para melhor compreensão da via extrínseca da apoptose é imprescindível conhecer pormenores sobre os receptores de morte do TNF e suas moléculas ligantes. Essa associação resultará na ativação dos processos associados àquele receptor, a fim de promover a apoptose (Chan et al. 2000).

3.1 Fas e FasL

Quer o trofoblasto viloso (citotrofoblasto e sinciotrofoblasto) (Pongcharoen et al., 2004), quer o trofoblasto extra-viloso (Hammer & Dohr, 2000) expressam Fas e / ou FasL (sua molécula ligante), ainda que tenha sido relatada ausência de Fas no citotrofoblasto viloso (Ishihara et al., 2002), no citotrofoblasto extra-viloso jovem (Hammer et al., 1999) e no sinciotrofoblasto de termo (Roh et al., 2002), bem como ausência de FasL no sinciotrofoblasto de primeiro trimestre e de termo (Hammer et al., 1999; Hammer & Dohr, 2000). Esses resultados contraditórios podem ser explicados por diferenças no uso de anticorpos e na seleção de amostras placentárias (Pongcharoen et al., 2004).

Parece que as células trofoblásticas expressam predominantemente formas de Fas transmembrana (Aschkenazi et al., 2002), em quantidades crescentes com a evolução da gravidez (Gruslin et al., 2001). Ao revés, a expressão de FasL decresce no trofoblasto viloso no termo (Pongcharoen et al., 2004), notadamente em torno ao trabalho de parto (Uckan et al., 1997), sugerindo que a redução de

FasL possa ser modulada pelo processo inflamatório associado à parturição (Balkundi et al., 2000). Sabe-se que o FasL não é expresso na membrana plasmática, estando associado à via de secreção lisossomal no citoplasma, através da eliminação de microvesículas (Abrahams et al., 2004). Tem-se arrolado o papel biológico do FasL no efeito imunológico privilegiado do trofoblasto, podendo explicar seu decréscimo nas vilosidades do termo (Balkundi et al., 2000).

3.2 TNF-R1 e TNF- α

A expressão do TNF-R1 e seu ligante, TNF- α , ocorre tanto no trofoblasto viloso, quanto no extra-viloso (Knofler et al., 2000). Evidência indica que essas moléculas aumentam de quantidade com o perpassar da gravidez (Yelavarthi & Hunt, 1993) e, à semelhança com o sistema Fas / FasL, pode estar ligada ao processo de parturição. Todavia, ao contrário do FasL, o TNF- α é potente indutor de apoptose no trofoblasto (Knofler et al., 2000). Pelo compartilhar, TNF-R1 e Fas, muitos elementos intracelulares da cascata da apoptose, aventa-se que TNF- α possa ativar via alternativa ao receptor de morte do TNF na promoção da apoptose (Straszewski-Chavez et al., 2005). O TNF- α pode ser clivado por proteínas na membrana, originando forma solúvel; ainda que apenas pequena quantidade desse ligante possa ser detectado em cultura de vilosidades do primeiro trimestre (Jokhi et al., 1997). Isso sugere que o trofoblasto não é fonte primária de TNF- α solúvel no tecido placentário, podendo essa molécula advir de macrófagos, células *natural killer* (NK) ou outras células do espaço interviloso (Ekerfelt et al., 2002). Todavia, pelo co-existir na membrana plasmática do

trofoblasto TNF-R1 e TNF- α , outros mecanismos devem existir a fim de prevenir apoptose induzida por TNF- α . Além disso, receptores de morte do TNF têm sido detectados no líquido amniótico e na urina de grávidas, indiciando que a secreção desses receptores poderia proteger o feto contra efeitos citotóxico do TNF- α (Austgulen et al., 1992). Corroborar essa hipótese o trabalho de Knofler et al., 2000, ao demonstrar que células do trofoblasto viloso liberam grande quantidade de receptores solúveis de TNF, sugerindo que o trofoblasto possa representar a fonte secretora desses receptores.

3.3 TRAIL-R1 / TRAIL-R2 e TRAIL.

Diferentemente do sistema Fas / FasL e do TNF-R1 / TNF- α , o ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (*TNF-related apoptosis-inducing ligand* – TRAIL) e seus receptores, TRAIL-R1 e TRAIL-R2, parecem ser apresentados de modo diverso pelo trofoblasto viloso. Células do citotrofoblasto expressam níveis elevados de TRAIL-R1 / TRAIL-R2, enquanto que TRAIL teve forte representação no sinciotrofoblasto (Chen et al., 2004). A localização privilegiada desses receptores pode, não apenas prover proteção contra agressões do sistema imune materno, como também derrogar ação apoptótica autócrina ou parácrina destas células trofoblásticas ou da sua vizinhança.

Foi observado que expressão do TRAIL-R1 / TRAIL-R2 aumenta no trofoblasto viloso com a idade gestacional, sugerindo que essas estruturas podem estar relacionadas com outros receptores de morte do TNF, a fim de aumentar a apoptose e culminar com epílogo da gravidez.

4. O papel das caspases na diferenciação trofoblástica

Modificações morfológicas compatíveis com apoptose, como condensação nuclear, formação de bolhas na membrana e fragmentação do DNA têm sido observadas no trofoblasto viloso de placentas oriundas de gravidez normal (Smith et al., 2000), arrolando apoptose ao remodelamento fisiológico dos tecidos. Como já dito, muitas das características apoptóticas devem-se à ativação das caspases, sugerindo que essas proteases podem estar envolvidas na renovação das células do trofoblasto viloso. Não obstante, o citotrofoblasto de primeiro e terceiro trimestres expressam as pró-caspases-3, 6 e 7, que vão ativar as caspases-3 e 6 observadas no sinciciotrofoblasto após a fusão sincicial (Huppertz et al., 1999). Yusuf et al., 2002, demonstraram que não apenas células do citotrofoblasto do terceiro trimestre têm atividade caspase-efetora, mas concluíram que essa atividade é maior no citotrofoblasto do que no sinciciotrofoblasto. Isso pode explicar porque as células do citotrofoblasto de placentas do terceiro trimestre exibem grau maior de apoptose do que as culturas de sinciciotrofoblasto (Crocker et al., 2001), ainda que o oposto tenha sido observado *in vivo* (Smith et al., 2000).

5. Reguladores endógenos da apoptose trofoblástica

Cada etapa da cascata apoptótica é rigorosamente controlada por inibidores endógenos a fim de prevenir propagação indevida de sinal de morte. Muitos desses inibidores intracelulares são expressos na placenta e atuam perturbando o recrutamento e ativação das caspases; outros coordenam sinais de

morte na via intrínseca, pela regulação no envio dos fatores pró-apoptóticos originados na mitocôndria. Todos trabalham no sentido de modular a resposta apoptótica no trofoblasto e garantir o sucesso da prenhez.

5.1 Proteína inibidora semelhante à flice (caspase-8) – FLIPs (*fllice-like inhibitory protein*)

A FLIP é proteína intracelular expressa na placenta, com estrutura homóloga à caspase-8. Esta semelhança confere à FLIP capacidade de interferir no recrutamento e ativação da caspase-8 no DISC, prevenindo, desse modo, apoptose mediada por receptor de morte (Irmiler et al., 1997). Ademais, aumento na expressão de FLIP confere proteção às células trofoblásticas do primeiro trimestre contra apoptose induzida por Fas (Aschkenazi et al., 2002). Outrossim, as FLIPs podem reforçar a inibição da cascata apoptótica intracelular, pela ativação de vias de sobrevivência como NF- κ B, ou promover proliferação celular (Kataoka et al., 2000).

Ainda que muitas variantes de FLIPs tenham sido relatadas, apenas expressões longa, FLIP_L (L – *long*), e curta, FLIP_S (S – *short*) foram detectadas em placentas (Irmiler et al., 1997) e isoladas em células trofoblásticas de primeiro trimestre (Aschkenazi et al., 2002). Das duas isoformas de FLIP encontradas na placenta, FLIP_S parece ser o inibidor mais potente de apoptose. Na presença de FLIP_S, o recrutamento e ativação da caspase-8 é completamente inibido no DISC (Krueger et al., 2001). Contudo, se FLIP_S é tão potente inibidor de caspase-8, ainda é incerto como essa protease consegue ser ativada e promover a

diferenciação da expressão de FLIP nas células do citotrofoblasto. Diferentemente da FLIP_S, FLIP_L é incapaz de evitar o recrutamento da caspase-8 pelo DISC (Krueger et al., 2001). Sugere-se que a caspase-8 seja ativada por processo de clivagem em duas etapas. Na primeira fase de clivagem, há autocatálise na presença de domínio efetor de morte. Sabe-se que FLIP_L também contém estrutura homóloga ao domínio catalítico na caspase-8. Embora essa região semelhante da FLIP_L seja inativa, poderá ser suficiente para induzir a clivagem inicial da caspase-8, resultando na geração de produtos de clivagem: p41 / 43. Na segunda fase de clivagem, a caspase-8 é segmentada transcataliticamente, o que requer domínio funcional de caspase. Pelo ser a região semelhante à caspase do FLIP_L cataliticamente inativa, entende-se porque FLIP_L é capaz de inibir somente a segunda fase de clivagem da caspase-8, visto que falta domínio funcional de caspase, prevenindo contra todos os efeitos deletérios desse extrato enzimático (Krueger et al., 2001). Por essa razão, a presença do FLIP_L pode explicar como a caspase-8 pode ser ativada e promover a diferenciação do citotrofoblasto, a despeito da expressão de FLIP_S nas células trofoblásticas. Novas evidências indicam que FLIP_L pode promover ativação da caspase-8 pela dimerização, originando caspase-8 independente do DISC (Chang et al., 2002; Micheau et al., 2002). Dessa forma, a ativação da caspase-8 não depende apenas da ação da FLIP. Isso sugere que, não obstante a FLIP_S possa inibir a ativação da caspase-8 no complexo sinalizador da morte induzida, promovendo proteção às células trofoblásticas da apoptose mediada por Fas (Aschkenazi et al., 2002), FLIP_L é incapaz de prevenir a ativação da caspase-8 por via independente do DISC,

representando modo alternativo de ativar a caspase-8, necessária na diferenciação do citotrofoblasto.

5.2 A família Bcl-2

Os membros da família Bcl-2 regulam o envio dos fatores pró-apoptóticos originados na mitocôndria, característicos da via intrínseca. A família Bcl-2 é composta por três grupos funcionais, caracterizados por variação no número de domínios homólogos de Bcl-2 (*Bcl-2 homology* – BH). Membros do primeiro grupo, como o Bcl-2 e Bcl-_{XL} contêm quatro domínios homólogos (BH1, BH2, BH3, BH4) e inibem a apoptose; já Bax e Bak, que fazem parte do segundo grupo, são pró-apoptóticos e cursam com ausência de N-terminal no domínio BH4. Enquanto Bax e Bak aumentam a permeabilidade da membrana da mitocôndria para o envio do citocromo-c, Bcl-2 e Bcl-_{XL} inibem o envio do citocromo-c e de outros fatores originários da mitocôndria, determinando prevenção da propagação do sinal de apoptose (Adachi et al., 1997). A fração exclusivamente protéica do BH3, Bid e Bik são os membros do terceiro grupo e promovem morte celular programada pela ativação de proteínas pró-apoptóticos, como Bax e Bak, ou ligando-se à grupos anti-apoptóticos da família Bcl-2, a fim de inibir sua função. Em meio a tantas moléculas pró e anti-apoptóticas, o resultado dependerá da quantidade desses elementos no meio celular (Cory et al., 2003).

Sabe-se que sinciciotrofoblasto expressa Bcl-2 em níveis mais elevados que o citotrofoblasto, no evolover da gravidez (Danihel et al., 2002). Da mesma forma, a expressão da célula mielóide leucêmica-1 (Mcl-1), outro membro anti-

apoptótico da família Bcl-2, é mais marcante no sinciciotrofoblasto do que nas células do citotrofoblasto (Huppertz et al., 1999). A expressão de Bcl-2 e Mcl-1 no sinciciotrofoblasto foi inicialmente arrolada na prevenção de apoptose após a fusão sincicial. Contudo, Bcl-2 e Mcl-1 previnem ativação da caspase-9, ainda que não sejam capazes de impedir a ativação da caspase-8, que ocorre durante a diferenciação do citotrofoblasto. De fato, a caspase-8 pode ativar diretamente caspases efetoras, sem envolvimento mitocondrial (Hirata et al., 1998), explicando porque a apoptose ainda é observada no sinciciotrofoblasto, mesmo em presença de Bcl-2 e Mcl-1 (Levy & Nelson, 2000). Foi demonstrado que o sinciciotrofoblasto também expressa Bax (De Falco et al, 2001) e Bak (Ratts et al., 2000), sugerindo que a presença de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 pode promover apoptose no sinciciotrofoblasto (De Falco et al, 2001).

5.3 Proteínas inibidoras de apoptoses (IAPs)

As IAPs possuem capacidade de inibir apoptose, quer pela via mitocondrial, quer pela via mediada pelos receptores de morte. Foram descritos, até o momento, oito IAPs humanas: IAP ligada ao X (XIAP; MIHA / ILP-1), ILP-2 (Ts-IAP), c-IAP1 (HIAP2 / MIHB), c-IAP2 (HIAP1 / MIHC), IAP neuronal, Survivina (TIAP), Livina (KIAP / ML-IAP) e Apollon (Bruce). Os membros da família das IAPs são caracterizados por número variável de domínios repetidos de IAP baculoviral (*baculoviral IAP repeat* – BIR) e, com exceção da IPA neuronal, Survivina e Apollon, também contêm um domínio zinco-RING (*really interesting new gene* – RING) C terminal (Salvesen & Duckett, 2002). A região RING tem atividade

ubiquitina ligase E3 (Deveraux et al., 1999), permitindo a degradação de IAPs ou de outras proteínas, após o estímulo apoptótico adequado.

Sabe-se que XIAP, c-IAP1, c-IAP2, NAIP, Survivina e Livina são expressas no trofoblasto viloso e, à exceção de c-IAP1, também no trofoblasto extra-viloso (Ka & Hunt, 2003; Shiozaki et al., 2003; Liston et al., 2003). Entre as IAPs, a mais potente e versátil é XIAP, pelo ser capaz de inibir as vias apoptóticas mitocondrial e mediada pelo receptor de morte (Liston et al., 1996). XIAP contém três domínios seqüenciais BIR (BIR1, BIR2, BIR3) e um domínio zinco-RING C-terminal, com capacidade de inibir quer caspases iniciadoras, quer caspases efetoras (Deveraux et al., 1997). Conquanto esteja localizada no domínio BIR3-RING da XIAP a área que determina a atividade inibitória à caspase-9 (Sun et al., 2000), cabe ao domínio BIR2 e à região entre o BIR1 e BIR2 da XIAP a inibição da ativação da caspase-3 e 7 (Takahashi et al., 1998). Em resposta a determinados estímulos apoptóticos, XIAP pode ser clivada em duas porções: fragmento N-terminal contendo BIR1-2 e segundo fragmento contendo BIR3-RING. A estrutura BIR1-2 tem diminuída sua capacidade de inibir caspase-3 e pode ser susceptível à degradação mediada por caspase, enquanto que a porção BIR3-RING é mais estável, permanecendo com capacidade de inibir caspase-9, ainda que não mais suprimindo a apoptose induzida por Fas (Deveraux et al., 1999).

