

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
Faculdade de Medicina de Botucatu

**Expressão de receptores *Toll-like* - 2 e *Toll-like* - 4 em
membranas corioamnióticas de gestações complicadas
por corioamnionite**

Natália Prearo Moço

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia de Botucatu, UNESP, para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas - Modalidade Médica.

Botucatu
2008

Natália Prearo Moço

**Expressão de receptores *Toll-like* - 2 e *Toll-like* - 4 em
membranas corioamnióticas de gestações complicadas
por corioamnionite**

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. João Manuel Grisi Candeias

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia de Botucatu, UNESP, para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas - Modalidade Médica.

Botucatu
2008

SUMÁRIO

1. Resumo	2
2. Introdução	5
3. Objetivo	10
4. Material e métodos	12
4.1. Constituição dos grupos de estudo.....	12
4.2. Colheita das membranas corioamnióticas.....	13
4.3. Detecção de RNAm de TLR-2 e de TLR-4 por PCR em tempo real.....	14
4.3.1. Extração de RNA.....	14
4.3.2. Obtenção de cDNA.....	15
4.3.3. PCR em tempo real.....	15
4.4. Análise estatística.....	18
5. Resultados	20
5.1. Análise histopatológica das membranas corioamnióticas.....	20
5.2. Concentração relativa de RNAm de TLR-2 e de TLR-4.....	22
5.2.1. Concentração relativa de RNAm de TLR-2 e de TLR-4 nas membranas corioamnióticas.....	22
5.2.2. Concentração relativa de RNAm de TLR-2 e de TLR-4 e corioamnionite..	24
5.2.3. Concentração relativa de TLR-2 e de TLR-4 em gestações pré-termo e de termo.....	26
6. Discussão	28

7. Referências bibliográficas	34
8. Anexos	41

Resumo

1. Resumo

Introdução: Corioamnionite é definida como inflamação das membranas corioamnióticas, sendo que tal inflamação resulta geralmente de infecção bacteriana do líquido amniótico, das membranas fetais e da placenta. O sistema imune inato constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos e nesse sentido os receptores *Toll-like* (TLR) são importantes reguladores dessa resposta inespecífica. Entretanto, a expressão desses receptores nas membranas corioamnióticas de gestações complicadas por corioamnionite não está bem estabelecida. **Objetivo:** Investigar a expressão de receptores *Toll-like* -2 e -4 em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por corioamnionite. **Material e Métodos:** Foram incluídas no estudo 48 membranas corioamnióticas, coletadas no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, no período de janeiro a novembro de 2008, de gestações pré-termo e de termo, incluindo gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT), trabalho de parto pré-termo (TPP) além de gestações de termo (GT). Fragmentos das membranas corioamnióticas foram encaminhados à análise histopatológica para confirmação de corioamnionite histológica. Outros fragmentos de 1cm² das membranas foram acondicionados em *RNA later*[®] e foram submetidos à extração de RNA total. Após a extração do RNA, as amostras com concentração entre 0,02 e 0,2µg/ µL de RNA foram submetidas à obtenção de cDNA para posterior utilização na quantificação da expressão de TLR-2 e TLR-4 pela técnica da PCR em tempo real empregando-se o sistema TaqMan[®] Gene Expression Assays. **Resultados:** Dentre as 24 membranas corioamnióticas com presença de corioamnionite, 41,7% foram obtidas de gestantes em TPP; 33,3% de

gestantes com RPM-PT e 25,0% de gestantes com GT. As membranas corioamnióticas expressam os TLR-2 e -4 e a concentração relativa de RNAm de TLR-4 em relação à concentração de TLR-2 está aumentada na presença de corioamnionite. Entretanto, não há diferença nas concentrações relativas de RNAm de TLR-2 e de -4 na presença de corioamnionite quando comparadas com membranas livres de infiltrado inflamatório e também não há diferença na expressão desses receptores, na presença ou não de corioamnionite, entre gestações pré-termo e de termo. **Conclusão:** A expressão de TLR-2 e de TLR-4 não é modulada pela presença de corioamnionite histológica em gestações pré-termo ou de termo, na presença de trabalho de parto.

Introdução

2. Introdução

As membranas corioamnióticas formam uma estrutura de extrema importância para o desenvolvimento fetal. Dentre suas principais funções estão a proteção do feto contra traumas, a manutenção do volume do líquido amniótico e a proteção do cordão umbilical e do sangue fetal contra a compressão, além de servirem como barreira contra infecções vindas do trato genital inferior¹.

A estrutura multiestratificada das membranas fetais é constituída tanto de elementos de tecido conectivo quanto de elementos de tecido epitelial. O epitélio amniótico é formado por uma monocamada de células epiteliais colunares que reveste a cavidade amniótica². O âmnio e córion repousam sobre a decídua reflexa, constituindo o córion leve e, acima dos cotilédones, originando a membrana corial. O âmnio, que se localiza internamente e em contato com o feto, apresenta-se liso, translúcido e delgado, enquanto o córion é mais externo, está em proximidade com a cavidade uterina e apresenta-se irregular e opaco, sendo mais espesso na membrana corial e mais delgado no córion leve.

O termo corioamnionite pode ser empregado para se referir às condições clínica, sub-clínica e histológica, e a designação corioamnionite clínica é freqüentemente intercambiável com os termos infecção intra-amniótica ou amnionite³. A corioamnionite clínica ocorre em 1% a 2% dos partos de termo e em 5% a 10% dos partos pré-termo, havendo aumento dessa incidência quando há rotura prematura das membranas por tempo prolongado⁴. O diagnóstico de corioamnionite clínica geralmente se baseia na presença de febre materna acima de 38°C, além de pelo menos dois dos seguintes achados: leucocitose materna (acima de 15 mil células/ cm³), taquicardia materna (acima de 100 bpm), taquicardia fetal (acima de 160 bpm) e mau odor do líquido

amniótico⁴. Dentre os fatores de risco associados à corioamnionite clínica estão nuliparidade, baixa idade materna, vaginose bacteriana, trabalho de parto prolongado e presença de mecônio no líquido amniótico^{5,6}.

Corioamnionite histológica é definida como inflamação das membranas corioamnióticas, sendo que tal inflamação resulta geralmente de infecção bacteriana do líquido amniótico, das membranas fetais, da placenta e do útero⁷. A maioria dos casos de corioamnionite histológica ocorre na ausência de sinais clínicos e de sintomas de infecção e este diagnóstico pode ser feito em mais de 20% das gestações de termo e em mais de 50% dos partos pré-termo^{3,8}.