XIAP é altamente expressa no trofoblasto viloso de placentas de primeiro trimestre, decrescendo conforme progride a gravidez (Gruslin et al., 2001), correlacionando-se com aumento da apoptose placentária (Smith et al., 2000). A *down-regulation* da XIAP permite que ocorra apoptose mediada por Fas,

culminando com aumento da ativação de caspase-8, 9 e 3 (Straszewski-Chavez et al., 2005), bem como diminuição na viabilidade da célula trofoblástica. Aparenta-se que XIAP protegeria as células trofoblásticas dos efeitos pró-apoptóticos da ativação da caspase-8 durante a diferenciação do citotrofoblasto, pela inibição da ativação da caspase-9 e 3.

Outro membro importante da família das IAPs é a survivina. Essa proteína possui um único domínio BIR, suficiente para inibir a caspase-9 (O'Connor et al., 2000) e, possivelmente a caspase-3 e 7 (Shin et al., 2001). Há expressão de survivina no citotrofoblasto viloso e extra-viloso de placentas de primeiro e terceiro trimestres (Lehner et al., 2001), com fraca expressão observada nas células do sincitiotrofoblasto (Shiozaki et al., 2003). Demonstrou-se ainda que o uso de oligonucleotídeos *antisense* para inibir a survivina foi capaz de induzir apoptose em células trofoblásticas (Shiozaki et al., 2003).

5.4 Inibidores das proteínas inibidoras de apoptose

Os inibidores das IAPs são encarregados de remover o efeito inibitório das IAPs a fim de permitir que ocorra apoptose. Fazem parte dessa família o ativador de caspase derivado secundariamente da mitocôndria (*second mitochondria-derived activator of caspase* – Smac) / proteína com baixo PI ligada diretamente à IAP (*direct IAP-binding protein with low-PI* – DIABLO), proteína A2 exigente de alta temperatura (*high temperature requirement protein A2*) – OMI / HtrA2 e fator 1 associado à XIAP (*XIAP-associated factor 1*) – XAF1. Enquanto XAF1 é proteína nuclear pró-apoptótica (Fong et al., 2000), Smac / DIABLO e OMI / HtrAs são

proteínas liberadas pela mitocôndria, sob determinado estímulo apoptótico, a fim de inibir a função das IAPs (Suzuki et al., 2001). Tanto Smac / DIABLO, quanto OMI / HtrA2 ligam-se ao domínio BIR das IAPs, permitindo o recrutamento de caspases e sua ativação. Outrossim, OMI / HtrAs, pelo ser serina protease, pode clivar as IAPs, promovendo sua inativação (Yang et al., 2003).

Ainda que a atuação de Smac / DIABLO ou OMI / HtrAs na apoptose do trofoblasto não tenha sido objeto de muitas investigações, foi demonstrado que XAF1 é importante para regular a XIAP nas células trofoblásticas, ligando-se a ele e inibindo sua atividade anti-apoptótica (Liston et al., 2001). A expressão de XAF1 é observada em placentas do termo. Experimentos *in vitro* demonstraram que a elevada expressão de XAF1 em células trofoblásticas de primeiro trimestre resultam no aumento da apoptose nesse tecido, devido ativação da caspase-9 e 3 (Straszewski-Chavez et al., 2005). Observou-se ainda que a presença de TNF- α induz expressão e translocação de XAF1 do núcleo para o citoplasma, resultando na clivagem da XIAP e ativação da caspase-9 e 3 no trofoblasto (Straszewski-Chavez et al., 2005).

6. Regulação Exógena da Apoptose no Trofoblasto

Embora a morte celular programada ocorra durante processo fisiológico da renovação celular, pode a apoptose ser desencadeada por estímulos externos como citocinas ou fatores de crescimento (Levy & Nelson, 2000).

6.1 Citocinas T helper1 (Th1) e T helper2 (Th2)

Anos faz que Wegmann et al., 1993, sugeriram que a proteção à rejeição imunológica materna seria objeto da ação de citocinas Th2 na gravidez. A partir dessa observação, estudos demonstraram que o predomínio de citocinas Th2 sobre Th1 era fundamental para bom êxito da gravidez (Piccinni et al., 1998). Sabe-se hoje que este particular comportamento das citocinas na gravidez promove muito mais que proteção imunológica, atuando na regulação direta da sobrevivência trofoblástica (Hanna et al., 2000). Um dos possíveis mecanismos pelo qual as citocinas podem afetar o trofoblasto está na regulação da expressão e / ou funcionamento dos componentes da cascata apoptótica.

Salienta-se que Th1 é citocina pró-inflamatória, como TNF- α e interferon (INF)- γ , podendo determinar apoptose pela indução da expressão de XAF1 (Straszewski-Chavez et al., 2005) ou de Fas (Aschkenazi et al., 2002), nas células do citotrofoblasto, levando ao aumento de caspase-3 (Knofler et al., 2000). Ao revés, a presença de interleucina (IL)-10, citocina anti-inflamatória tipo Th2, pode inibir os efeitos pró-apoptóticos do TNF- α e INF- γ , aumentando expressão de FLIP nas células trofoblásticas (Aschkenazi et al., 2002). De modo interessante, IL-10 parece aumentar produção de FasL no trofoblasto de primeiro trimestre, conferindo proteção imunológica ao feto. Pelo ser, no geral, o trofoblasto no primeiro trimestre resistente à apoptose mediada por Fas, a expressão de FLIP induzida por IL-10 pode proteger / blindar o ovo contra os efeitos autócrinos e parácrinos da secreção de FasL.

6.2 Fatores de crescimento

A exposição ao fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor* – EGF) bloqueia grande variedade de estímulos apoptóticos, incluindo TNF- α e IFN- γ , indutores de apoptose no citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto de placentas de terceiro trimestre, ainda que o mecanismo de sua atuação seja desconhecido (Ho et al., 1999). É sabido, todavia, que a presença de EGF, bem como TNF- α e IFN- γ , não altera a expressão de Bcl-2 (Ho et al., 1999). Outrossim, EGF protege contra apoptose no trofoblasto induzida por ceramida e ácido esfingomielinase, pela diminuição nos níveis de ceramida, um lipídio derivado do segundo mensageiro na via da esfingomielina, associada com a apoptose trofoblástica mediada pelo TNF- α e Fas (Payne et al., 1999). Ademais, o fator básico de crescimento de fibroblasto (*basic fibroblast growth factor* – bFGF) e o fator de crescimento derivado de plaqueta provêm proteção parcial contra TNF- α e IFN- γ , por mecanismo ainda não elucidado (Smith et al., 2002). O fator de crescimento placentário (*placental growth factor* – PIGF) pode proteger as células trofoblásticas da deprivação de soro, pelo aumento da expressão de muitas proteínas anti-apoptóticas, incluindo Bcl-2, Mcl-1 e XIAP, prevenindo ativação da cascata de morte celular (Straszewski-Chavez et al., 2005).

7. Papel dos monócitos / macrófagos na regulação da apoptose trofoblástica

Diferentemente do que se pensava, a apoptose não é o final do processo da morte celular programada. A rápida e efetiva remoção das células apoptóticas pela fagocitose, antes da liberação do conteúdo intracelular para o meio externo, é

fundamental para a prevenção da resposta inflamatória e da lesão tecidual. Não se trata de processo passivo ou neutro, mas ativo e coordenado. Não obstante a prevenção da resposta imune, as células fagocíticas, como os macrófagos, podem afetar o crescimento e a sobrevivência do tecido placentário durante o processo de remoção das células apoptóticas (Abrahams et al., 2004).

7.1 Monócitos / macrófagos e o processo de remoção das células trofoblásticas apoptóticas

Como já fora dito, o predomínio de citocinas anti-inflamatórias sobre as pró-inflamatórias na intimidade intervilosa é crucial para determinar o sucesso ou falha da gravidez (Wegmann et al., 1993). As células imunológicas, notadamente macrófagos, são as fontes primárias de citocinas e fatores de crescimento e podem, por esta razão, contribuir para prover micro-ambiente apropriado na placenta para a manutenção da gravidez (Hunt, 1989).

Os macrófagos constituem aproximadamente 20-30% das células imunológicas presentes no sítio de implantação do zigoto, permanecendo essa concentração elevada durante toda a prenhez (Lessin et al., 1988). Uma vez aninhado o ovo no útero, macrófagos já são detectados, quer na decídua, quer no trofoblasto (Tachi & Tachi, 1986). Ao final do primeiro trimestre da gravidez humana, os macrófagos são observados no estroma, em torno ao trofoblasto extra-viloso, durante a invasão e transformação das arteríolas espiraladas. Se no passado essa densa infiltração de macrófagos representava a resposta imunológica contra a invasão do trofoblasto, hoje está relacionada, demais do

processo imunológico, com funções específicas relacionadas à manutenção da gravidez. Pela proximidade com o trofoblasto, os macrófagos ajudam na remodelação necessária para acomodar a expansão do tecido extra-embriônico (Abrahams et al., 2004).

Durante a gravidez, a quantidade de produtos da apoptose que se desprende do sinciciotrofoblasto para a circulação materna é considerável, notadamente no final da gravidez (Huppertz & Kingdom, 2004). Como já mencionado, as células trofoblásticas exibem antígenos paternos, *non-self* ao sistema imunológico materno. Se houver liberação destes antígenos por ocasião da apoptose trofoblástica, poderá precipitar resposta imunológica, com repercussões ominosas ao conceito. Contudo, com apropriada remoção dos produtos da apoptose do trofoblasto, antes que este conteúdo seja liberado no meio extracelular, prevenir-se-á a rejeição fetal. Sob outra perspectiva, podem também epítopes próprios da mãe, oriundo da apoptose do endotélio ou mesmo da camada músculo-elástica vascular, serem liberados durante o processo de transformação da arteríola espiralada. Embora esses antígenos não promovam incompatibilidade genética, poderão induzir resposta imunológica nefasta ao feto. A remoção dos produtos da apoptose é feita efetivamente pela atuação dos macrófagos teciduais ou dos monócitos da circulação periférica, mediada por resposta antiinflamatória ou imunossupressora.

7.2 Monócitos / macrófagos como indutores de apoptose

Já fora dito que certas citocinas e fatores de crescimento podem promover a sobrevivência do trofoblasto e manter ambiente anti-inflamatório na placenta. Interessante é a capacidade dos monócitos / macrófagos influenciar a apoptose ou sobrevivência celular, mediada pelo alcance da compreensão celular dos sinais apoptóticos. Todavia, os macrófagos presentes na interface materno-fetal são vitais não apenas neste processo, como também para manter a homeostase celular, atuando ativamente na orquestra de vida e morte das células, no processo de remodelamento tecidual (Abrahams et al., 2004).

Foi relatado que células trofoblásticas incubadas sob condições específicas, na presença de macrófagos e poucas células trofoblásticas apoptóticas, expressaram apenas a forma ativa da XIAP, sem exibir caspase-3 ativada. Ao revés, quando estas células trofoblásticas, incubadas sob as mesmas condições, na presença de macrófagos e muitas células trofoblásticas apoptóticas, observou-se o fragmento p30 da XIAP e a ativação da caspase-3 (Mor & Abrahams, 2003). Isso sugere que o excesso de trofoblasto apoptótico estimula macrófagos a produzir fatores pró-apoptóticos que podem promover a morte de células trofoblásticas. Aventa-se que o macrófago facilite a invasão do trofoblasto e a transformação das arteríolas espiraladas pela indução de apoptose no endotélio e na musculatura lisa vascular. Uma das possibilidades na qual o macrófago pode induzir apoptose seria pela liberação de FasL. Os macrófagos, como as células trofoblásticas, contêm suplemento intracelular de FasL e podem liberá-lo uma vez ativado (Abraham et al, 2004 – MOL). Demonstrou-se ainda que a liberação de FasL por macrófagos após a fagocitose de neutrófilos apoptóticos, sugerindo que

macrófagos podem liberar FasL a fim de matar outros neutrófilos na vizinhança trofoblástica. Isso demonstra poderoso mecanismo em que o macrófago pode proteger a invasão trofoblástica contra os neutrófilos ou outros leucócitos potencialmente nocivos ao trofoblasto. Com essa propriedade, os macrófagos podem contribuir para o *status* imunológico privilegiado da gravidez; além de, junto com o trofoblasto, poder induzir apoptose mediada por Fas no endotélio e na musculatura lisa vascular a fim de promover a transformação das arteríolas espiraladas.

8. Conclusão

Embora seja a apoptose mecanismo bioquímico hermético, suas implicações em Obstetrícia são de tal ordem que ultima o conhecimento de seus pormenores por aqueles que militam esta Arte. No centro destas implicações está a placenta, órgão em constante transformação ao longo da gravidez, responsável pela interface materno-fetal, que é sede da apoptose em Obstetrícia. Entender sua bioquímica será fundamental àqueles que se propõem compreender as variáveis da fisiologia da gestação e seus desvios.

9. Referências Bibliográficas

1. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Mor G. The Role of Apoptosis in the Regulation of Trophoblast Survival and Differentiation during Pregnancy. *Endocrine Reviews* 2005; 26: 877-897.
 2. Mayhew TM. Villous trophoblast of human placenta: a coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation. *Histol Histopathol* 2001; 16: 1213-1224.
 3. Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol* 1964; 10: 643-649.
 4. Kiechle FL, Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and chemical implications. *Clinica Chimica Acta* 2002; 326: 27-45.
 5. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
 6. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005; 258: 479-517.
 7. Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 1993; 268: 10932-10937.
 8. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 745-756.
 9. Cheng J, Zhou T, Liu C, et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994; 263:1759–1762.
-

-
10. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 2000; 288: 2351-2354.
 11. Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, et al. FADD/ MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996; 271: 4961-4965.
 12. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85: 817-827.
 13. Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13884-13888.
 14. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; 14: 5579-5588.
 15. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, et al. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 1997; 16: 2794-2804.
 16. Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998; 17: 3237-3245.
 17. Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 2926-2930.
 18. Chen M, Orozco A, Spencer DM, Wang J. Activation of initiator caspases through a stable dimeric intermediate. *J Biol Chem* 2002; 277: 50761-50767.
-

-
19. Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, et al. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med* 1998; 187: 587-600.
 20. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80: 293-299.
 21. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94: 491-501.
 22. Narita M, Shimizu S, Ito T, et al. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14681-14686.
 23. Phillips TA, Ni J, Hunt JS. Death-inducing tumour necrosis factor (TNF) superfamily ligands and receptors are transcribed in human placentae, cytotrophoblasts, placental macrophages and placental cell lines. *Placenta* 2001; 22: 663-672.
 24. Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644: 107-113.
 25. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, et al. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 1996; 184: 1331-1341.
 26. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; 102: 43-53.
 27. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102: 33-42.
-

-
28. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 2001; 8: 613-621.
 29. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 479-489.
 30. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 479-489.
 31. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 684-688.
 32. Sprick MR, Walczak H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644: 125-132.
 33. Pongcharoen S, Searle RF, Bulmer JN. Placental Fas and Fas ligand expression in normal early, term and molar pregnancy. *Placenta* 2004; 25: 321-330.
 34. Hammer A, Dohr G. Expression of Fas-ligand in first trimester and term human placental villi. *J Reprod Immunol* 2000; 46: 83-90.
 35. Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 158-166.
-

-
36. Hammer A, Blaschitz A, Daxbock C, Walcher W, Dohr G. Fas and Fas-ligand are expressed in the uteroplacental unit of first trimester pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41: 41-51.
37. Roh CR, Lee JW, Kang BH, et al. Differential expressions of Fas and Fas ligand in human placenta. *J Korean Med Sci* 2002; 17: 213-216.
38. Aschkenazi S, Straszewski S, Verwer KM, Foellmer H, Rutherford T, Mor G. Differential regulation and function of the fas/fas ligand system in human trophoblast cells. *Biol Reprod* 2002; 66: 1853-1861.
39. Gruslin A, Qiu Q, Tsang BK. X-linked inhibitor of apoptosis protein expression and the regulation of apoptosis during human placental development. *Biol Reprod* 2001; 64: 1264-1272.
40. Uckan D, Steele A, Wang BY, et al. Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 655-662.
41. Balkundi DR, Hanna N, Hileb M, Dougherty J, Sharma S. Labor-associated changes in Fas ligand expression and function in human placenta. *Pediatr Res* 2000; 47: 301-308.
42. Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 55-63.
43. Knofler M, Mosl B, Bauer S, Griesinger G, Husslein P. TNF- α / TNFRI in primary and immortalized first trimester cytotrophoblasts. *Placenta* 2000; 21: 525-535.
-

-
44. Yelavarthi KK, Hunt JS. Analysis of p60 and p80 tumor necrosis factor- α receptor messenger RNA and protein in human placentas. *Am J Pathol* 1993; 143: 1131-1141.
45. Jokhi PP, King A, Loke YW. Cytokine production and cytokine receptor expression by cells of the human first trimester placental-uterine interface. *Cytokine* 1997; 9: 126-137.
46. Ekerfelt C, Lidstrom C, Matthiesen L, Berg G, Sharma S, Ernerudh J. Spontaneous secretion of interleukin-4, interleukin-10 and interferon- α by first trimester decidual mononuclear cells. *Am J Reprod Immunol* 2002; 47: 159-166.
47. Austgulen R, Liabakk NB, Brockhaus M, Espevik T. Soluble TNF receptors in amniotic fluid and in urine from pregnant women. *J Reprod Immunol* 1992; 22: 105-116.
48. Chen L, Liu X, Zhu Y, Cao Y, Sun L, Jin B. Localization and variation of TRAIL and its receptors in human placenta during gestation. *Life Sci* 2004; 74: 1479-1486.
49. Smith SC, Leung TN, To KF, Baker PN. Apoptosis is a rare event in first-trimester placental tissue. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 697-699.
50. Huppertz B, Frank HG, Reister F, Kingdom J, Korr H, Kaufmann P. Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Lab Invest* 1999; 79: 1687-1702.
51. Yusuf K, Smith SD, Sadovsky Y, Nelson DM. Trophoblast differentiation modulates the activity of caspases in primary cultures of term human trophoblasts. *Pediatr Res* 2002; 52: 411-415.
-

-
52. Crocker IP, Barratt S, Kaur M, Baker PN. The in-vitro characterization of induced apoptosis in placental cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts. *Placenta* 2001; 22: 822-830.
53. Irmeler M, Thome M, Hahne M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; 388: 190-195.
54. Kataoka T, Budd RC, Holler N, et al. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF- κ B and Erk signaling pathways. *Curr Biol* 2000; 10: 640-648.
55. Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 2001; 276:20633–20640.
56. Chang DW, Xing Z, Pan Y, et al. c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J* 2002; 21: 3704-3714.
57. Micheau O, Thome M, Schneider P, et al. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 2002; 277: 45162-45171.
58. Adachi S, Cross AR, Babior BM, Gottlieb RA. Bcl-2 and the outer mitochondrial membrane in the inactivation of cytochrome c during Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272: 21878-21882.
59. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22: 8590-8607.
60. Danihel L, Gomolcak P, Korbel M, et al. Expression of proliferation and apoptotic markers in human placenta during pregnancy. *Acta Histochem* 2002; 104: 335-338.
-

-
61. Levy R, Nelson DM. To be, or not to be, that is the question. Apoptosis in human trophoblast. *Placenta* 2000; 21: 1-13.
62. De Falco MDLL, Acanfora F, Cavallotti I, et al. Alteration of the Bcl-2:Bax ratio in the placenta as pregnancy proceeds. *Histochem J* 2001; 33: 421-425.
63. Ratts VS, Tao XJ, Webster CB, et al. Expression of BCL-2, BAX and BAK in the trophoblast layer of the term human placenta: a unique model of apoptosis within a syncytium. *Placenta* 2000; 21: 361-366.
64. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 401-410.
65. Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* 1999; 18: 5242-5251.
66. Ka H, Hunt JS. Temporal and spatial patterns of expression of inhibitors of apoptosis in human placentas. *Am J Pathol* 2003; 163: 413-422.
67. Shiozaki A, Kataoka K, Fujimura M, Yuki H, Sakai M, Saito S. Survivin inhibits apoptosis in cytotrophoblasts. *Placenta* 2003; 24: 65-76.
68. Liston P, Fong WG, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* 2003; 22: 8568-8580.
69. Liston P, Roy N, Tamai K, et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996; 379: 349-353.
70. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997; 388: 300-304.
-

-
71. Sun C, Cai M, Meadows RP, et al. NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J Biol Chem* 2000; 275: 33777-33781.
72. Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, et al. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 1998; 273: 7787-7790.
73. O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, et al. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13103-13107.
74. Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001; 40: 1117-1123.
75. Lehner R, Bobak J, Kim NW, Shroyer AL, Shroyer KR. Localization of telomerase hTERT protein and survivin in placenta: relation to placental development and hydatidiform mole. *Obstet Gynecol* 2001; 97: 965-970.
76. Fong WG, Liston P, Rajcan-Separovic E, St Jean M, Craig C, Korneluk RG. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics* 2000; 70: 113-122.
77. Yang QH, Church-Hajduk R, Ren J, Newton ML, Du C. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* 2003; 17: 1487-1496.
78. Liston P, Fong WG, Kelly NL, et al. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-caspase activity. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 128-133.
79. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14: 353-356.
-

-
80. Piccinni MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med* 1998; 4: 1020-1024.
81. Hanna N, Hanna I, Hleb M, et al. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J Immunol* 2000; 164: 5721-5728.
82. Ho S, Winkler-Lowen B, Morrish DW, Dakour J, Li H, Guilbert LJ. The role of Bcl-2 expression in EGF inhibition of TNF- α / IFN- γ -induced villous trophoblast apoptosis. *Placenta* 1999; 20: 423-430.
83. Payne SG, Brindley DN, Guilbert LJ. Epidermal growth factor inhibits ceramide-induced apoptosis and lowers ceramide levels in primary placental trophoblasts. *J Cell Physiol* 1999; 180: 263-270.
84. Smith S, Francis R, Guilbert L, Baker PN. Growth factor rescue of cytokine mediated trophoblast apoptosis. *Placenta* 2002; 23: 322-330.
85. Abrahams VM, Kim YM, Straszewski SL, Romero R, Mor G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2004; 51: 275-282.
86. Hunt JS. Cytokine networks in the uteroplacental unit: macrophages as pivotal regulatory cells. *J Reprod Immunol* 1989; 16: 1-17.
87. Lessin DL, Hunt JS, King CR, Wood GW. Antigen expression by cells near the maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988; 16: 1-7.
88. Tachi C, Tachi S. Macrophages and implantation. *Ann NY Acad Sci* 1986; 476: 158-182.
-

89. Huppertz B, Kingdom JC. Apoptosis in the trophoblast—role of apoptosis in placental morphogenesis. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11: 353-362.

90. Mor G, Abrahams VM. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 119-126.

Papel da Apoptose em Obstetrícia – Normal e Desvios

1. Introdução

É apoptose morte celular programada, epíteto cunhado por Lockshin & Williams, 1964, em alusão ao grego “queda das folhas das árvores”. Trata-se de mecanismo fisiológico universal entre mamíferos, que regula o equilíbrio entre proliferação e morte celular, a fim de manter a homeostase tecidual (Kiechle & Zhang, 2002).

A apoptose envolve caminhos sinalizadores e micro ambiente super especializados, descrito pormenorizadamente, vez primeira, por Kerr et al., 1972. A similaridade no processo de apoptose entre diferentes espécies e tecidos sugere mecanismo de controle altamente preservado, cujo entendimento é fundamental ao tocólogo, mercê de suas repercussões no desenvolvimento normal da gravidez, bem como na etiopatogenia obstétrica.

A depender do estímulo, a apoptose poderá ser iniciada intrinsecamente por via mitocondrial ou extrinsecamente mediada por receptor de morte ou em resposta a elementos exógenos como citocinas; processos não excludentes, complementares e com ativação cruzada (Fadeel & Orrenius, 2005). Ambas as vias culminam na ativação de cisteína-proteases aspartato específica, apeladas caspases (cysteine – aspartic acid – proteases), encarregadas de mediar a morte celular, por proteólise no resíduo aminoácido aspartato. São descritas 14 enzimas proteolíticas, subdivididas em caspases iniciadoras – 2, 7, 9, 10 e efetoras – 3, 6, 7 (Nunez, 1998). Para contrabalançar esse processo, muitos são os inibidores endógenos da ativação das caspases como as proteínas inibidoras semelhante à

FLICE (caspase 8) – FLIPs, inibidores de apoptose – IAPs e membros da família anti-apoptótica Bcl-2.

Ainda que a apoptose seja fundamental no desenvolvimento placentário normal, sua ação também é arrolada nos desvios do funcionamento placentário. Complicações da gravidez como toxemia, crescimento intra-uterino restrito (CIR), parto pretermo, diabetes gestacional, abortamento, gravidez ectópica e transformação maligna da mola hidatiforme são responsáveis por grande parte das complicações obstétricas e por significativa parcela das causas de morbimortalidade materna e perinatal. No denominador comum dessas doenças está o desconhecimento de sua etiopatogenia e o desenvolvimento / funcionamento placentário anormal (Pardi et al., 1997; Kim et al, 2002; McMaster et al., 2004). Compreender o papel da apoptose nos processos fisiológicos e fisiopatológicos em Obstetrícia será objeto desse artigo.

2. Apoptose na gestação normal

Depende o desenvolvimento placentário normal da capacidade trofoblástica de diferenciação e invasão. Nesse processo, há rápida divisão celular a fim de formar a interface entre mãe e concepto, bem como invadir a decídua e remodelar as arteríolas espiraladas, transformando-as de vasos de resistência para de capacitância, garantido adequado aporte sanguíneo para desenvolvimento do feto (Straszewski-Chavez et al., 2005). Sob essa égide, a placenta apresenta-se como órgão em constante remodelamento tecidual, em que apoptose é processo-chave dessas modificações (Mayhew, 2001), pormenorizadamente a seguir descritos.

2.1 Aposição e adesão do trofoblasto

É na implantação do zigoto à decídua o primeiro papel da apoptose na gestação. O processo de implantação consiste em três fases consecutivas: aposição, adesão e invasão do ovo; estando a apoptose intimamente envolvida nessas situações.

Na aposição, pré-adesão, há interação entre blastocisto e decídua. Galan et al., 2000, demonstraram que a presença de blastocisto reduziu a porcentagem de apoptose de células epiteliais do endométrio humano (CEEh), quando comparado à cultura de CEEh sem blastocisto. Aventaram os autores que o embrião produziria fatores anti-apoptóticos que promoveriam melhores condições de adesão do trofoblasto à decídua.

Uma vez aderido, todavia, importante reação de apoptose é observada ao longo do sítio de implantação, fazendo-se pensar que o trofoblasto tenha atuação apoptótica parácrina no endométrio decidualizado. Decorreria essa ação do sistema Fas/FasL, vez que grande parte da decídua expressa Fas em sua superfície, sendo o FasL produzido pelo trofoblasto.

Por ocasião da invasão do blastocisto, há ligação entre Fas/FasL e conseqüente apoptose, permitindo que o embrião quebre a barreira das CEEh, aninhando-se na intimidade decidual. Na presença de anticorpos bloqueadores anti-Fas, observou-se que adesão e crescimento do trofoblasto eram significativamente reduzidos, em culturas de CEEh com blastocisto de rato, quando comparado com culturas controle sem anti-Fas (Galan et al., 2000).

Recentemente, demonstrou-se que o crescimento trofoblástico era também inibido pela supressão intracelular da via do p38, sugerindo associação entre o p38 e apoptose no CEEh (Li et al., 2003).

2.2 Invasão do trofoblasto extra-viloso e transformação da arteríola espiralada

Pode o trofoblasto ser dividido em duas populações distintas: viloso e extra-viloso. O trofoblasto viloso corresponde às células do citotrofoblasto que se fundem em uma camada de células multinucleadas, o sinciciotrofoblasto, a segunda camada de trofoblasto, em contato direto com a circulação materna (Mayhew, 2001). Já o trofoblasto extra-viloso agrupa população de células do citotrofoblasto especializadas, capazes de invadir a decídua e remodelar os vasos uterinos a fim de estabelecer adequado aporte sanguíneo ao feto. É de hábito subdividir o trofoblasto extra-viloso em linhagem celular intersticial – que invade o interstício ou o miométrio, e endovascular – que se infiltra e modifica as arteríolas espiraladas (Kaufmann et al., 2003). Ainda que as alterações vasculares, observadas na gravidez, iniciem-se independentemente da ação trofoblástica, fazendo parte do rol das modificações no organismo materno, é indubitável que na ausência da invasão trofoblástica, a remodelação vascular fica prejudicada (Ashton et al., 2005).

É sabido que o trofoblasto extra-viloso infiltra as arteríolas espiraladas, migrando através da luz vascular, promovendo verdadeira destruição da camada músculo-elástica desses vasos (Dunk et al., 2003). Faz pouco, tem-se sugerido

que essa transformação vascular é mediada pela indução de apoptose nas células endoteliais da intimidade vascular, desencadeada pela invasão trofoblástica. Foi demonstrado que apenas as arteríolas que exibiam trofoblasto em sua luz apresentavam as modificações endoteliais típicas da gravidez (Cartwright et al., 2002). Nessas arteríolas, ainda foi encontrada a presença de enzima associada à apoptose (poli-ADP-ribose-polimerase). As alterações vasculares, todavia, foram inibidas na presença de múltiplos inibidores de caspases (Ashton et al., 2005).

A apoptose na arteríola espiralada parece ser mediada pelo sistema Fas/FasL, vez que o endotélio expressa Fas e a presença de anticorpos bloqueadores anti-FasL impedem as modificações na musculatura lisa endotelial (Straszewski-Chavez et al., 2005). Defeitos nesse processo podem explicar anomalias na transformação das arteríolas espiraladas, arroladas em complicações obstétricas, como a toxemia gravídica, melhor analisada adiante.

2.3 Tolerância imunológica materna

Meia centúria faz, o feto era considerado aloenxerto que devia evadir-se da resposta imunológica, quisesse lograr êxito (Medawar, 1952). Sabe-se hoje que essa relação é modulada pela tolerância materno-placentária.

Pelo exibir antígenos paternos o trofoblasto, *non-self* ao sistema imunológico da grávida, deveriam ser o trofoblasto e o ovo rejeitados pelo organismo materno. Felizmente não é o que acontece pelo geral. Muitas teorias propõem-se explicar esse privilégio imunológico do ovo: expressão de moléculas de antígeno leucocitário humano (HLA) não clássicas (Loke & King, 2000) e

proteínas de complemento regulatórias (Holmes & Simpson, 1992), deleção de determinados tipos de linfócitos T (Jiang & Vacchio, 1998) e imunossupressão mediada por linfócitos T regulatórios (Aluvihare et al., 2004). De fato, apoptose em leucócitos, notadamente em linfócitos T, tem sido encontrada no espaço intervilo de placentas normais (Hammer et al., 1999) e deleção de linfócitos T é relatada durante a gravidez (Jiang & Vacchio, 1998); demonstrando claramente que o sistema imune materno não é indiferente ao feto, como se pensava em passado recente (Medawar, 1952).