A maioria dos casos de corioamnionite tem como causa a via ascendente de infecção a partir de microrganismos da flora vaginal e da vaginose bacteriana que acessam o trato genital superior através da cérvix. Esse conceito é apoiado pela observação de que, em geral, os microrganismos isolados do líquido amniótico de gestantes com corioamnionite são similares aos encontrados no trato genital inferior, dentre eles *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, Bacteroides, *Prevotella*, *Escherichia coli* e *Streptococcus* do grupo B^{9,10}. Sustentando este conceito, Galask et al.¹¹ descreveram que os microrganismos da flora vaginal apresentam capacidade de atingir as membranas corioamnióticas e infectar a cavidade amniótica. Segundo Gyr et al.¹², alguns desses microrganismos teriam maior capacidade de invasão. Além da via ascendente, outras possíveis rotas de infecção da cavidade amniótica incluem a via transplacentária, infecção retrógrada pélvica e infecção uterina causada por procedimentos médicos como a amniocentese⁷. A corioamnionite pode ser concomitante ou resultar de infecção e inflamação de outros tecidos gestacionais, incluindo decídua (deciduíte), vilos placentários (vilite) e cordão umbilical (onfalite).

Corioamnionite também pode resultar em bacteremia materna e fetal, sepse e aumento das taxas de mortalidade do recém-nascido³.

Além da placenta humana e seus anexos constituírem-se em barreira física contra invasão microbiana da cavidade amniótica, estudos têm mostrado o papel da placenta como barreira imunológica, uma vez que expressa agentes antimicrobianos¹³ e componentes do sistema imune inato, como os receptores *Toll-like* (TLR)¹⁴. Os TLRs pertencem a uma família de receptores transmembrana que reconhecem padrões específicos de origem microbiana. Foram identificadas dez isoformas de receptores *Toll-like* em tecidos humanos, os quais são denominados TLR 1-10¹⁵. Todos os membros da família TLR possuem uma estrutura básica constituída por três domínios: um domínio extracelular que contém repetições ricas em leucina; um domínio transmembrana muito curto e um domínio citoplasmático denominado domínio receptor Toll/IL-1, o qual compartilha uma região conservada de cerca de 200 aminoácidos com o receptor de IL-1¹⁵. A ligação de um TLR ao seu ligante específico culmina na ativação de fatores de transcrição, principalmente o NF- κ B, o qual está envolvido com a regulação da síntese de citocinas pró-inflamatórias e prostaglandinas¹⁵.

Existem diferenças quanto aos principais produtos bacterianos reconhecidos por esses dois tipos de receptores. O TLR-2 está envolvido na resposta a produtos de bactérias gram-positivas, lipoproteínas associadas a micobactérias, peptidoglicano e ácido lipoteicóico assim como ao zimosan da parede fúngica¹⁶⁻²¹, enquanto o TLR-4 é o principal mediador da resposta imune ao lipopolissacarídeo (LPS)²². Esses receptores são especialmente expressos pelo epitélio amniótico²³, constituindo a primeira linha de defesa contra infecção²⁴.

Poucos estudos foram realizados avaliando a expressão de TLR-2 e 4 em tecidos gestacionais na presença de corioamnionite e os resultados são conflitantes^{23, 14,25}. Em estudo recente, utilizando a técnica de imuno-histoquímica, Rindsjö et al.²⁵ descreveram que em todas as placentas estudadas o TLR-2 foi expresso pelo trofoblasto e que em placentas do segundo trimestre de gestação, a expressão de TLR-2 foi confinada ao citotrofoblasto. Ainda segundo esses autores, houve significativa redução da expressão de TLR-2 em placentas com corioamnionite, justificando que a expressão de TLR-2 pelo trofoblasto deve ser afetada pelo processo inflamatório. Esses resultados diferem dos achados de Kim et al.²³ que demonstraram aumento na expressão de TLR-2 em membranas que apresentavam corioamnionite. Para Kumazaki et al.¹⁴ as células de Hofbauer de placentas pré-termo complicadas por corioamnionite demonstraram aumento da imunorreatividade ao TLR-4 quando comparadas com aquelas sem corioamnionite ou com placentas de terceiro trimestre. Entretanto, não podemos deixar de considerar que a discordância entre esses estudos pode refletir diferenças da resposta à infecção nas diferentes partes da placenta. Para Rindsjö et al.²⁵ o mecanismo pelo qual a expressão de TLR-2 pelo trofoblasto é reduzida em placentas infectadas ainda precisa ser elucidado.

Segundo Kim et al.²³ a expressão dos receptores TLR-2 e -4 pelo epitélio amniótico sugerem que esse epitélio não funciona apenas como barreira mecânica aos microrganismos, mas também é requerido na ativação do sistema imune inato. Ainda para esses autores, o aumento na expressão de ambos os receptores em membranas corioamnióticas de gestações com parto espontâneo de termo é um novo conhecimento que corrobora com a associação do parto espontâneo, ainda que modestamente, à resposta inflamatória dos tecidos gestacionais, com produção de citocinas pró-

inflamatórias, conforme descrito por Keelan et al.²⁶. Segundo Muzio et al.²⁷, citocinas inflamatórias têm mostrado regulação positiva na expressão de TLR-2 e -4, e a possível explicação para esses achados é que a expressão aumentada dos TLRs nos tecidos gestacionais no momento do trabalho de parto pode servir para aumento da proteção do hospedeiro contra invasão microbiana da cavidade amniótica, em um momento tão vulnerável da gestação.

Nesse sentido, tem sido mostrado que a expressão de TLR-2 e de TLR-4 é regulada por estímulo microbiano^{2128,29}. Entretanto, segundo Holmlund et al.³⁰ a estimulação de placentas com diferentes concentrações de zimosan e LPS não determinou diferenças de expressão de RNA mensageiro (RNAm) de TLR-2 e de TLR-4 quando comparado com controles não estimulados. Segundo esses autores, é possível que os TLR-2 e -4 estejam normalmente super expressos nos tecidos uterinos como mecanismo de defesa, o qual pode rapidamente ser mobilizado e proteger o feto contra infecções durante a gestação e o parto, corroborando os achados de Muzio et al.²⁷.

Em estudo com camundongos, Gonzalez et al.³¹ avaliaram a expressão de TLRs pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, e demonstraram que a expressão desses receptores é substancialmente diferente no tecido uterino de fêmeas prenhes e não prenhes e que o RNAm dos receptores TLR-2, -3, -4 e -9 aumentam ao longo da prenhez. Esses dados estão de acordo com Beijar et al.³² que relataram que os vilos placentários de primeiro trimestre demonstraram menor expressão de TLR-4 quando comparado com amostras de termo.

Considerando que os TLR-2 e TLR-4 reconhecem a maioria dos microrganismos freqüentemente envolvidos na invasão microbiana da cavidade amniótica e que essa infecção desempenha papel importante na ativação da resposta inflamatória das

membranas corioamnióticas, além de os dados da literatura serem conflitantes em relação à expressão desses receptores na presença de corioamnionite histológica, o estudo da expressão gênica dos TLRs poderá contribuir para o entendimento do papel da imunidade inata nessa complicação gestacional.

3. Objetivo

O objetivo desse estudo é investigar a expressão de TLR-2 e de TLR-4 em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por corioamnionite histológica.

Material e métodos

4. Material e Métodos

4.1. Constituição dos grupos de estudo

Foram incluídas no estudo 48 membranas corioamnióticas coletadas no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, no período de janeiro a novembro de 2008, de gestações pré-termo e de termo, incluindo gestantes portadoras de rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT), trabalho de parto pré-termo (TPP) além de gestações de termo (GT), sendo que todas as gestantes entraram em trabalho de parto para resolução da gestação.

Foram excluídas do estudo as membranas corioamnióticas de gestações complicadas por diabetes, hipertensão, anomalias fetais congênitas comprovadas, gemelaridade, placenta prévia e infecção urinária ou outras infecções.

Para se estabelecer a idade gestacional foi avaliada a data da última menstruação e/ou o exame ultra-sonográfico precoce (até 20 semanas). Nas gestantes que apresentaram RPM-PT, o diagnóstico foi confirmado pela história clínica e constatação de líquido amniótico na cavidade vaginal ou quando isto não foi possível, por meio de testes realizados na secreção do fundo de saco vaginal: cristalização do esfregaço em lâmina seca, queima de esfregaço em lâmina, pH vaginal e pesquisa de células fetais pela coloração do azul de Nilo. O diagnóstico de TPP foi confirmado pela presença de uma ou mais contrações a cada 10 minutos com ritmo e frequência regulares e esvaecimento cervical igual ou superior a 50% e/ou dilatação cervical igual ou superior a 2 cm³³.

Todas as gestantes envolvidas no estudo foram informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1), após

a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (Ofício 316/08-CEP; anexo 2).

4.2. Colheita de membranas corioamnióticas

No momento da resolução da gestação, logo após a dequitação, foram colhidas membranas corioamnióticas de todas as gestantes incluídas no estudo. Fragmentos de 1 cm² da borda das membranas foram coletados com uso de material estéril e acondicionados em tubos de 1,5 mL tipo *ependorf* contendo RNA laterTM (RNA Stabilization Reagent - Qiagen) por 4 horas. Após esse período, os fragmentos foram transferidos para novo tubo e imediatamente armazenados a -80°C. As placentas, membranas corioamnióticas e cordões umbilicais foram fixados e acondicionados em recipiente apropriado contendo formol a 10% para a fixação do material. Após a fixação, fragmentos das membranas corioamnióticas foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol e a seguir incluídos em blocos de parafina. Os blocos obtidos foram seccionados em micrótomo comum, obtendo-se cortes de 6 µm de espessura que foram montados em lâminas de vidro. As lâminas foram coradas pelo método clássico de Hematoxilina-Eosina (HE) para a análise histopatológica das membranas. O critério histopatológico empregado para o diagnóstico de corioamnionite foi o descrito por Hargitai et al³⁴.

4.3. Detecção de RNAm de TLR-2 e de TLR-4 por PCR em tempo real

4.3.1. Extração de RNA

Os fragmentos de membranas corioamnióticas coletados conforme descrito no item 4.2 foram retirados dos tubos tipo *ependorf* e submetidos à extração de RNA total, usando o kit RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Com o auxílio de um bisturi, obteve-se uma quantidade de 30 mg de tecido, a qual foi macerada em cadinho contendo nitrogênio líquido, com posterior adição de 350 μ L de tampão RA1 acrescido de β - mercaptoetanol e lise em vórtex. A seguir, o tecido lisado foi transferido para um filtro com tubo coletor e centrifugado por 1 minuto a 11.000g. Após a centrifugação, o filtro foi descartado e o filtrado transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Foram adicionados 350 μ L de etanol 70% e o conteúdo dos tubos foi homogeneizado no vórtex por duas vezes. Posteriormente, o lisado foi transferido para a coluna com membrana gel-sílica e centrifugado por 30 segundos a 8.000g. Em seguida, foram adicionados 350 μ L de tampão MBD e o material foi centrifugado por 1 minuto a 11.000g para a secagem da membrana de gel-sílica. Em seguida, o filtrado foi descartado e o tubo coletor colocado de volta na coluna. As amostras foram submetidas ao tratamento com a enzima DNase livre de RNase, com objetivo de eliminar possível contaminação com DNA residual genômico. Posteriormente, realizou-se o processo de lavagem do material, no qual primeiramente foram adicionados 200 μ L de tampão RA2 com centrifugação por 1 minuto a 8.000g. Depois as colunas foram transferidas para novos tubos coletores, nos quais foram adicionados 600 μ L de tampão RA3. Os novos tubos coletores foram então centrifugados por 1 minuto a 11.000 g e, após descarte do conteúdo do tubo coletor,

foram adicionados 250 μ L de tampão RA3, com centrifugação por 2 minutos a 11.000g. As colunas foram transferidas para novos tubos de 1,5 μ L e o RNA foi eluído em 40 μ L de água RNase-free. Após o término da extração, verificou-se a eficácia do tratamento com a DNase por amplificação do gene constitutivo da β -globina por PCR direta seguida de visualização em gel de agarose 1,5%. As amostras que não apresentaram essa amplificação foram incluídas no estudo e o RNA extraído foi quantificado pela leitura em aparelho NanoDrop (Eppendorf), na absorvância de 260nm (A_{260}). A pureza do RNA obtido foi determinada pela razão da absorvância de 260 nm pela absorvância de 280nm (A_{260}/A_{280}). Foram consideradas aceitáveis as razões entre 1,8 e 2,1.

4.3.2. Obtenção de cDNA

Em seguida à extração do RNA, as amostras com concentração entre 0,02 e 0,2 μ g/ μ L de RNA foram submetidas à obtenção de cDNA utilizando-se o *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA produzido foi armazenado a - 20 °C para posterior utilização na detecção e quantificação da expressão dos TLRs pela técnica da PCR em tempo real.

4.3.3. PCR em tempo real

A partir do cDNA obtido foi efetuada a amplificação dos genes dos TLR-2 (Hs00610101_m1) e TLR-4 (Hs00370853_m1), de acordo com o protocolo da Applied Biosystems TaqMan[®] Gene Expression Assays em ABI Prism[®] 7300 Sequence Detector, em volume final de 20 μ L com adição de 5 μ L de cDNA das amostras na diluição 1:5. As condições da reação foram de 95°C por 10 minutos, seguidos de 40

ciclos compostos por 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, sendo os sinais de fluorescência adquiridos nos passos de anelamento e extensão do ciclo de amplificação (60 °C por 1 minuto). Em todos os ensaios, as amostras foram processadas em duplicata. Paralelamente, foi realizada a amplificação do gene TBP (TATA box binding protein) (Hs9999910_m1) como controle endógeno, visto que o valor real de expressão gênica foi dado através da comparação do resultado de amplificação dos genes dos TLRs e desse gene constitutivo.