Pelo fato do sistema Fas/FasL ser encarregado de remover os linfócitos T da circulação após a resposta imune, tem-se sugerido que esse mesmo mecanismo esteja envolvido na supressão de células T envolvidas no reconhecimento de antígenos paternos (Straszewski-Chavez et al., 2005). Estudo demonstrou que células trofoblásticas obtidas de placentas de fêmeas de ratos foram capazes de induzir apoptose em células T que expressavam Fas, diferentemente de linfócitos T sem Fas. Ao contrário, em células trofoblásticas purificadas de placentas de fêmeas de ratos que não expressavam FasL (por apresentar doença linfoproliferativa generalizada – homozigose *gld*), não foi observada apoptose na presença de linfócito T Fas + (Jiang & Vacchio, 1998).

De forma interessante, certas linhagens tumorais também expressam FasL, como uma forma de driblar o sistema imune, induzindo apoptose mediada pelo sistema Fas/FasL nas células de defesa que reconheçam o tumor (Gutierrez et al., 1999), processo chamado “contra-ataque Fas” (O’Connell et al., 1999). Foi ainda demonstrado que FasL é expressa no citoplasma de células de câncer de ovário, da mesma forma que em células trofoblásticas do primeiro trimestre. Essas células

podem secretar formas funcionais de FasL envolvidas em microvesículas (Abrahams et al., 2003; Abrahams et al., 2004). Após a ruptura dessas vesículas, FasL é capaz de induzir apoptose em células imunes na gravidez, sugerindo ser esse um dos mecanismos promotores da tolerância materna aos antígenos paternos e da prevenção da rejeição fetal durante gravidez (Abrahams et al., 2004).

2.4 Diferenciação e renovação do trofoblasto viloso

Outra importante função da apoptose durante a gravidez é a regulação do crescimento e renovação da parte vilosa da placenta (Smith et al., 2000). O trofoblasto viloso é estrutura ativa que está em constante renovação celular em um bem orquestrado processo de remodelação tecidual, regido pela apoptose. Contudo, a porcentagem de células trofoblásticas que sofrem apoptose aumenta com o evoluir da gestação, sugerindo que esse processo é regulado pelo desenvolvimento da gravidez, ligado à senescência placentária (Smith et al., 2000). Vigente desvios obstétricos da normalidade, como na toxemia ou no CIR, tem-se observado grande incidência de apoptose no trofoblasto viloso, sugerindo que apropriada regulação da apoptose é importante para o curso de gravidez normal (Smith et al., 1997a; Allaire et al., 2000; Ishihara et al., 2002; Crocker et al., 2003).

Como já mencionado, o trofoblasto viloso é constituído por duas subpopulações: o citotrofoblasto e o sinciotrofoblasto. As células do sinciotrofoblasto não possuem capacidade de proliferação, dependendo do

citotrofoblasto para seu crescimento e renovação celular. Esse processo inicia-se no citotrofoblasto, com diferenciação de suas células, culminando na fusão dessas células diferenciadas com o sinciotrofoblasto. Após a fusão sincicial, um segundo processo de diferenciação ocorre na camada de células mais distal do sinciotrofoblasto, onde cada núcleo envelhecido é colocado dentro de um nó sincicial, expelido pela placenta. Esses nós sinciciais ao caírem na circulação materna, constituirão os êmbolos trofoblásticos, completando assim a renovação do trofoblasto viloso (Mayhew, 2001; Black et al., 2004). Muitos componentes da cascata de apoptose são expressos nesses processos. Estudos recentes mostraram o papel das caspases como importantes mediadoras no processo de diferenciação do citotrofoblasto (Yusuf et al., 2002; Black et al., 2004; Crocker et al., 2004) e na eliminação de núcleos senis do sinciotrofoblasto (Straszewski-Chavez et al., 2005).

3. Apoptose e Complicações na Gravidez

Não obstante muito se tenha evoluído no conhecimento das intercorrências no ciclo gravídico-puerperal, a compreensão da etiopatogenia de muitas doenças conspícuas à gravidez ainda permanece obscura. Em muitas dessas anomalias, como toxemia, CIR, parto pretermo, diabetes gestacional, abortamento, gravidez ectópica e a transformação maligna da mola hidatiforme, desvios nos mecanismos fisiológicos da apoptose são observados e podem ser arrolados na etiopatogenia dessas intercorrências obstétricas. Entender suas correlações deverá interessar não apenas ao pesquisador dessas moléstias, mas aos clínicos que tratam essas

doenças, pelo advir de marcadores e terapêutica moleculares fundamentados na apoptose.

3.1 Apoptose na toxemia gravídica

Ainda que a toxemia gravídica ocorra em 7-10% das gravidezes, é importante causa de obituário materno-perinatal (SOGC, 2008), cuja etiologia repousa obscura, mantendo atual o adágio de Zwiefel (1916) “toxemia é doença das teorias”.

A toxemia gravídica é hoje entendida como doença em dois estágios, iniciada por placentação defeituosa que ocasionará estresse oxidativo e deflagrará as alterações endoteliais responsáveis pelas anomalias clínicas observadas nessa afecção (hipertensão, proteinúria, coagulopatias e lesão hepática). No bojo da disfunção placentária está a ausência da segunda onda de migração do fluxo trofoblástico, impedindo a destruição da capa músculo-elástica da arteríola espiralada do segmento miometrial.

Estudos encontraram níveis elevados de apoptose em placentas de pacientes com toxemia quando comparadas com controles normais (Allaire et al., 2000; Ishihara et al., 2002). Já dissemos que a apoptose na arteríola espiralada parece ser mediada pelo sistema Fas/FasL (Straszewski-Chavez et al., 2005). Normalmente, FasL expresso no trofoblasto induz apoptose nos linfócitos T circulantes, permitindo que o trofoblasto endovascular penetre na intimidade endotelial da arteríola espiralada, sem ativação de resposta imunológica à presença do aloenxerto. Já a expressão de Fas no trofoblasto extra-viloso

determina que o linfócito T, que expressa FasL, induza apoptose no citotrofoblasto, a fim de regular o grau de invasão miometrial. Nos casos de maior expressão de Fas no trofoblasto, há apoptose acentuada do citotrofoblasto, que será incapaz de migrar pelas arteríolas espiraladas e promover as transformações vasculares necessárias ao maior aporte sanguíneo na gravidez, determinando alterações endoteliais típicas de estresse oxidativo (Allaire et al., 2000). Acentua a ação do sistema Fas/FasL os níveis diminuídos da proteína Bcl-2, que inibe a apoptose, como encontrado nas placentas de pacientes com toxemia (Ishihara et al., 2002).

O excesso de macrófago ao redor e dentro da parede das arteríolas espiraladas que não receberam a migração trofoblástica também foi observado em pacientes com pré-eclampsia. Ainda que sua presença não possa ser explicada, esses macrófagos liberavam citocinas, notadamente fator de necrose tumoral (TNF)- α , capazes de induzir apoptose mediada pela via do receptor 1 do TNF, presente apenas no citotrofoblasto, fortalecendo a anomalia placentária (Reister et al., 2001).

Uma vez ausente adequado suporte sanguíneo placentário, o estresse oxidativo vai promover aumento na expressão de TNF, que pode estar envolvida na ativação de macrófagos e lesões ateroscleróticas.

Níveis elevados de apoptose na pré-eclampsia também estão arrolados no colapso da integridade vilosa, determinando maior deportação de fragmento de sincitiotrofoblasto para a corrente sanguínea materna (Hung et al., 2002), que concorrerá para ativação endotelial e suas nefastas conseqüências clínicas.

3.2 Apoptose e crescimento intra-uterino restrito

Refere-se o CIR à condição de incapacidade do feto alcançar seu potencial de crescimento genético, exposto a ambiente uterino desfavorável, cursando com elevado risco para morte perinatal. A fisiopatogenia do CIR é, em muitos casos, atribuída à má perfusão placentária, gerando anóxia fetal. De certo que toxemia, tabagismo e anemia grave podem determinar essa anomalia, mas a disfunção placentária ocupa espaço central nessa doença.

De há muito foi relatado que placentas das pacientes com fetos que apresentavam CIR manifestavam apoptose exacerbada, quando comparadas a placentas de pacientes com gravidez normal (Smith et al., 1997b; Levy et al. 2002; Ishihara et al., 2002). Demonstrou-se que hipóxia induzia apoptose em cultura de trofoblasto humano, tanto pelo aumento de fatores pró-apoptóticos como a proteína p53 e Bax, quanto pela diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 (Levy et al., 2000), ainda que *in vivo* apenas níveis elevados de p53 fossem encontrados (Levy et al., 2002). Foi ainda encontrada intensa atuação do sistema Fas/FasL, bem como presença discreta de FasL na decídua de pacientes com fetos apresentando CIR, indicando redução no privilégio imunológico dessa região e conseqüente acentuação da apoptose (Eide et al., 2007).

Esse aumento da apoptose, determinando redução da massa trofoblástica disponível para regular as trocas materno-fetais, pode contribuir para disfunção placentária e culminar com CIR.

3.3 Apoptose e parto pretermo

Parto pretermo é aquele que se antecipa à 37^a semana de gravidez, causando importante repercussão na morbi-mortalidade perinatal e mobilizando considerável recurso hospitalar para garantir a sobrevivência do prematuro. Ainda que cerca de 25% destes partos ocorram após infecção da cavidade amniótica, mais de 60% deles permanecem com etiologia desconhecida (Romero et al., 2007).

Mesmo na ausência de infecção, citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF parecem atuar de modo crucial na ativação do útero quiescente. Essas citocinas estimulam a produção de proteínas de ativação uterina, como a prostaglandina, notadamente a PGF2 α , metaloproteinases da matriz (MMP) e receptores de ocitocina. Caberá ao TNF estimular expressão de ciclo-oxigenase-2 trofoblástica, a produzir prostaglandina, ativando MMP, notadamente as tipo 2 e 9, encarregadas de promover degradação da matriz extracelular da membrana corio-amniótica (Imseis et al., 1997). *In vivo*, experimentos com macacos fêmeas mostraram que injeção de TNF e IL-1 β foi capaz de deflagrar trabalho de parto pretermo (Sadowsky et al., 2006), mesmo ausente infecção.

Outros marcadores de apoptose também parecem estar envolvidos no parto pretermo, como Bcl-2, fator anti-apoptótico, cuja expressão diminuída esteve significativamente marcada em placentas no pré-termo, quando comparadas às daquelas do termo (Daher et al., 2008).

Outrossim, causa importante de parto pretermo repousa na rotura prematura de membranas pretermo (RPMP), intimamente relacionada com ativação das MMP e degradação da membrana, deflagrada pela apoptose.

Fortunato et al. (2000) sugerem que o principal fator indutor da apoptose nos casos de RPMP é o lipossacarídeo das bactérias gram-negativas, que estimula o TNF- α e inicia cascata apoptótica, atribuindo à infecção papel fundamental nesses casos. Independente da causa, parece haver consenso de que apoptose está aumentada nos casos de RPMP (Tanir et al., 2005; George et al., 2008).

3.4 Apoptose e diabetes gestacional

Diabetes gestacional é desordem confinada à gravidez, caracterizada por elevada resistência insulínica periférica, a conta da ação do lactogênio placentário humano, cuja ação se faz notar entre 24-28 semanas de gravidez. Esse estado hiperglicêmico inibe a proliferação trofoblástica através da modulação da atividade mitocondrial (Moley, 2001).

Sgarbosa et al. (2006), ao comparar incidência de apoptose em placentas de pacientes normoglicêmicas, com hiperglicemia diária e com diabetes gestacional, encontrou níveis significativamente elevados de morte celular programada nas placentas das pacientes com diabetes gestacional, bem como níveis diminuídos de Bcl-2, fator anti-apoptótico. Aventou Moley (2001) que a hiperglicemia elevaria o p53, promovendo a via apoptótica mitocondrial, bem como diminuiria a expressão dos transportadores de glicose, GLUT 1, 2 e 3, gerando estresse oxidativo induzido pela deprivação celular de glicose, deflagrando liberação de Bax e ativação de caspases (Huppertz & Kaufmann, 1999).

3.5 Apoptose e abortamento

A reprodução humana é processo extremamente ineficiente quando comparada a outros mamíferos. Cerca de 70% das gravidezes são perdidas antes de alcançar 12 semanas, 85% em falha de implantação e 15% em abortamento clínico (Macklon et al., 2002). Ainda que muitas causas sejam aventadas para o abortamento: genéticas, imunológicas, anatômicas, hormonais e infecciosas, em grande número de casos a etiologia permanece desconhecida. Parece que esses abortos cursam com limitada invasão do trofoblasto extra-viloso, resultando em adesão incompleta nas arteríolas espiraladas durante as primeiras semanas de gravidez (Jauniaux & Burton, 2005). Essas alterações promovem estresse oxidativo em época que as defesas antioxidantes da placenta são inadequadas, resultando em anomalia no desenvolvimento placentário e abortamento (Hempstock et al., 2003).

Minasi et al. (2007) encontraram associação entre abortamento em humanos e presença de FasL nos linfócitos decíduais, aumento da expressão de Fas no trofoblasto extra-viloso e níveis elevados de apoptose no trofoblasto intersticial. Propuseram que esses fenômenos eram mediados pelo neuropeptídeo hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e seu principal receptor, urocortina, capazes de potencializar os efeitos citotóxicos do FasL dos linfócitos decíduais contra as células do trofoblasto extra-viloso que expressam Fas.

O papel dos desvios da apoptose parece ser mais marcante ainda em se tratando de abortamento de repetição. Nesses casos há aumento de citocinas T helper (Th) 1 e diminuição das Th2. A expressão de citocinas pró-inflamatórias

(Th1) como TNF e IL-1 favorecem o ovo durante período pré-implantacional e nas primeiras semanas de gestação (Thathiah et al., 2004). A gravidez, contudo, está associada ao decréscimo nos níveis de Th1 e elevação das citocinas Th2, de natureza anti-inflamatória, importantes para reduzir rejeição do aloenxerto fetal. Havendo liberação exagerada de citocinas Th1, o equilíbrio entre as citocinas Th1 / Th2 é quebrado e processo de abortamento, induzido por apoptose, pode ser desencadeado. Pode motivar essa situação processo infeccioso (Leroy et al., 2007), pela limitada secreção de HLA-G pelo trofoblasto ou ainda pela inexpressiva presença de células NK na decídua (Christiansen et al., 2006).

Fato é que são observados níveis 40 a 70% mais elevados de TNF e interferon (INF) γ em placentas de pacientes com abortamento do que nas de controle (Shaarawy et al., 1997), bem como níveis reduzidos de receptores de TNF solúveis (Chernyshov et al., 2005). Auspicioso trabalho encontrou melhora nos resultados perinatais entre mulheres com abortamento de repetição tratadas com inibidores do TNF (Winger et al., 2008), apontando para perspectivas terapêuticas em futuro breve.

3.6 Apoptose e gravidez ectópica

A prenhez ectópica, 95% das vezes tubária, tumultua cerca de 1% das gravidezes, não raro evoluindo para rotura e abdome agudo. Na gravidez tubária, o ovo penetra seu epitélio, aninhando-se na camada muscular, ausente a submucosa nesse órgão. Há reação decidual na tuba, ainda que mínima quando comparada ao endométrio. O embrião frequentemente não subsiste, sendo

arrolada a apoptose do sinciciotrofoblasto como causa importante para esse decesso. De fato, parece que na ausência da decídua, e do *status* imunológico privilegiado inerente à decidualização, o sinciciotrofoblasto sofre morte celular, não mais provendo nutrição ao ovo e impedindo seu desenvolvimento (Kokawa et al., 1998).