A linearidade de resposta dos *primers* e sondas utilizados foi confirmada pela amplificação da diluição seriada de um *pool* de cDNA produzido a partir do RNA de várias amostras de membranas corioamnióticas incluídas no estudo. Essa mistura de cDNA foi diluída na razão de 1:2 a 1:128 em água ultrapura estéril e estas diluições foram testadas em duplicatas pela PCR em tempo real para TLR-2, TLR-4 e para o gene constitutivo TBP. A menor diluição do cDNA de referência recebeu o valor relativo igual a 1000 e, seguindo a mesma razão da diluição, as outras três diluições do cDNA foram determinadas como 500, 250 e 125 (Figura 1). Depois disso, determinou-se o ponto relativo à diluição 1:4 como ponto de referência, de acordo com a determinação do Ct (*cycle threshold*), o qual foi empregado como parâmetro em todas as reações. A concentração de cada amostra testada foi fornecida diretamente pelo programa SDS 1.2.3, sendo calculada em relação ao ponto de referência.

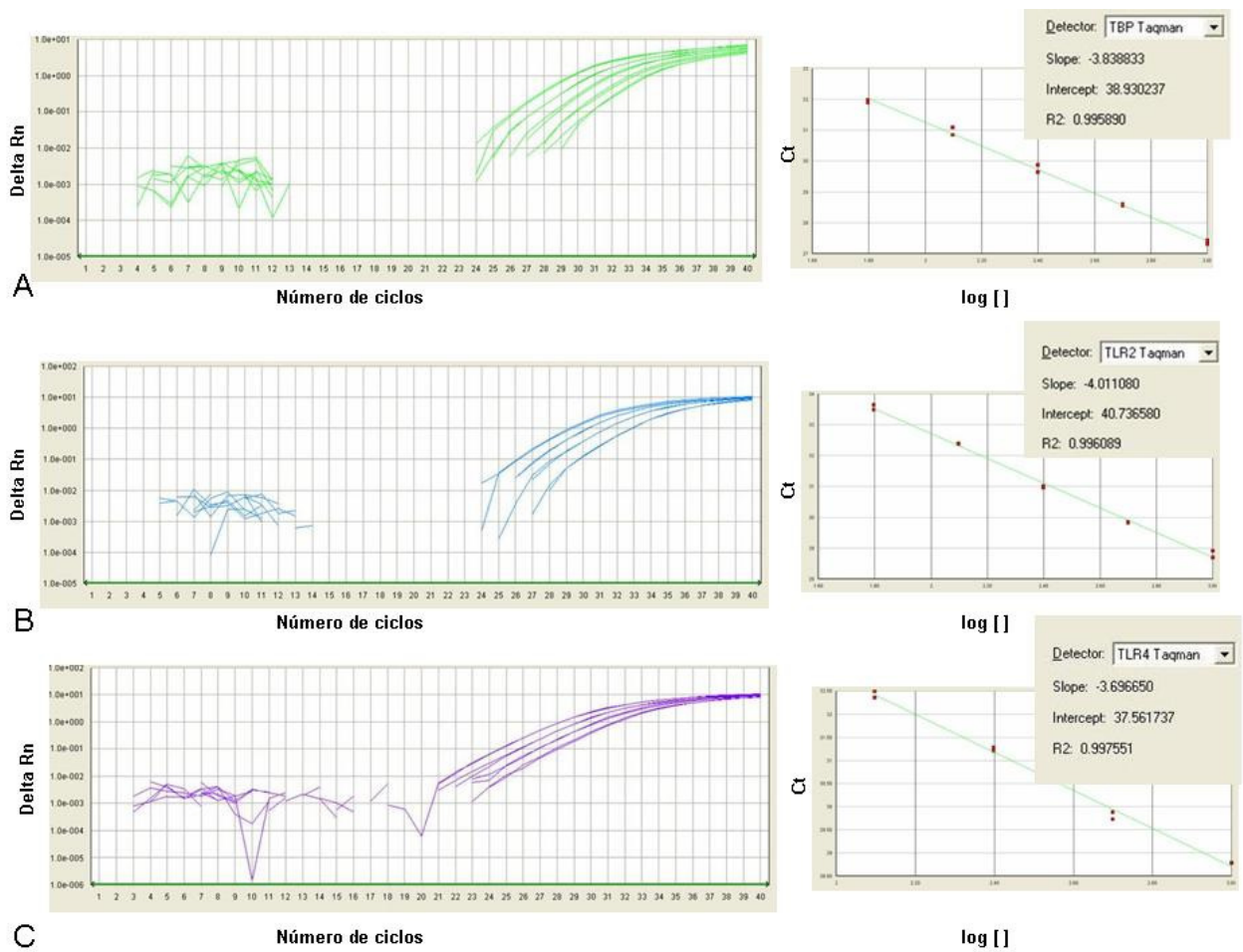


Figura 1. Amplificação da PCR em tempo real dos genes TBP, TLR-2 e TLR-4 (A, B e C respectivamente) nas diluições do *pool* de cDNA utilizado para testar a linearidade de amplificação. Em ordem decrescente, da esquerda para a direita, apresentam-se as diluições 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16.

4.4. Análise Estatística

As concentrações relativas de RNAm entre os TLRs em membranas corioamnióticas bem como as concentrações relativas desses receptores na presença ou não de corioamnionite e entre as gestações pré-termo e de termo foram submetidas ao teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos, após análise da normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (com correção de Lilliefors). A análise estatística foi realizada utilizando-se software SigmaStat 3.1. e o nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5%.

Resultados

5. Resultados

5.1. Análise histopatológica das membranas corioamnióticas

A análise histopatológica referente à presença de infiltrado inflamatório nas membranas corioamnióticas está apresentada na Tabela 1 e nas Figuras 2 e 3. Dentre as 24 membranas corioamnióticas com presença de corioamnionite, 41,7% foram obtidas de gestantes em TPP; 33,3% de gestantes com RPM-PT e 25,0% de gestantes com GT.

Tabela 1. Porcentagem de corioamnionite presente nas membranas corioamnióticas das gestantes com Trabalho de Parto Pré-Termo (TPP); Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo (RPM-PT) e de Gestações de Termo (GT).

	Presença de corioamnionite (n=24) (n %)	Ausência de corioamnionite (n=24) (n %)	Total (n %)
TPP	10 (41,7)	8 (33,3)	18 (37,5)
RPM-PT	8 (33,3)	8 (33,3)	16 (33,3)
GT	6 (25,0)	8 (33,3)	14 (29,2)
Total	24 (100,0)	24 (100,0)	48 (100,0)

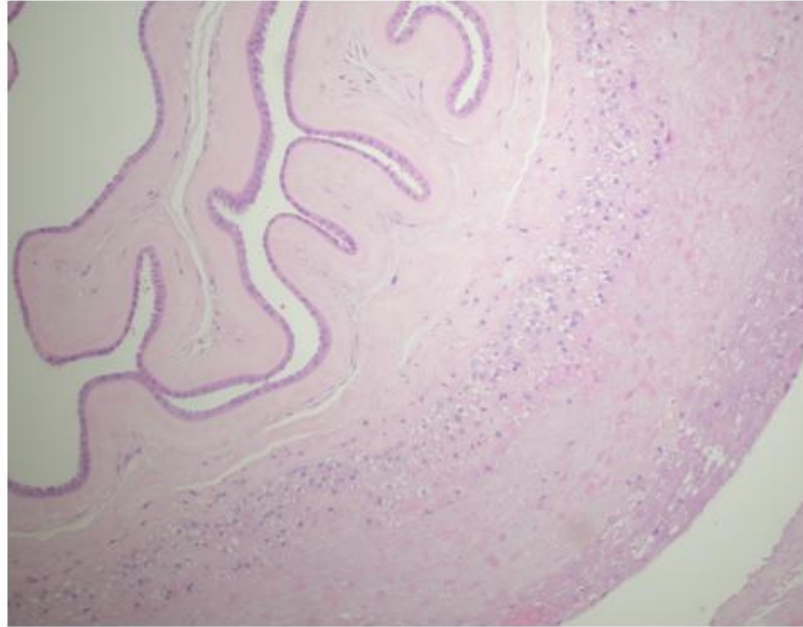


Figura 2. Fotomicrografia das membranas corioamnióticas normais evidenciando âmnio, córion liso e decidua capsular livres de infiltrado inflamatório. HE. 100X.

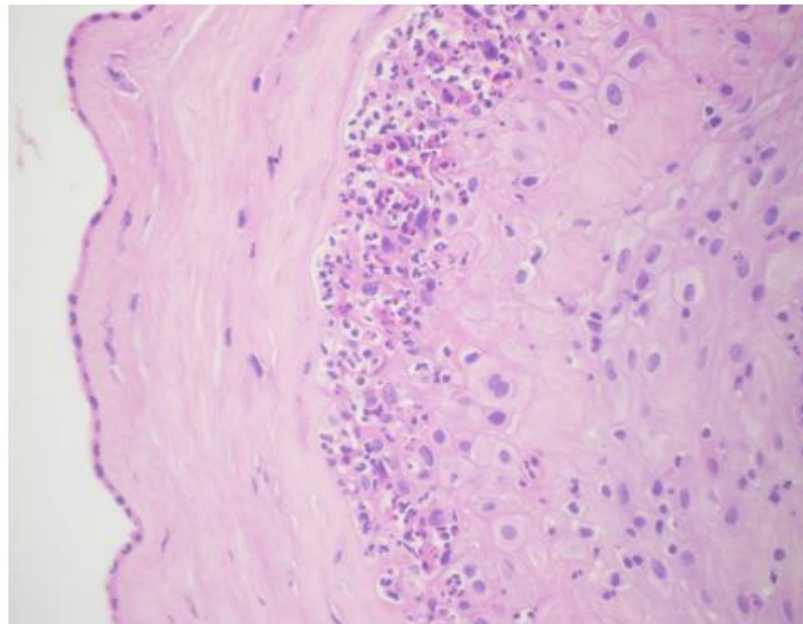


Figura 3. Fotomicrografia das membranas corioamnióticas demonstrando infiltrado inflamatório agudo. HE. 400X.

5.2. Concentração relativa de RNAm de TLR-2 e de TLR-4

5.2.1. Concentração relativa de RNAm de TLR-2 e de TLR-4 nas membranas corioamnióticas

As concentrações relativas de RNAm de TLR-2 e de TLR-4 nas membranas corioamnióticas estão representadas na Figura 4. Observa-se que a concentração de RNAm de TLR-4 foi significativamente superior à de RNAm de TLR-2. Na presença de corioamnionite a concentração de RNAm de TLR-4 foi significativamente maior que a de RNAm de TLR-2, porém, na ausência de corioamnionite não houve diferença estatisticamente significativa entre a concentração relativa de RNAm desses receptores.