Analisando-se o comportamento trofoblástico na gravidez tubária, observou-se uma diminuição no índice apoptótico (Kokawa et al., 1998). Sugeriu-se que a capacidade mais agressiva de invadir a camada muscular da tuba, levando à sua rotura, é conseqüente à ilimitada capacidade de proliferação trofoblástica e ausência da regulação apoptótica. Tem-se atribuído à elevada expressão de Bcl-2, proteína anti-apoptótica, no sinciciotrofoblasto, causa predisponente ao acidente hemorrágico da gravidez ectópica (Kucera et al., 2001). Arrolaram esses autores a possibilidade do Bcl-2 inclusive servir de marcador de risco para discriminar os casos de maior gravidade para a rotura tubária.

Recente trabalho incriminou o citrato de clomifeno, em uso prolongado, com gravidez tubária (Shao et al., 2009). Esse medicamento, a basto utilizado em reprodução assistida, é capaz, em altas doses, de induzir apoptose em células ciliares ístmicas de ratos fêmeas, bem como diminuir a velocidade de transporte do ovo na tuba uterina, levando à gravidez ectópica. Em humanos esse medicamento não é indene, já conhecida sua associação com gravidez tubária (Khong & Dimitry, 2005).

3.7 Apoptose e doença trofoblástica gestacional

Doença trofoblástica gestacional (DTG) é blastoma que se origina do tecido de revestimento das vilosidades coriais, que se exhibe sob formas clínicas benignas (mola hidatiforme – parcial e completa) e malignas (mola invasora, coriocarcinoma e tumor trofoblástico do sítio placentário), caracterizando a neoplasia trofoblástica gestacional – NTG (Berkowitz & Goldstein, 2009). A presença invulgar de marcador biológico-tumoral, gonadotrofina coriônica – hCG, irá indiciar a remissão espontânea da DTG ou sua progressão para NTG (Delmanto et al., 2007), que ocorre em 5% das molas parciais e 20% das molas completas, em que se faz necessária quimioterapia para promover a cura das pacientes.

Antever o desfecho da mola hidatiforme preocupa aqueles que lidam com esta anomalia trofoblástica. Advogam que conhecer as pacientes com mola hidatiforme que vão cursar com NTG significaria instaurar segmento pós-molar mais sistemático a fim de despistar a transformação maligna. Os entusiastas da quimioterapia profilática argumentam que se houvesse método sensível e específico no rastreio prognóstico das pacientes que iriam evoluir para NTG, essas poderiam ser candidatas à quimioprofilaxia (Uberti et al. 2006). Por outro lado, conhecer as pacientes com probabilidade mínima de cursar com DTG persistente permitiria acompanhamento mais espraído e alta precoce, diminuindo a angústia do seguimento e seu custo hospitalar (Kohorn, 2003; Batorfi et al., 2004).

Exceto a avaliação seriada da hCG, muitos parâmetros falharam em predizer o desenvolvimento de NTG pós-molar. A morfologia histológica do

trofoblasto (Genest et al., 1991) e a avaliação citométrica de sua ploidia (van-de-Kaa et al., 1996) forneceram predição limitada da transformação maligna da mola hidatiforme. Outros estudos que avaliaram marcadores de proliferação celular (Cheung et al., 1993; Jeffers et al., 1996) como o antígeno nuclear de proliferação celular (*proliferating cell nuclear antigen* – PCNA) e o antígeno ki-67 (Cheung et al., 1994), bem como vários oncogenes (p53, mdm2, p21_{WAF1/CIP1} e bcl-2), foram incapazes de antever as molas hidatiformes que iriam progredir para NTG (Cheung et al., 1998; Cheung et al., 1999; Wong et al., 1999).

Poucos trabalhos na literatura analisam o papel da apoptose no prognóstico da mola hidatiforme. Wong et al (1999) foram pioneiros em demonstrar que o índice apoptótico esteve elevado nos casos de remissão espontânea da mola hidatiforme, indiciando que a apoptose poderá fornecer valor prognóstico à mola hidatiforme.

Utilizando-se do anticorpo monoclonal M30 CythoDeath, capaz de detectar o sítio de clivagem da caspase 3 e 7 na citoqueratina 18, Chiu et al. (2001) observaram que a média do índice apoptótico era maior nas molas hidatiformes e coriocarcinomas do que nas placentas normais e nos abortos. Concluíram que quanto menor a presença do M30 na mola hidatiforme, maior a incidência de transformação maligna do trofoblasto.

Harma et al. (2005) estudaram a presença de caspase 3 e cotejaram seu valor prognóstico na mola completa e na NTG. Analisaram 3 pacientes com mola completa, 2 pacientes com NTG e 3 placentas obtidas após o parto de gravidezes normais de mulheres saudáveis, como grupo de comparação. Os resultados mostraram níveis elevados de caspase 3 na DTG / NTG, quando cotejado ao

grupo de comparação. Concluíram os autores, de forma diversa aos trabalhos anteriores, que níveis baixos de caspase 3 foram mais freqüentes nas molas hidatiformes que nas NTG. Ainda assim, ressaltaram que mais estudos devam ser realizados, com casuística mais encorpada, para que conclusões mais sólidas possam ser obtidas.

Fong et al. (2006), analisaram a onco-expressão de caspases 8 e 10 em linhagens de células de coriocarcinoma e placentas normais de primeiro trimestre. Observaram que estas caspases tiveram presença diminuída nos coriocarcinomas em relação a outros tecidos trofoblásticos.

4. Conclusão

Como visto, o papel da apoptose em Obstetrícia é essencial para o desenvolvimento normal da gestação, bem como intimamente ligada à doenças da puerperalidade, vigente desvios no hermético processo de morte celular programada. Compreender esses pormenores será de valia àqueles ligados à pesquisa na área básica em Tocologia, vislumbradas aqui inúmeras possibilidades para investigações futuras. Não obstante, esse conhecimento deverá ainda fazer parte das ferramentas do obstetra ligado à assistência, mercê da rápida incorporação de novas tecnologias na rotina médica e das perspectivas alvissareiras, prognósticas e terapêuticas, que a apoptose traz para a Obstetrícia.

5. Referências Bibliográficas

1. Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol* 1964; 10: 643-649.
 2. Kiechle FL, Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and chemical implications. *Clinica Chimica Acta* 2002; 326: 27-45.
 3. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
 4. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005; 258: 479-517.
 5. Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998; 17: 3237-45.
 6. Pardi G, Marconi AM, Cetin I. Pathophysiology of intrauterine growth retardation: role of the placenta. *Acta Paediatr Suppl* 1997; 423: 170-2.
 7. Kim YM, Chaiworapongsa T, Gomez R, Bujold E, Yoon BH, Rotmensch S, Thaler HT, Romero R. Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in the placental bed in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 1137-42.
 8. McMaster MT, Zhou Y, Fisher SJ. Abnormal placentation and the syndrome of preeclampsia. *Semin Nephrol* 2004; 24: 540-7.
 9. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Mor G. The Role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocrine Reviews* 2005; 26: 877-97.
-

-
10. Mayhew TM. Villous trophoblast of human placenta: a coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation. *Histol Histopathol* 2001; 16: 1213-24.
 11. Galan A, O'Connor JE, Valbuena D, et al. The human blastocyst regulates endometrial epithelial apoptosis in embryonic adhesion. *Biol Reprod* 2000; 63: 430-9.
 12. Li HY, Chang SP, Yuan CC, Chao HT, Ng HT, Sung YJ. Induction of p38 mitogen-activated protein kinase-mediated apoptosis is involved in outgrowth of trophoblast cells on endometrial epithelial cells in a model of human trophoblastendometrial interactions. *Biol Reprod* 2003; 69: 1515-24.
 13. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003; 69: 1-7.
 14. Ashton SV, Whitley GS, Dash PR, et al. Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 102-8.
 15. Dunk C, Petkovic L, Baczyk D, Rossant J, Winterhager E, Lye S. A novel in vitro model of trophoblast-mediated decidual blood vessel remodeling. *Lab Invest* 2003; 83: 1821-8.
 16. Cartwright JE, Kenny LC, Dash PR, et al. Trophoblast invasion of spiral arteries: a novel in vitro model. *Placenta* 2002; 23: 232-5.
 17. Medawar P. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol* 1952; 7: 320-38.
-

-
18. Loke YW, King A. Immunology of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14: 827-37.
 19. Holmes CH, Simpson KL. Complement and pregnancy: new insights into the immunobiology of the fetomaternal relationship. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1992; 6: 439-60.
 20. Jiang SP, Vacchio MS. Multiple mechanisms of peripheral T cell tolerance to the fetal "allograft". *J Immunol* 1998; 160: 3086-90.
 21. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 2004; 5: 266-71.
 22. Hammer A, Blaschitz A, Daxböck C, Walcher W, Dohr G. Fas and Fas-ligand are expressed in the uteroplacental unit of firsttrimester pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41: 41-51.
 23. Gutierrez LS, Eliza M, Niven-Fairchild T, Naftolin F, Mor G. The Fas/Fas ligand system: a mechanism for immune evasion in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 54: 245-53.
 24. O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege. *Immunol Today* 1999; 20: 46-52.
 25. Abrahams VM, Straszewski SL, Kamsteeg M, et al. Epithelial ovarian cancer cells secrete functional Fas ligand. *Cancer Res* 2003; 63: 5573-81.
 26. Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S, Mor G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 55-63.
-

-
27. Smith SC, Leung TN, To KF, Baker PN. Apoptosis is a rare event in first trimester placental tissue. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 697-9.
28. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997a; 177: 57-65.
29. Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 271-6.
30. Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 158-66.
31. Crocker IP, Cooper S, Ong SC, Baker PN. Differences in apoptotic susceptibility of cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts in normal pregnancy to those complicated with preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Pathol* 2003; 162: 637-43.
32. Black S, Kadyrov M, Kaufmann P, Ugele B, Emans N, Huppertz B. Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ* 2004; 11: 90-8.
33. Yusuf K, Smith SD, Sadovsky Y, Nelson DM. Trophoblast differentiation modulates the activity of caspases in primary cultures of term human trophoblasts. *Pediatr Res* 2002; 52: 411-5.
34. Crocker IP, Tansinda DM, Jones CJ, Baker PN. The influence of oxygen and tumor necrosis factor-alpha on the cellular kinetics of term placental villous explants in culture. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 749-57.
-

-
35. SOGC. Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy. *J Obstet Gynecol Can* 2008; 30: S1-S52.
 36. Zweifel P. Eklampsie. In *Handbuch der Geburtshilfe*. ed. Dederlein A. Wiesbade: Bergmann.1916. vol 2, pp 672-723.
 37. Reister F, Frank HG, Kingdom JCP, et al. Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women. *Lab Invest* 2001, 81: 1143-52.
 38. Hung TH, Skepper JN, Charnock-Jones DS, Burton GJ. A potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preeclampsia. *Circul Resear* 2002; 90: 1274-81.
 39. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1997b; 177: 1395-401.
 40. Levy R, Smith SD, Yusuf K, et al. Trophoblast apoptosis from pregnancies complicated by fetal growth restriction is associated with enhanced p53 expression. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186:1056-61.
 41. Levy R, Smith SD, Chandler K, Sadovsky Y, Nelson DM. Apoptosis in human cultured trophoblasts is enhanced by hypoxia and diminished by epidermal growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278: C982-8.
 42. Eide IP, Isaksen CV, Salvasen KA, et al. Fetal growth restriction is associated with reduced FasL expression by decidual cells. *J Reprod Immunol* 2007; 74: 7-14.
 43. Romero R, Gotsch F, Pineles B, Kusanovic JP. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. *Nutr Rev* 2007; 65: S194–S202.
-

-
44. Imseis HM, Zimmerman PD, Samuels P, Kniss DA. Tumour necrosis factor- α induces cyclo-oxygenase-2 gene expression in first trimester trophoblasts: suppression by glucocorticoids and NSAIDs. *Placenta* 1997; 18: 521-6.
45. Sadowsky DW, Adams KM, Gravett MG, Witkin SS, Novy MJ. Preterm labor is induced by intraamniotic infusions of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α but not by interleukin-6 or interleukin-8 in a nonhuman primate model. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 1578-89.
46. Daher S, Guimarães AJ, Mattar R, Ishigai MMS, Barreiro EG, Bevilacqua E. Bcl-2 and Bax Expressions in Pre-Term, Term and Post-Term. *Am J Reprod Immunol* 2008; 60: 172-8.
47. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Amniochorion gelatinase-gelatinase inhibitor imbalance in vitro: a possible infectious pathway to rupture. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 240-4.
48. Tanir MH, Sener T, Kaytaz SAB, Ozen FSMME. Programmed cell death (apoptosis) in placentas from normal pregnancy and pregnancy complicated by term (t) and preterm (p) premature rupture of membranes (PROM). *Arch Gynecol Obstet* 2005; 273: 98-103.
49. George RB, Kalich J, Yonish B, Murtha AP. Apoptosis in the chorion of fetal membranes in preterm premature rupture of membranes. *Am J Perinatol* 2008; 25: 29-32.
50. Moley KH. Hyperglycemia and apoptosis: mechanisms for congenital malformations and pregnancy loss in diabetic women. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 141: 78-82.
-

-
51. Sgarbosa F, Barbisan LF, Basil MAM, et al. Changes in apoptosis and Bcl-2 expression in human hyperglycemic, term placental trophoblast. *Diab Resear Clin Pract* 2006; 73: 143-9.
52. Huppertz B, Kaufmann P. The apoptosis cascade in human villous trophoblast. *Troph. Res* 1999; 13: 215-42.
53. Macklon NS, Geraedts JP, Fauser BC. Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 333-43.
54. Jauniaux E, Burton GJ. Pathophysiology of histological changes in early pregnancy loss. *Placenta* 2005; 26: 114-23.
55. Hempstock J, Jauniaux E, Greenwold N, Burton GJ. The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure. *Hum Pathol* 2003; 34: 1265-75.
56. Minasi V, Jescheke U, Kalantaridou SN, et al. Abortion is associated with increased expression of FasL in decidual leukocytes and apoptosis of extravillous trophoblasts: a role for CRH and urocortin. *Mol Hum Reprod* 2007; 13: 663-73.
57. Thathiah A, Brayman M, Dharmaraj N, Julian JJ, Lagow EL, Carson DD. Tumor necrosis factor alpha stimulates MUC1 synthesis and ectodomain release in a human uterine epithelial cell line. *Endocrinology* 2004; 145: 4192-203.
58. Leroy MJ, Dallot E, Czerkiewicz I, Schmitz T, Breuiller-Fouche M. Inflammation of choriodecidua induces tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of human myometrial cells. *Biol Reprod* 2007; 76: 769-76.
59. Christiansen OB, Nielsen HS, Kolte AM. Inflammation and miscarriage. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006; 11: 302-8.
-

-
60. Shaarawy M, Nagui AR. Enhanced expression of cytokines may play a fundamental role in the mechanisms of immunologically mediated recurrent spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 76: 205-11.
61. Chernyshov VP, Vodyanik MA, Pisareva SP. Lack of soluble TNF-receptors in women with recurrent spontaneous abortion and possibility for its correction. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54: 284-91.
62. Winger EE, Reed JL. Treatment with tumor necrosis factor inhibitors and intravenous immunoglobulin improves live birth rates in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 2008; 60: 8-16.
63. Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in human chorionic villi and decidua in normal and ectopic pregnancy. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 87-91.
64. Kucera E, König F, Tangl S, Grossschmidt K, Kainz C, Sliutz G. Bcl-2 expression as a novel immunohistochemical marker for ruptured tubal ectopic pregnancy. *Hum Reprod* 2001; 16: 1286-90.
65. Shao R, Nutu M, Weijdegard B. Clomiphene citrate causes aberrant tubal apoptosis and estrogen receptor activation in rat fallopian tube: implications for tubal ectopic pregnancy. *Biol Reprod* 2009, in press.
66. Khong SY, Dimitry ED. Bilateral tubal ectopic pregnancy after clomiphene induction. *J Obstet Gynaecol* 2005; 25: 611-612.
67. Berkowitz RS, Goldstein DP. Current management of gestational trophoblastic diseases *Gynecol Oncol* 2009; 112: 654-62.
68. Delmanto LRMG, Maestá I, Braga Neto AR, et al. A curva de regressão da gonadotrofina coriônica humana é útil no diagnóstico precoce da neoplasia trofoblástica gestacional pós-molar? *Rev Bras Ginec Obstet.* 2007; 29: 506-10.
-