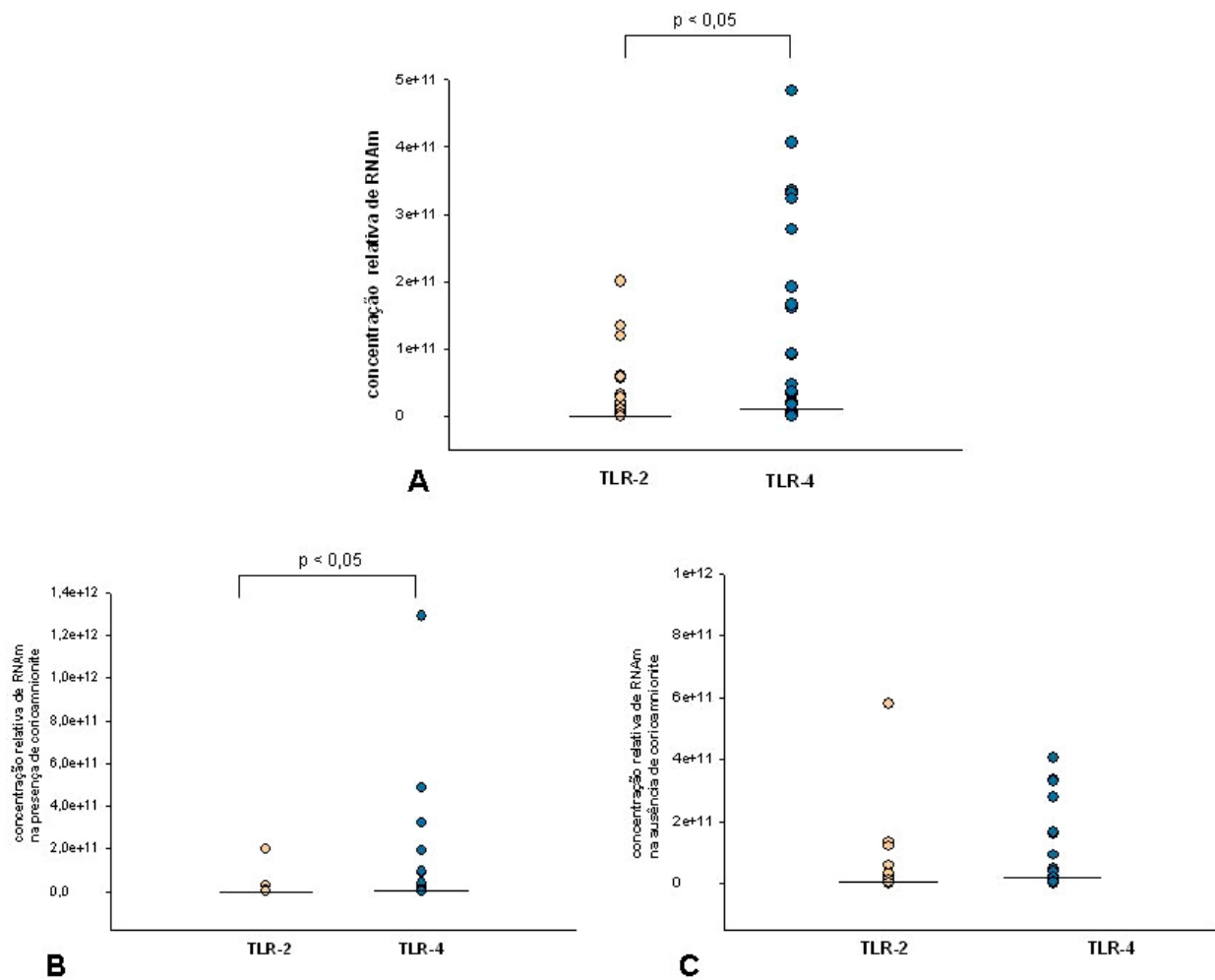


Figura 4. **A.** Concentração relativa de RNAm de TLR-2 e de TLR-4 nas membranas corioamnióticas incluídas no estudo; **B.** Concentração relativa de RNAm de TLR-2 e de TLR-4 na presença de corioamnionite; **C.** Concentração relativa de RNAm de TLR-2 e de TLR-4 na ausência de corioamnionite; teste de Mann-Whitney.

5.2.2. Concentração relativa de RNAm de TLR-2 e de TLR-4 e corioamnionite

As concentrações relativas de RNAm de TLR-2 e de TLR-4 na presença ou não de corioamnionite estão representadas nas Figuras 5 e 6. Observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa na concentração de RNAm de TLR-2 e de TLR-4 entre os grupos com e sem corioamnionite.

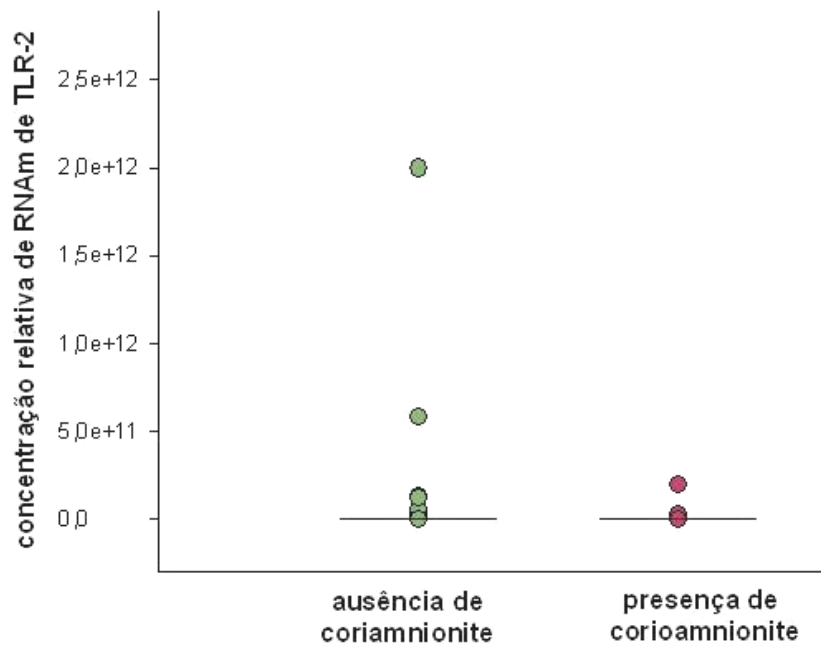


Figura 5. Concentração relativa de RNAm de TLR-2 em membranas corioamnióticas na ausência e na presença de corioamnionite. Teste de Mann-Whitney; $p > 0,05$.

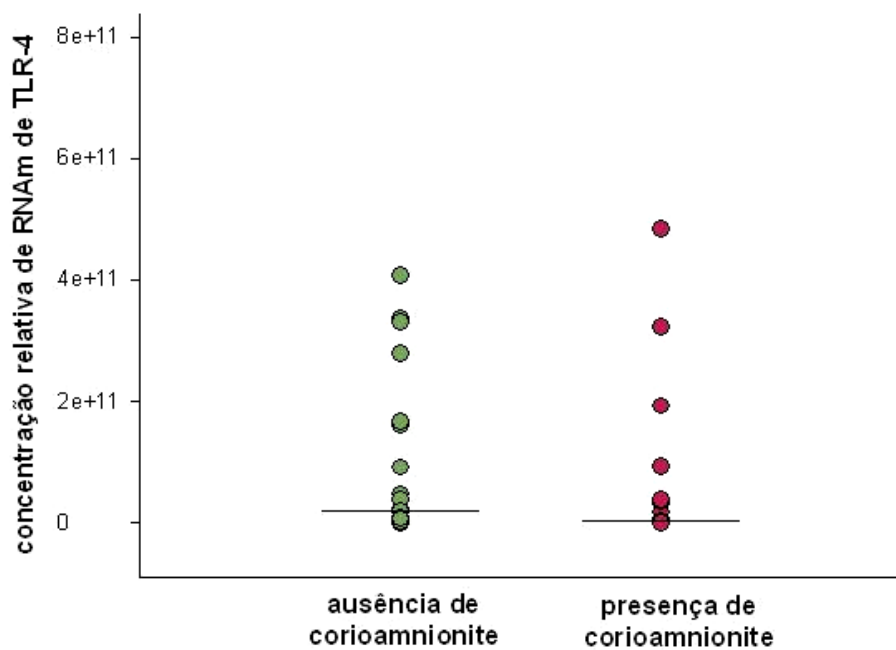


Figura 6: Concentração relativa de RNAm de TLR-4 em membranas corioamnióticas na ausência e na presença de corioamnionite. Teste de Mann-Whitney; $p > 0,05$.

5.2.3. Concentração relativa de RNAm de TLR-2 e de TLR-4 em gestações pré-termo e de termo

As concentrações relativas de RNAm de TLR-2 e de TLR-4 não apresentaram diferença estatisticamente significativa nas membranas de gestações pré-termo em relação às membranas de termo, independente da presença ou não de corioamnionite (Figuras 7 e 8).

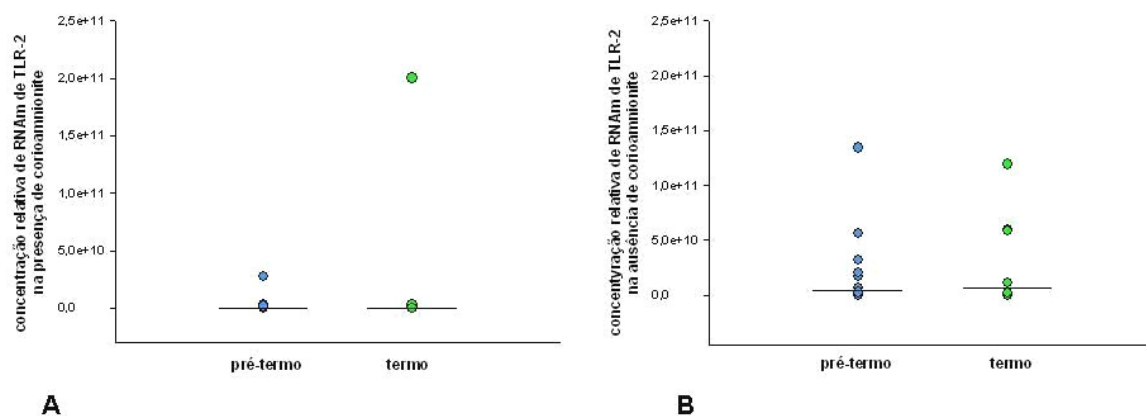


Figura 7. Concentração relativa de RNAm de TLR-2 em membranas corioamnióticas de gestações pré-termo e de termo, na presença ou não de corioamnionite. Teste de Mann-Whitney; $p > 0,05$.

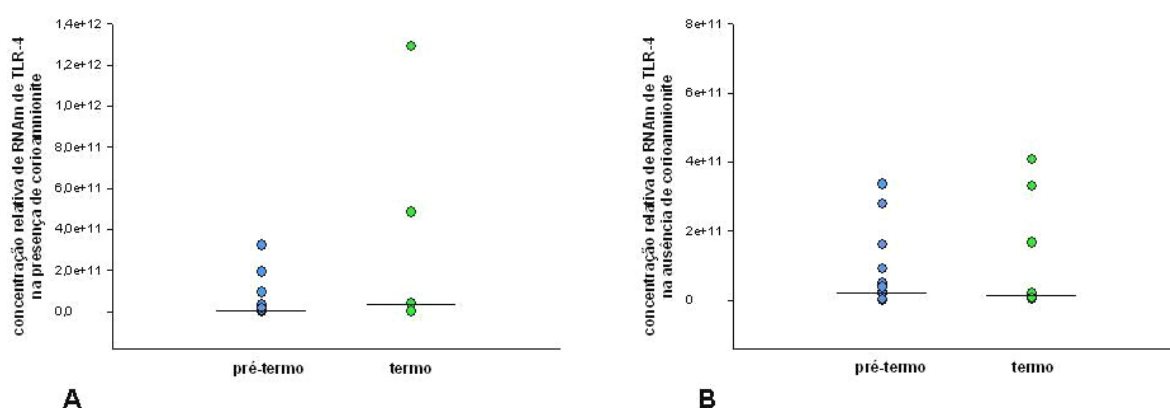


Figura 8. Concentração relativa de RNAm de TLR-4 em membranas corioamnióticas de gestações pré-termo e de termo, na presença ou não de corioamnionite. Teste de Mann-Whitney; $p > 0,05$.

Discussão

6. Discussão

A interface materno-fetal é um local que promove tolerância ao aloenxerto enquanto mantém a resposta do hospedeiro contra possíveis patógenos. Estudos clínicos têm mostrado forte associação entre infecção intra-amniótica e complicações gestacionais³⁵⁻³⁷, sendo que a resposta imune inata contra os microrganismos na interface materno-fetal pode ter significativo impacto no sucesso da gestação. Somado a isso, são crescentes as evidências que o sistema imune inato é ativado na interface materno-fetal.

Os TLRs são expressos em células dendríticas, monócitos e macrófagos³⁸ e em uma variedade de epitélios como do intestino³⁹ e pele⁴⁰ e em tecidos gestacionais e reprodutivos, incluindo células trofoblásticas^{30,41}, deciduais^{42,43}, células endometriais⁴⁴ e no estroma das tubas de Falópio⁴⁵. O TLR-4 foi já foi localizado principalmente no trato genital superior, mas não é expresso na vagina e na ectocérvice, o que pode explicar a ausência de constante ativação do sistema imune na resposta à flora vaginal comensal normal.

Poucos estudos foram realizados avaliando a expressão de TLR-2 e -4 em tecidos gestacionais na presença de corioamnionite e os resultados são conflitantes^{23, 14,25}. No presente estudo, avaliou-se 48 membranas corioamnióticas de gestantes em TPP, RPM-PT e GT, todas em trabalho de parto, para comparar a concentração relativa de RNAm de TLR-2 e de TLR-4 na presença ou não de corioamnionite. A frequência de corioamnionite histológica no presente estudo foi 41,7% nas gestantes com TPP, 33,3% nas gestantes com RPM-PT. Incidência similar é descrita na literatura, variando de 30 a 80 % nos casos de RPM-PT^{46,47} e chegando a 66% nas gestações em TPP⁴⁸. Seong et al.⁴⁹ encontraram 30,4% de corioamnionite em GT em trabalho de

parto, similar à porcentagem encontrada nas membranas corioamnióticas estudadas (25,0%).

Em relação à expressão de RNAm de TLR-2 e de TLR-4 nas membranas corioamnióticas, demonstrou-se que os TLR-2 e -4 são expressos por esse tecido gestacional, corroborando com estudos anteriores que descreveram a presença desses receptores no epitélio amniótico^{23,50}.

Os TLRs reconhecem e ligam-se a padrões moleculares específicos presentes nos patógenos microbianos. O TLR-2 reconhece lipídios e carboidratos da parede de bactérias Gram-positivas, e tem papel chave no reconhecimento de peptidoglicanos, ácido lipoteicóico e lipoproteínas (revisado por Zahringer, 2008⁵¹). O TLR-4 reconhece especialmente o LPS das bactérias Gram-negativas⁵², incluindo aquelas que causam vaginose bacteriana. Essa infecção do trato genital inferior na gestação está intimamente relacionada com o risco de infecção ascendente para a cavidade amniótica⁵³, com conseqüente infiltração neutrofílica tecidual, o que caracteriza a corioamnionite. A infecção intra-amniótica pode apresentar-se como infecção polimicrobiana, o que justifica a expressão dos receptores TLR-2 e -4 nas membranas corioamnióticas, especialmente na presença de processo inflamatório.

No presente estudo a concentração relativa de RNAm de TLR-4 foi estatisticamente superior à de TLR-2, sugerindo predomínio de infecção na cavidade amniótica por microrganismos Gram-negativos. Segundo Romero et al.⁵⁴ os microrganismos mais comumente encontrados na cavidade amniótica são *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*, entretanto outros microrganismos como *Escherichia coli* e *Gardnerella vaginalis* também já foram encontrados⁸, os quais possuem padrões moleculares reconhecíveis por TLR-4. Nesse contexto, a expressão de TLR-4, em

comparação com a de TLR-2, esteve aumentada nos casos de corioamnionite histológica no presente estudo. Adams et al.⁵⁰ descreveram a imunomarcagem de TLR-4 no epitélio amniótico a partir de 10 semanas de gestação, com localização na membrana apical até a gestação de termo sem inflamação. Na presença de corioamnionite, a distribuição desse receptor não se restringe ao ápice das membranas, mas se estende até a camada basal, o que foi confirmado após estimulação com LPS. Esses resultados sugerem que o LPS induz a biossíntese e a distribuição do TLR-4 ao longo do epitélio amniótico. Há de se considerar que a literatura ainda é escassa quanto à comparação de expressão entre RNAm de TLR-2 e de TLR-4 nas membranas corioamnióticas, o que salienta a importância do presente trabalho.