-
69. Uberti EM, Diestel MC, Guimaraes FE, De Napoli G, Schmid H. Single-dose actinomycin D: Efficacy in the prophylaxis of postmolar gestational trophoblastic neoplasia in adolescents with high-risk hydatidiform mole. *Gynecol Oncol* 2006; 102: 325-32.
70. Kohorn EI. Human chorionic gonadotropin follow-up in patients with molar pregnancy: a time for reevaluation. *Obstet Gynecol* 2003; 102: 1417.
71. Batorfi J, Vegh G, Szepesi J, Szigetvari I, Doszpod J, Fulop V. How long should patients be followed after molar pregnancy? Analysis of serum hCG follow-up data. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 112: 95-7.
72. Genest DR, Laborde O, Berkowitz RS et al. A clinicopathologic study of 153 cases of complete hydatidiform mole (1980-90) histologic grade lacks prognostic significance. *Obstet Gynaecol* 1991; 78: 402-9.
73. van-de-Kaa CA, Schijf CP, de-Wilde PC, et al. Persistent gestational trophoblastic disease: DNA image cytometry and interphase cytogenetics have limited predictive value. *Mod Pathol* 1996; 9: 1007-14.
74. Cheung AN, Ngan HY, Chen WZ, Loke SL, Collins RJ. The significance of proliferating cell nuclear antigen in human trophoblastic disease: an immunohistochemical study. *Histopathology* 1993; 22: 565-8.
75. Jeffers MD, Richmond JA, Smith R. Trophoblast proliferation rate does not predict progression to persistent gestational trophoblastic disease in complete hydatidiform mole. *Int J Gynaecol Pathol* 1996; 15: 34-8.
76. Cheung ANY, Ngan HYS, Collins RJ, Wong YL. Assessment of cell proliferation in hydatidiform mole using monoclonal antibody MIB1 to Ki-67 antigen. *J Clin Pathol* 1994; 47: 601-4.
-

-
77. Cheung ANY, Shen DH, Khoo US, Wong LC, Ngan HYS. p21WAF1/CIP1 expression in gestational trophoblastic disease: correlation with clinicopathological parameters and Ki67 and p53 gene expression. *J Clin Pathol* 1998; 51: 159-62.
78. Cheung ANY, Shen DH, Khoo US, et al. Immunohistochemical and mutational analysis of p53 tumour suppressor gene in gestational trophoblastic disease - correlation with mdm2, proliferation index and clinicopathological parameters. *Int J Gynaecol Cancer* 1999; 9: 123-30.
79. Wong SYY, Ngan HYS, Chan CCW, Cheung ANY. Apoptosis in gestational trophoblastic disease - correlated with clinical outcome and bcl-2 expression but not bax expression. *Mod Pathol* 1999; 12: 1025-33.
80. Chiu PM, Ngan YS, Khoo US, Cheung AN. Apoptotic activity in gestational trophoblastic disease correlates with clinical outcome: assessment by the caspase-related M30 CytoDeath antibody. *Histopathology* 2001; 38: 243-9.
81. Harma MI, Harma M, Dilsiz N. Western blot determination of caspase-3 apoptotic activity in complete hydatidiform mole and persistent trophoblastic disease. *J Turkish German Gynecol Assoc* 2005; 6: 226-8.
82. Fong PY, Xue WC, Ngan HY, et al. Caspase activity is downregulated in choriocarcinoma: a cDNA array differential expression study. *J Clin Pathol* 2006; 59: 179-83.
-

**Influência do Índice Apoptótico e da Imuno-Expressão
da Survivina no Prognóstico de Pacientes com
Mola Hidatiforme Completa**

Influência do índice apoptótico e da imuno-expressão da survivina no prognóstico de pacientes com mola hidatiforme completa

Resumo

Objetivo. Avaliar a influência do índice apoptótico e da imuno-expressão da survivina em tecido molar no prognóstico e tratamento de pacientes com mola hidatiforme completa (MHC).

Métodos. Estudo observacional, retrospectivo, incluindo 78 pacientes com MHC diagnosticadas, tratadas e acompanhadas no Centro de Doenças Trofoblásticas de Botucatu/SP, Brasil, entre 1995 e 2006. Baseado nas curvas de regressão da gonadotrofina coriônica, as pacientes foram divididas em dois grupos: remissão espontânea (MHC-RE - 59 pacientes) e evolução para NTG pós-molar (MHC-NTG - 19 pacientes). Avaliação imunohistoquímica do trofoblasto viloso foi realizada pela técnica da avidina-biotina-peroxidase, usando dois marcadores: anticorpo policlonal anti-caspase-3 (diluição 1:200; *Cell Signaling Technology*®; TX, USA) e anticorpo monoclonal anti-survivina (clone 5E8; diluição 1:100; *Neomarkers*®, TX, USA). O índice apoptótico foi expresso em porcentual (número de células caspase-3 positivas / número de células contadas x 100). A imuno-expressão da survivina foi determinada por um método semi-quantitativo.

Resultados. Foi significativo o efeito do índice apoptótico sobre a evolução de pacientes com MHC, de tal modo que, o aumento de 1 unidade no índice apoptótico reduziu, em média, 61% a chance de desenvolvimento de NTG pós-molar (OR = 0,61, 95% IC: 0,45-0,84). Nenhuma influência significativa da imuno-expressão da survivina foi observada no desenvolvimento de NTG pós-molar ($p > 0,01$; teste exato de Fisher). Não foi possível estabelecer correlações entre efeito do índice apoptótico e da imuno-expressão da survivina e variáveis do tratamento.

Conclusão. Nesse estudo, o índice apoptótico foi bom preditor do desenvolvimento de NTG depois de MHC, com potencial para ser usado como biomarcador prognóstico dessa doença. Ao contrário, a imuno-expressão da survivina no trofoblasto viloso não influenciou a evolução da MHC para NTG pós-molar.

Influence of the apoptotic index and survivin immuno-expression on the prognosis of patients with complete hydatidiform mole

Abstract

Objective. To assess the influence of the apoptotic index and survivin expression of molar tissue on the prognosis and treatment of patients with complete hydatidiform mole (CHM).

Methods. This retrospective observational study included 78 patients with CHM, who were diagnosed, treated and followed up in the Center of Trophoblastic Diseases, Botucatu/SP, Brazil, between 1995 and 2006. Based on chorionic gonadotrophin regression curves, patients were divided into two groups: spontaneous remission (CHM-RE - 59 patients) and post-molar GTN (CHM-NTG - 19 patients). Immunohistochemical analysis of the villous trophoblast was performed by avidin-biotin-peroxidase, using anti-caspase-3 polyclonal antibodies (1:200; *Cell Signaling Technology*®; TX, USA) and anti-survivin monoclonal antibodies (clone 5E8; 1:100; *Neomarkers*®, TX, USA). The apoptotic index was expressed in percent (number of caspase-3-positive cells / number of cells counted x 100). Survivin immuno-expression was determined by a semiquantitative method.

Results. The influence of the apoptotic index on the prognosis of patients with CHM was significant. A 1-unit increase in the apoptotic index represented an average 61% reduction in the chance of developing post-molar GTN (OR = 0.61, 95% CI: 0.45-0.84). No significant influence of survivin immuno-expression was observed on the development of post-molar GTN ($p > 0.01$; Fisher's exact test). No correlations of treatment variables with apoptotic index or survivin immuno-expression were found.

Conclusion. In this study, the apoptotic index was a good predictor of GTN development after CHM and may be a useful prognostic biomarker of this disease. On the other hand, survivin immuno-expression in the villous trophoblast had no influence on the development of post-molar GTN.

1. Introdução

Mola hidatiforme completa (MHC) é blastoma oriundo de contrafação reprodutiva, caracterizada por fertilização partenogênica do ovo, que se apresenta com vilosidades hidrópicas difusas, hiperplasia marcada e ausência de vasos (Berkowitz & Goldstein, 2009). Ainda que 85% dessas pacientes evoluam para remissão espontânea, decorridos poucos meses, 15% vão desenvolver neoplasia trofoblástica gestacional (NTG) e necessitar de quimioterapia para obter a cura (Tse et al., 2009). A fim de detectar transformação maligna da MHC, seguimento pós-molar rigoroso é estabelecido com dosagens semanais ou quinzenais de gonadotrofina coriônica (hCG), único marcador capaz de antever precocemente a NTG (Delmanto et al., 2007). Outros indicadores, como a morfologia histológica do trofoblasto (Genest et al., 1991), a avaliação citométrica de sua ploidia (van-de-Kaa et al., 1996), marcadores de proliferação celular (Jeffers et al., 1996) e a expressão de oncogenes (Cheung et al., 1999) falharam em predizer NTG pós-MHC.

Conhecer as pacientes com MHC que vão desenvolver NTG significa estabelecer seguimento pós-molar estrito a fim de surpreender a transformação maligna em estágio precoce. Para pacientes com MHC de alto risco para o desenvolvimento de NTG pós-molar, poder-se-ia indicar quimioterapia profilática (Uberti et al., 2009). Por outro lado, identificar as pacientes com probabilidade mínima de evolução maligna seguindo MHC permite acompanhamento por menor tempo, e conseqüente diminuição da ansiedade e do custo (Kohorn, 2003; Batorfi et al., 2004).

Apoptose, morte celular programada, parece estar envolvida na transformação maligna da MHC (Wong et al., 1999; Chiu et al., 2001; Shiozaki et al., 2003; Harma et al., 2005; Fong et al., 2006; Chan et al., 2008). A depender do estímulo, a apoptose trofoblástica poderá ser iniciada pela via intrínseca (via mitocondrial) ou extrínseca, mediada por receptores de morte na superfície da membrana celular. As vias intrínseca e extrínseca da apoptose trofoblástica não são excludentes e podem cursar com ativação cruzada (Fadeel & Orrenius, 2005). Ambas as vias culminam na ação da enzima cisteína protease aspartato específica, denominada caspase (*cysteine – aspartic acid – protease*), encarregada de mediar a morte celular por proteólise no resíduo aminoácido aspartato.

Entre as proteases mais importantes, está a caspase-3, efetora no processo de apoptose, responsável pela quebra de proteínas e conseqüente decesso celular. Entretanto, existem mecanismos de controle da morte celular programada, como a atuação de proteínas inibidoras de apoptose (família das IAP), dentre as quais se destaca a survivina. Trata-se de molécula com 16.5 kDA expressa durante a fase G2/M, e que se localiza nos microtúbulos dos fusos mitóticos, região requerida para a inibição da apoptose (Monzo et al., 1999; Verdecia et al., 2000). As IAP atuam promovendo interação do complexo IAP-caspases, resultando na inibição de apoptose.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do índice apoptótico e da imuno-expressão da survivina em tecido molar no prognóstico e tratamento de pacientes com MHC.

2. Metodologia

Trata-se de estudo observacional, descritivo, retrospectivo e com grupo de comparação. Foram selecionadas 81 pacientes com MHC, diagnosticadas, tratadas e acompanhadas no Centro de Doenças Trofoblásticas de Botucatu-UNESP (CDT-Botucatu), no período de 1995 a 2006. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP e foi obtido consentimento esclarecido das pacientes que retornaram após convocação.

Pacientes

Participaram deste estudo pacientes com diagnóstico de MHC confirmado em exame histopatológico e que apresentavam blocos de parafina com tecido molar armazenados no Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP (HC-FMB). Em adição, as pacientes do estudo realizaram seguimento pós-molar completo no CDT-Botucatu durante por pelo menos um ano. Das 81 pacientes atendidas no período, foram excluídas três devido a material estocado inadequado / insuficiente para estudo imunohistoquímico do tecido molar.

No seguimento pós-molar, com base nas características da curva de regressão da gonadotrofina coriônica, as pacientes foram classificadas em duas categorias: remissão espontânea (MHC-RE) ou evolução para NTG (MHC-NTG) (Delmanto et al., 2007). A remissão espontânea da MHC foi considerada após três

dosagens consecutivas de hCG < 5mUI/mL. Evolução da MHC para NTG foi diagnosticada conforme os critérios platô e ascensão (FIGO, 2000), em associação com a curva de regressão normal do hCG do próprio serviço (Delmanto et al., 2007). De acordo com esses critérios, 59 (75,6%) pacientes tiveram remissão espontânea da MHC e 19 (24,4%) desenvolveram NTG pós-molar e requereram quimioterapia.

Antes do início do tratamento quimioterápico, as pacientes foram avaliadas quanto à doença metastática pelo exame ginecológico, ultra-sonografia pélvica com Doppler e radiografia de tórax, para investigar metástases pulmonares.

As pacientes com NTG pós-molar foram classificadas como baixo risco de acordo com sistema FIGO 2000 (FIGO, 2000) e receberam quimioterapia por agente único (metotrexate ou actinomicina-D). Resistência ao tratamento quimioterápico primário foi definida pela elevação ou platô do hCG por pelo menos três semanas consecutivas. Nenhuma das duas pacientes que utilizaram actinomicina-D como tratamento primário desenvolveu quimiorresistência. Das 17 pacientes que estavam em uso de metotrexate, cinco (29,4%) tiveram resistência e, então, tratamento quimioterápico por agente único alternativo, actinomicina-D, foi administrado. Destas cinco pacientes, somente duas apresentaram quimiorresistência à segunda linha (actinomicina-D) e requereram quimioterapia por múltiplos agentes (EP-EMA modificado) (Michelin et al., 2007). Todas as pacientes com NTG pós-molar obtiveram remissão completa da neoplasia.

Depois do tratamento quimioterápico, todas as pacientes foram acompanhadas com dosagens mensais de hCG pelo período de pelo menos um ano, após obtenção do primeiro valor normal da gonadotrofina coriônica.

Estudo histológico

Após seleção das pacientes com MHC, foram levantados os números dos seus exames anatomopatológicos relativos ao esvaziamento molar inicial. Isso possibilitou a separação e nova identificação dos blocos de parafina correspondentes, arquivados no Departamento de Patologia do HC-FMB. Todos os blocos de tecido molar foram utilizados para confecção de cortes histológicos à espessura de quatro micra, corados pela hematoxilina e eosina (H&E).

Os blocos de parafina com amostra representativa de tecido molar foram utilizados para o estudo imunohistoquímico, sendo preparadas três lâminas por paciente. O diagnóstico de MHC foi revisto por um único patologista, sem conhecimento da evolução clínica da doença, segundo os critérios de Szulman e Surti (1984): vilosidades coriônicas difusamente aumentadas com edema, formação de cisternas centrais, ausência de embrião e notável hiperplasia trofoblástica.

Estudo imunohistoquímico

Estudos imunohistoquímicos foram realizados em tecido molar fixado em blocos de parafina, usando a metodologia avidina-biotina-peroxidase (Hsu et al., 1981). Os seguintes anticorpos primários foram utilizados em cada caso: anticorpo

policlonal anti-caspase-3 (código: ASP 175; diluição 1:200; *Cell Signaling Technology*®; TX, USA); e anticorpo monoclonal anti-survivina (surv Ab-3; 200 µg/ml; clone 5E8; diluição 1:100; *Neomarkers*, TX, USA). Os cortes histológicos com os anticorpos primários ficaram incubados overnight a 4°C.

A leitura das lâminas foi realizada simultaneamente por dois observadores, utilizando-se microscópio de luz (Olympus®, modelo BX40), nos aumentos 100x e 400x. Avaliou-se toda a extensão da lâmina para selecionar os campos mais celulares do trofoblasto viloso. Utilizou-se cortes histológicos como controles positivos no estudo imunohistoquímico, sendo lâminas de amígdala, para caspase-3, e lâminas de adenocarcinoma de estômago, para imuno-expressão da survivina. Esses cortes histológicos também foram usados como controles negativos, subtraindo-se os anticorpos primários das reações.

Avaliação do índice apoptótico

As células trofoblásticas com intensa coloração acastanhada citoplasmática foram consideradas positivas para caspase-3 (Sgarbosa et al., 2006). Para a contagem de células utilizou-se uma gradícula milimetrada em uma das oculares (aumento de 400x, correspondente a 0,25mm²) (*Eyepiece Micrometer Olympus, Japan*). Não se contou as células localizadas nas margens dos campos ou com núcleos pouco nítidos. Foram contadas, em média, 755 ± 80 células trofoblásticas no grupo MHC-RE e 721 ± 87 no grupo MHC-NTG (p=0,117). O índice apoptótico foi obtido pela relação entre o número de células caspase-3 positivas e o número

total de células analisadas, multiplicado por 100, segundo a fórmula (Chiu et al., 2001):

$$\text{Índice apoptótico} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células caspase-3 positivas}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de células}} \times 100$$

Avaliação da imuno-expressão da survivina

Imuno-expressão positiva para survivina foi considerada para células trofoblásticas com núcleo / citoplasma corados em castanho, independente da intensidade da coloração. A intensidade e extensão da imuno-expressão da survivina foram expressas por método semi-quantitativo, inferidas através do mesmo escore com modificações: a intensidade da imuno-expressão foi quantificada em ausente, fraca, moderada ou intensa e pontuada, respectivamente, em 0 (negativo), 1 (+), 2 (++) e 3 (+++); a extensão da coloração foi ausente, graduada em até um terço da lâmina, de um terço a dois terços, e acima de dois terços e pontuada respectivamente em 0 (negativo), 1 (+), 2 (++) e 3 (+++). O escore final da imuno-expressão da survivina resulta da somatória dos pontos obtidos na avaliação da intensidade e da extensão de sua imuno-expressão.

Análise estatística

Os dados, obtidos em protocolo clínico, foram digitados em planilha do aplicativo Excel for Windows, versão 97. As freqüências foram calculadas para cada grupo com análise exploratória (medidas descritivas – mediana, desvio

padrão, variância). Testes paramétricos (Teste t de Student para amostras independentes, Teste de Mann-Whitney para amostras independentes e Teste de Qui-Quadrado) foram aplicados para verificação de diferenças entre variáveis de controle (idade, número de gestações anteriores, paridade, idade gestacional no diagnóstico, tamanho uterino maior que idade gestacional, presença de cistos teca-luteínicos, valor inicial de hCG e tempo de remissão).

A análise do índice apoptótico, nos grupos MHC-RE e MHC-NTG, foi realizada pelo Teste t de Student para amostras independentes. A associação da imuno-expressão da survivina com a evolução da MHC foi analisada pelo teste exato de Fisher.

Correlação entre os biomarcadores e a evolução da MHC e o tratamento da NTG pós-MHC foi feita mediante análise da estimativa da correlação de Spearman.

Para os testes utilizados foi adotado o nível de significância de 1% ($p < 0,01$) e intervalo de confiança de 95%.

3. Resultados

Foram incluídas nesse estudo 78 pacientes, das quais 59 cursaram com remissão espontânea e 19 evoluíram para NTG pós-molar. As características clínicas das pacientes são apresentadas na Tabela 1. No perfil demográfico, as pacientes com MHC que evoluíram para NTG foram, em média, cerca de 4 anos mais velhas que aquelas que tiveram remissão espontânea. A ocorrência de cistos teca-luteínicos apresentou proporção de 24,1% a mais nas pacientes com MHC-

NTG. Também observou-se valores iniciais de hCG significativamente mais elevados naquelas pacientes com MHC que desenvolveram NTG pós-molar. O tempo de remissão foi, em média, de $10,4 \pm 3,4$ semanas no grupo MHC-RE e de $19,3 \pm 5,2$ no grupo MHC-NTG ($p < 0,0001$).

A correlação entre o índice apoptótico e a evolução clínica de pacientes com MHC é apresentada nas Tabelas 2 e 3. Nota-se que o índice apoptótico esteve significativamente diminuído nas pacientes que cursaram com NTG pós-molar. Dos 19 casos de NTG, 18 (94%) apresentaram índices apoptóticos abaixo de 4,0%. Somente uma paciente com NTG pós-molar apresentou índice apoptótico acima de 4,0% (Tabela 2). Houve evidência para concluir sobre o efeito significativo do índice apoptótico sobre a evolução da MHC para NTG pós-molar, pois o aumento de 1 unidade no índice apoptótico reduziu, em média, 61% a chance de NTG pós-molar, podendo esta redução ser de 19% a até 2,22 vezes (Tabela 3).

A Figura 1 ilustra a distribuição copiosa da caspase-3 nos casos de remissão espontânea, enquanto que naquelas com transformação maligna da MHC essa protease encontra-se presente mui discretamente (Figura 2).

A imuno-expressão da intensidade (citoplasma/núcleo) e da extensão da survivina nas células do trofoblasto viloso não influenciou no percentual de pacientes com MHC que evoluíram para NTG pós-molar (Tabela 4). De modo semelhante, a análise do escore da survivina nas células trofoblásticas não interferiu significativamente com a evolução da MHC (Tabela 5).

As Figuras 3 e 4 mostram padrão de imuno-expressão da survivina em cortes histológicos de MHC, independentemente da evolução, MHC-RE e MHC-NTG.

A Tabela 6 mostra o estudo do efeito do índice apoptótico e presença da survivina no citoplasma e núcleo do trofoblasto viloso sobre o tratamento da NTG pós-molar. Não houve influência desses biomarcadores sobre variáveis do tratamento da NTG pós-molar.

4. Discussão

O índice apoptótico foi capaz de antever a transformação maligna da MHC. Esse resultado vislumbra a perspectiva de adequar o seguimento pós-molar às características biológicas do tecido trofoblástico de cada paciente. Em futuro próximo, o painel imunohistoquímico poderá auxiliar decisão clínica no tratamento da MHC, a exemplo do câncer de mama. Isso possibilitará individualizar o seguimento, sistematizando acompanhamento rigoroso àquelas com perfil imunohistoquímico desfavorável. Ao contrário, espaçar as consultas e alta precoce do acompanhamento pós-molar àquelas pacientes com MHC de melhor perfil imunohistoquímico.

Faz dez anos, o papel da apoptose no prognóstico da mola hidatiforme começava a ser notado. Wong et al. (1999) avaliaram 33 placentas normais, 14 abortos espontâneos, 34 molas completas, 14 molas parciais e 8 coriocarcinomas. O índice apoptótico foi estimado e esteve elevado nos casos de remissão

espontânea da mola hidatiforme, indiciando que a apoptose poderia fornecer valor prognóstico à mola hidatiforme, à semelhança dos nossos resultados.

Chiu et al. (2001), estudaram a expressão imunohistoquímica de caspases na clivagem de citoqueratina 18 com o anticorpo monoclonal M30 CythoDeath. Analisaram os autores 12 abortos espontâneos, 57 molas completas, 22 molas parciais, oito coriocarcinomas e 28 placentas. Observaram que as caspases eram mais freqüentes nas molas hidatiformes e coriocarcinomas do que nas placentas normais e nos abortos. Os autores concluíram que quanto menor a presença do M30 na mola hidatiforme, maior a incidência de transformação maligna do trofoblasto.

Harma et al. (2005) estudaram a presença de caspase 3 e investigaram seu valor prognóstico na mola completa e na NTG. Analisaram 3 pacientes com mola completa, 2 pacientes com NTG e 3 placentas obtidas após o parto de gravidezes normais de mulheres saudáveis, sendo estas últimas o grupo de comparação. Os resultados mostraram níveis elevados de caspase 3 na MHC e NTG, quando comparados à placenta de termo de mulheres normais. De forma diversa aos trabalhos anteriores, estes autores verificaram que níveis diminuídos de caspase 3 foram mais freqüentes nas molas hidatiformes que nas NTG. Ainda assim, ressaltaram que mais estudos deveriam ser realizados, com casuística mais encorpada para conclusões mais sólidas.

Fong et al. (2006), analisaram a onco-expressão de caspases 8 e 10 em linhagens de células de coriocarcinoma e placentas normais de primeiro trimestre. Observaram que as caspases 8 e 10 tiveram presença diminuída nos

coriocarcinomas em relação a outros tecidos trofoblásticos. Conquanto não tenham analisado a presença da caspase-3, como foi nossa opção, ao analisar caspases 8 e 10 associaram marcadores de apoptose com forma grave de NTG, o coriocarcinoma. Todavia, entendemos que, entre as caspases, é a 3 a que melhor se presta para indiciar apoptose, vez que se encontra ativada em grande parte dos sinais deflagradores de morte celular programada, sendo capaz de clivar número importante de proteínas fundamentais à sobrevivência celular (Harma et al. 2005).

Na literatura, são escassas as séries de casos apresentados, vez que mola hidatiforme é doença incomum. Somente os Centros Especializados detêm casuística encorpada nesse mister. Em nosso estudo, consoante os casos analisados, que representam a maior casuística da literatura sobre o tema apoptose na MHC, é inequívoca a correlação entre o índice apoptótico e a evolução da MHC para NTG. O único caso que evoluiu para NTG e que apresentou índice apoptótico acima de 4,0% possuía características clínicas de pior prognóstico, favoráveis à transformação maligna da MHC (presença de cistos teca-luteínicos, tamanho do útero maior que a idade gestacional, hCG inicial de 1.000.000 mUI/ml).

Não existem estudos acerca da influência da imuno-expressão da survivina no prognóstico de pacientes com MHC. Lehner et al. (2001) estudaram a expressão da survivina em 25 tecidos placentários normais e em 23 molas hidatiformes. Positividade para survivina foi observada em 17/25 placentas e em 22/23 molas hidatiformes, sendo que seus níveis eram significativamente maiores na mola hidatiforme quando comparados às placentas normais. Entretanto, não foi

objeto de análise a avaliação da transformação maligna da mola hidatiforme consoante à imuno-expressão da survivina.

Nosso estudo não evidenciou correlação entre a imuno-expressão da survivina e a evolução da MHC para NTG pós-molar. A survivina encontra-se presente fisiologicamente nos tecidos embrionários, sendo fundamental para a remodelação fetal. Com o desenvolvimento da gestação a survivina vai diminuindo sua expressão até ser silenciada. Após o nascimento, a survivina reaparece no organismo humano na vigência de algumas doenças malignas como linfomas, adenocarcinoma gástrico e intestinal, câncer pancreático. Esperávamos que a expressão da survivina fosse significativamente mais importante nos casos de MHC que evoluíram para NTG pós-molar. Mas como entender que células trofoblásticas que expressam survivina de modo semelhante possam ter comportamento biológico tão díspar, remissão espontânea ou evolução para NTG? A relação entre remissão ou transformação maligna da MHC é certamente mediada por múltiplos fatores, não apenas os mecanismos de apoptose trofoblástica. Além disso, outras proteínas da família das IAP, que não a survivina, podem estar envolvidas na diferenciação da evolução da MHC.

Dois fatores podem ter contribuído para não haver diferença no comportamento imunohistoquímico da survivina entre os grupos de MHC, RE e NTG. O primeiro deles é o fato de que a MHC-RE é tecido que apresenta maior diferenciação histológica, aproximando-se mais dos tecidos fetais, onde é marcante a presença de survivina. Como os casos de MHC-NTG apresentam maior grau de anaplasia celular (Szulman & Surti, 1984), afastam-se de sua

origem fetal, diminuindo a expressão de survivina. Não obstante características moleculares das MHC-NTG já possam determinar seu mau prognóstico, como a própria presença de survivina. Outro elemento que pode atuar nesse cenário é a taxa de crescimento celular. Mesmo com expressão semelhante de survivina, os tecidos trofoblásticos de pacientes com MHC-NTG poderiam apresentar maior grau de proliferação celular (antígeno Ki-67), o que contrabalancearia a ação anti-apoptótica da survivina.

Na NTG foi observado que a transferência de oligonucleotídeos *anti-sense* (inativador) de survivina para cultura de linhagem de coriocarcinoma, ocasionou supressão da proliferação celular e aumento de apoptose, culminando com morte celular (Shiozaki et al., 2003). A possibilidade de tratamento individualizado em NTG, considerando o painel imunohistoquímico, encontra-se em fase de ensaios clínicos, com quimioterápicos desenvolvidos para determinados marcadores moleculares (Shih et al., 2007).

O futuro do seguimento da MHC e o tratamento da NTG pós-molar é auspício. De certo, a biologia molecular, associada à clínica, será a base para acompanhamento e tratamento mais preciso e humanizado, permitindo sobrevida com melhor qualidade de vida para as pacientes com estes raros e tão peculiares tumores.

5. Referências Bibliográficas

1. Berkowitz RS, Goldstein DP. Current management of gestational trophoblastic diseases Gynecol Oncol 2009; 112: 654-62.
-

2. Tse KY, Chan KKL, Tam KF, Hgan HYS. Gestational trophoblastic disease. *Obstet Gynaecol Reprod Med* 2009; 19: 89-97.
 3. Delmanto LRMG, Maestá I, Braga A, et al. A curva de regressão da gonadotrofina coriônica humana é útil no diagnóstico precoce da neoplasia trofoblástica gestacional pós-molar? *Rev Bras Ginec Obstet.* 2007; 29: 506-10.
 4. Genest DR, Laborde O, Berkowitz RS et al. A clinicopathologic study of 153 cases of complete hydatidiform mole (1980-90) histologic grade lacks prognostic significance. *Obstet Gynaecol* 1991; 78: 402-9.
 5. van-de-Kaa CA, Schijf CP, de-Wilde PC, et al. Persistent gestational trophoblastic disease: DNA image cytometry and interphase cytogenetics have limited predictive value. *Mod Pathol* 1996; 9: 1007-14.
 6. Jeffers MD, Richmond JA, Smith R. Trophoblast proliferation rate does not predict progression to persistent gestational trophoblastic disease in complete hydatidiform mole. *Int J Gynaecol Pathol* 1996; 15: 34-8.
 7. Cheung ANY, Shen DH, Khoo US, et al. Immunohistochemical and mutational analysis of p53 tumour suppressor gene in gestational trophoblastic disease - correlation with mdm2, proliferation index and clinicopathological parameters. *Int J Gynaecol Cancer* 1999; 9: 123-30.
 8. Uberti EMH, Fajardo MC, Cunha AGV, et al. Prevention of postmolar gestational trophoblastic neoplasia using prophylactic single bolus dose of actinomycin D in high-risk hydatidiform mole: A simple, effective, secure and low-cost approach without adverse effects on compliance to general follow-up or subsequent treatment. *Gynecol Oncol* 2009; 114: 299-305.
-

9. Kohorn EI. Human chorionic gonadotropin follow-up in patients with molar pregnancy: a time for reevaluation. *Obstet Gynecol* 2003; 102: 1417.
 10. Batorfi J, Vegh G, Szepesi J, Szigetvari I, Doszpod J, Fulop V. How long should patients be followed after molar pregnancy? Analysis of serum hCG follow-up data. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 112: 95-7.
 11. Wong SYY, Ngan HYS, Chan CCW, Cheung ANY. Apoptosis in gestational trophoblastic disease - correlated with clinical outcome and bcl-2 expression but not bax expression. *Mod Pathol* 1999; 12: 1025-33.
 12. Chiu PM, Ngan YS, Khoo US, Cheung AN. Apoptotic activity in gestational trophoblastic disease correlates with clinical outcome: assessment by the caspase-related M30 CytoDeath antibody. *Histopathology* 2001; 38: 243-9.
 13. Shiozaki A, Kakatoa K, Fujimura M, Yubi H, Sakabi M, Saito S. Survivin inhibits apoptosis in cytotrophoblasts. *Placenta* 2003; 24: 65-76.
 14. Harma MI, Harma M, Dilsiz N. Western blot determination of caspase-3 apoptotic activity in complete hydatidiform mole and persistent trophoblastic disease. *J Turkish German Gynecol Assoc* 2005; 6: 226-8.
 15. Fong PY, Xue WC, Ngan HY, et al. Caspase activity is downregulated in choriocarcinoma: a cDNA array differential expression study. *J Clin Pathol* 2006; 59: 179-83.
 16. Chan HY, Siu MKY, Zhang HJ, et al. Activated Stat3 expression in gestational trophoblastic disease: correlation with clinicopathological parameters and apoptotic indices. *Histopathol* 2008; 53: 139-46.
-

17. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005; 258: 479-517.
 18. Monzo M, Rosell R, Felip E, et al. A novel anti apoptosis gene: Re expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in no small cell lung cancer. *Journal Clinical Oncology* 1999; 17: 2100-4.
 19. Verdecia AM, Huang HK, Dutil E, Kaiser DA, Hunter T, Noel JP. Structure of the human anti apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nature* 2000; 7: 602-8.
 20. FIGO Oncology Committee. FIGO staging for gestational trophoblastic neoplasia 2000. *Int J Gynecol Obstet.* 2002; 77: 285-7.
 21. Michelin OC, Maestá I, Braga A, Gaspari LRS, Delmanto LRMG, Consonni M. Tratamento da neoplasia trofoblástica gestacional resistente ao metotrexate. *Femina* 2007; 35: 35-40.
 22. Szulman AE, Surti U. The syndromes of partial and complete molar gestation. *Clin Obstet Gynecol* 1984; 27: 172-80.
 23. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal Histochemistry Cytochemistry* 1981; 29: 577-80.
 24. Shiozaki A, Kataoka K, Fukimura M, Yuki H, Sakai M, Saito S. Survivin inhibits apoptosis in cytotrophoblasts. *Placenta* 2003; 24: 65-76.
-

25. Sgarbosa F, Barbisan LF, Brasil MA, et al. Changes in apoptosis and Bcl-2 expression in human hyperglycemic, term placental trophoblast. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; 73:143-9.
26. Lehner R, Bobak J, Kim NK, Shroyer AL, Shroyer KR. Localization of telomerase hTERT protein and survivin in placenta: relation to placental development and hydatidiform mole. *Obstet Gynecol* 2001; 97: 965-70.
27. Shih IM. Gestational trophoblastic neoplasia – pathogenesis and potential therapeutic targets. *Lancet Oncol* 2007; 8: 642–50.
-

Tabela 1. Características clínicas das pacientes com MHC-RE e MHC-NTG.

Características	MHC-RE (59 pacientes)				MHC-NTG (19 pacientes)				p
	Mínimo	Mediana	Máximo	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	DP	
Idade	14	21	42	5,2	15	24	39	7,4	0,007 ⁽¹⁾
Número de gestações	0	0	4	1,0	0	0	3	0,9	0,556 ⁽²⁾
Paridade	0	0	4	0,9	0	1	3	1,0	0,396 ⁽²⁾
IG diagnóstico	7	13	20	3,2	8	13	22	3,9	0,447 ⁽¹⁾
Tamanho útero > IG (%)	52,5				73,7				0,175 ⁽³⁾
Presença de cistos (%)	23,7				57,8				0,012 ⁽³⁾
Nível inicial de hCG	22624	150182	1000000	263901	72087	518133	2170000	713434	0,001 ⁽²⁾
Tempo de remissão	2	10	20	3,4	12	18	36	5,2	< 0,0001 ⁽¹⁾

MHC – mola hidatiforme completa. RE – remissão espontânea. NTG – neoplasia trofoblástica gestacional. IG – idade gestacional. hCG – gonadotrofina coriônica humana. DP – desvio padrão. (1) Teste t de Student para amostras independentes. (2) Teste de Mann-Whitney para amostras independentes. (3) Teste de Qui-Quadrado.

Tabela 2. Estudo do efeito do índice apoptótico sobre a evolução de pacientes com mola hidatiforme completa para neoplasia trofoblástica gestacional.

Índice apoptótico ⁽¹⁾	NTG	Total	%
Abaixo de 2,0%	6	14	42,86%
De 2,0% a 2,9%	6	14	42,86%
De 3,0% a 3,9%	6	12	50,00%
De 4,0% a 4,9%	0	6	0,00%
De 5,0% a 5,9%	0	6	0,00%
De 6,0% a 6,9%	0	9	0,00%
De 7,0% a 7,9%	0	9	0,00%
De 8,0% a 9,1%	1	8	12,50%
Total	19	78	24,36%

(1) Percentual de células da Caspase-3 positivas em relação ao número de células contadas.

Tabela 3. Modelo logístico ajustado para explicar a evolução do caso para NTG em função do aumento do índice apoptótico.

Variável	Estimativa de β	p^*	OR	IC (OR;95%)	
Índice apoptótico	-0,49	0,002	0,61	0,45	0,84
Constante	0,68	0,232	1,97		

* Estimativa da correlação de Spearman

Tabela 4. Estudo do efeito da imuno-expressão da intensidade e da extensão da survivina sobre a evolução de pacientes com mola hidatiforme completa para neoplasia trofoblástica gestacional.

Grau	Evolução para Neoplasia Trofoblástica Gestacional		
	Intensidade		
	Survivina no citoplasma	Survivina no núcleo	Extensão de survivina
0 (Negativo)	22,22% (27)	29,27% (41)	24,00% (25)
1 (+)	41,67% (12)	100% (1)	31,82% (22)
2 (++)	20,59% (34)	18,52% (27)	19,05% (21)
3 (+++)	20,00% (5)	11,11% (9)	20,00% (10)
<i>p</i> *	0,510	0,222	0,795

% – pacientes que evoluíram para NTG. (x) – total de pacientes estudadas.

* Teste Exato de Fisher

Tabela 5. Estudo do efeito do escore da imuno-expressão da survivina sobre a evolução de pacientes com mola hidatiforme completa para neoplasia trofoblástica gestacional.

Escore	Evolução para Neoplasia Trofoblástica Gestacional	
	Survivina no citoplasma	Survivina no núcleo
0	24,00% (25)	24,00% (25)
1	(0)	27,27% (11)
2	37,50% (8)	80,00% (5)
3	26,32% (19)	30,00% (10)
4	23,53% (17)	7,69% (13)
5	0,00% (6)	9,09% (11)
6	33,33% (3)	33,33% (3)
<i>p</i> *	0,067	0,067

* Teste Exato de Fisher

Tabela 6. Estudo do efeito isolado do índice apoptótico e do escore da imuno-expressão da survivina, estudada no citoplasma e no núcleo, e variáveis do tratamento de pacientes com neoplasia trofoblástica gestacional pós-mola hidatiforme completa.

Fator	Desfecho	Estimativa de β	p^*	OR	IC(OR;95%)	
Índice apoptótico	Início da QT antes de 8 semanas	-0,41	0,375	0,66	0,27	1,65
	Presença de metástase	-0,07	0,924	0,94	0,24	3,59
	Resistência a QT	-0,29	0,523	0,75	0,30	1,84
	QT por múltiplos agentes	-0,30	0,672	0,74	0,19	2,95
Survivina positiva no citoplasma (+, ++, +++)	Início da QT antes de 8 semanas	1,46	0,236	4,29	0,39	47,62
	Presença de metástase	-19,59	0,999	0,00	0,00	.
	Resistência a QT	-0,51	0,639	0,60	0,07	5,06
	QT por múltiplos agentes	-0,88	0,562	0,42	0,02	8,05
Survivina positiva no núcleo (+, ++, +++)	Início da QT antes de 8 semanas	0,41	0,679	1,50	0,22	10,22
	Presença de metástase	-18,80	0,999	0,00	0,00	.
	Resistência a QT	0,18	0,865	1,20	0,15	9,77
	QT por múltiplos agentes	0,61	0,687	1,83	0,10	34,85

* Estimativa da correlação de Spearman

Figuras

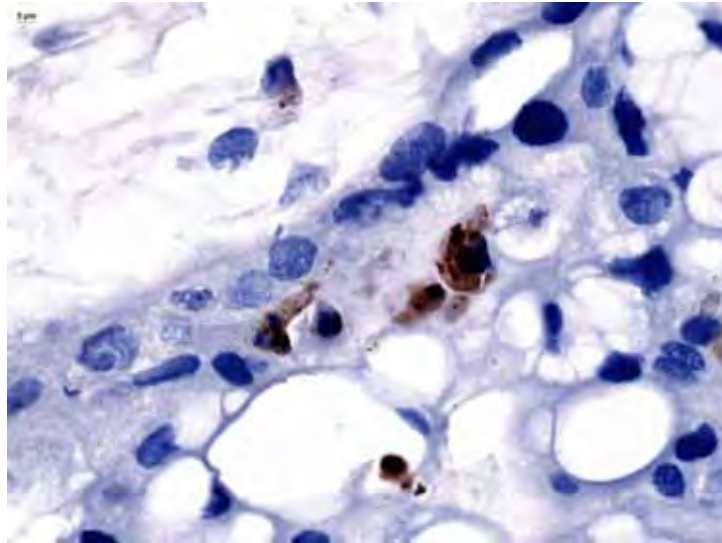


Figura 1. Imagem de mola hidatiforme completa corada para caspase-3, exibindo coloração acastanhada abundante, indicando elevado índice apoptótico (6%). Trata-se de caso que cursou com remissão espontânea.

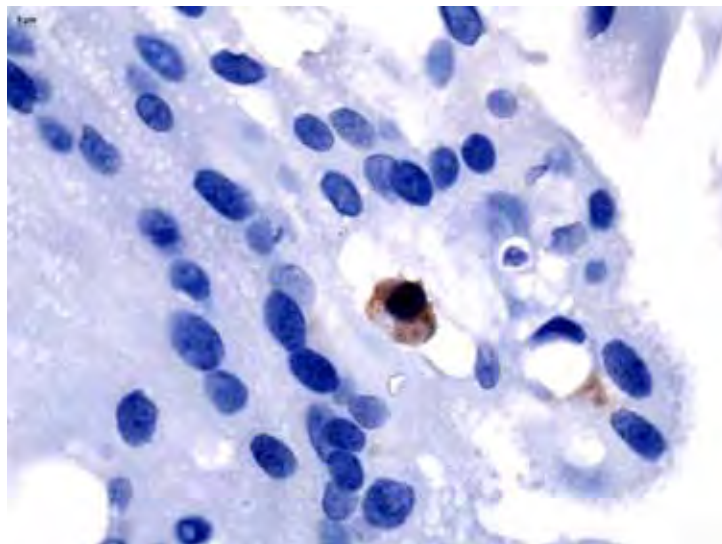


Figura 2. Imagem de mola hidatiforme completa corada para caspase-3, exibindo coloração acastanhada discreta, indicando pequeno índice apoptótico (1,8%). Trata-se de caso com evolução para neoplasia trofoblástica gestacional.

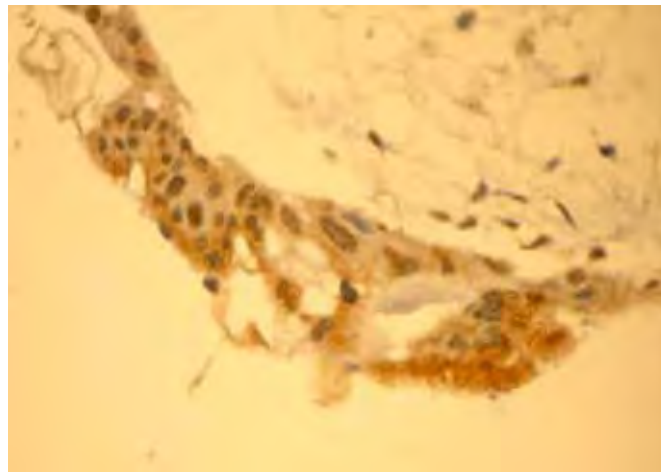


Figura 3. Imagem de mola hidatiforme completa corada para survivina, exibindo coloração acastanhada acentuada, notadamente no citoplasma, indicando positividade forte (3+), imuno-expressão em mais de dois terços da lâmina (3+), escore 6. Trata-se de caso com evolução para neoplasia trofoblástica gestacional.

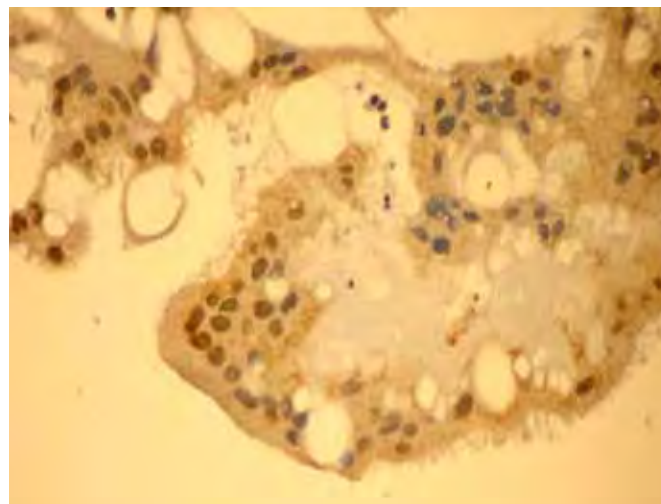
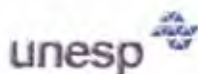


Figura 4. Imagem de mola hidatiforme completa corada para survivina, exibindo coloração acastanhada discreta, com predomínio nuclear, indicando positividade fraca (1+), imuno-expressão em menos de um terço da lâmina (1+), escore 2. Trata-se de caso com evolução para neoplasia trofoblástica gestacional.



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
Abril de 1997



Botucatu, 03 de dezembro de 2007

OF. 497/2007-CEP

Ilustríssima Senhora
Profª Drª Izildinha Maestá
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina de Botucatu.

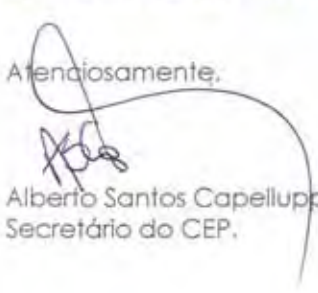
Prezada Drª Izildinha,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP informo que o Projeto de Pesquisa "**Influência do índice apoptótico e da imuno-expressão da survivina no prognóstico de pacientes com mola hidatiforme completa**", a ser conduzido por Antonio Rodrigues Braga Neto, orientado por Vossa Senhoria, com a participação dos Profs. Drs. Kunie I. R. Coelho, Carla Adriene da Silva Franchi, Odair Carlito Michelin e Marilza Vieira Cunha Rudge, recebeu do relator parecer favorável com recomendação, aprovado em reunião de 03/12/2007.

Recomendação: cópia do Parecer em anexo.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "**Relatório Final de Atividades**".

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.