Embora a infecção da cavidade amniótica caracterize-se por infecção polimicrobiana, a expressão de TLR-2 e de TLR-4 não esteve significativamente aumentada na presença de corioamnionite quando comparada com ausência de infiltrado inflamatório. Também não foi encontrada diferença significativa na concentração relativa de RNAm de TLR-2 e de TLR-4 nas membranas corioamnióticas de gestações pré-termo quando comparadas às de termo. Esses achados estão em discordância com outros estudos que demonstraram aumento na expressão desses mesmos receptores em membranas corioamnióticas na presença de inflamação²³. Por outro lado, Holmlund et al.³⁰ descreveram que a expressão de TLR-2 e -4 em tecido placentário, de gestações de termo, não diferiu sob estimulação com LPS ou zimosan. Em estudo recente sobre o TLR-2 em placentas de gestações de termo²⁵, os autores encontraram menor expressão desse receptor nos casos de corioamnionite. Adicionalmente, alguns estudos com TLRs analisaram o RNAm dessas proteínas em tecidos gestacionais *in vitro*, após estímulos inflamatórios^{30,55} e ainda não está claro se

os resultados desses trabalhos foram induzidos pelas condições de estudo, as quais podem influenciar o perfil de expressão gênica. Uma possível interpretação para esses resultados é que existe uma diferença temporal entre a síntese de RNAm e a expressão de proteína, sendo que esta possui uma meia-vida maior que o seu RNAm. Além disso, há de se considerar que esses achados sugerem que a resposta à infecção varia em diferentes partes da interface materno-fetal.

É importante ainda ressaltar que no presente estudo todas as gestantes estavam em trabalho de parto e segundo a literatura, as expressões de TLR-2 e -4 estão aumentadas em tecidos gestacionais no momento do trabalho de parto²³ com o objetivo de aumentar a proteção do hospedeiro contra invasão microbiana da cavidade amniótica, já que nesse momento a cérvix está dilatada e deixa a cavidade amniótica mais susceptível a infecções. Nesse sentido, podemos sugerir que TLR-2 e -4 estejam normalmente super expressos nos tecidos gestacionais durante o trabalho de parto e que não foi possível determinar a influência da corioamnionite nas amostras avaliadas e, sem dúvida, a constituição de grupos de estudo na ausência de trabalho de parto poderia elucidar essa hipótese.

Portanto, baseado na metodologia empregada e nos resultados obtidos, é possível concluir que as membranas corioamnióticas expressam os TLR-2 -4 e que a concentração relativa de RNAm de TLR-4 em relação a concentração de TLR-2 está aumentada na presença de corioamnionite. Entretanto não há diferença na concentração relativa de RNAm de TLR-2 e de TLR-4 na comparação de presença e ausência de corioamnionite, assim como não há diferença na expressão desses receptores, na presença ou não de corioamnionite, entre gestações pré-termo e de

termo. Sem dúvida, esses achados podem ser complementados com a quantificação protéica desses receptores nas membranas corioamnióticas.

Referências bibliográficas

7. Referências bibliográficas

1. Parry S, Strauss JF. Mechanisms of disease: premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998;338:663-70.
2. French JI, McGregor JA. The pathobiology of premature rupture of membranes. *Semin Perinatol* 1996;20:344-68.
3. Edwards RK. Chorioamnionitis and labor. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2005;32:287-96.
4. Gibbs RS, Duff P. Progress in pathogenesis and management of clinical intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:1317-26.
5. Soper DE, Mayhall CG, Dalton HP. Risk factors for intraamniotic infection: a prospective epidemiologic study. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:562-8.
6. Newton ER, Prihoda TJ, Gibbs RS. Logistic regression analysis of risk factors for intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1989;73:571-5.
7. Fahey JO. Clinical management of intra-amniotic infection and chorioamnionitis: a review of the literature. *J Midwifery Womens Health* 2008;53:227-35.
8. Silva MG, Peraçoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Peraçoli MTS. Cervical *Lactobacillus* and leukocyte infiltration premature rupture of membranes. *Int J Gynecol Obstet* 2003; 81:175-82.
9. Gibbs RS, Blanco JD, St Clair PJ, et al. quantitative bacteriology of amniotic fluid from women with clinical intraamniotic infection at term. *J Infect Dis* 1982;145:1-8.
10. Sperling RS, Newton E, Gibbs RS. Intraamniotic infection in low-birth-weight infants. *J Infect Dis* 1988;157:113-7.
11. Galask RP, Varner MW, Petzold CR, Wilbur SL. Bacterial attachment to the chorioamniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148:915-28.

12. Gyr TN, Malek A, Mathez Loic F, et al. Ermeation of human chorioamniotic membranes by *Escherichia coli* in vitro. AM J Obstet Gynecol 1994; 170:223-7.
13. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave J-M, Bocking AD, Challis JRG. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. Placenta 2007; 28:161-9.
14. Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. Hum Pathol 2004;35:47-54.
15. Patni S, Flynn P, Wynen L, Seager A, Morgan G, While J. An introduction to Toll-like receptors and their possible role in the initiation of labour. BJOG 2007;114:1326-34.
16. Peltier MR, Freeman AJ, Mu HH, Cole BC. Characterization and partial purification of a macrophage-stimulating factor from *Mycoplasma hominis*. Am J Reprod Immunol 2005;54:342-51.
17. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell 2006;124:783-801.
18. Underhill D, Ozinsky A, Hajjar A, et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. Nature 1999;401:811-5.
19. Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. Cutting edge: recognition of gram-positive bacterial wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. J Immunol 1999;163:1-5.
20. Iwaki D, Mitsuzawa H, Murakami S, Sano H, Konishi M, Akino T et al. The extracellular toll-like receptor 2 domain directly binds peptidoglycan derived from *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem 2002;277:24315-20.

21. Opitz B, Schroder NW, Spreitzer I, et al. Toll-like receptor -2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappa B translocation. *J Biol Chem* 2001;276:22041-7.
22. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990;249:1431-3.
23. Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, Kim GJ, Kim MR, Kuivaniemi H et al. Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:1346-55.
24. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
25. Rindsjö E, Holmlund U, Sverremark-Ekström E, Papadogiannakis N, Scheynius A. Toll-like receptor -2 expression in normal and pathologic human placenta. *Hum Pathol* 2007;38:468-73.
26. Keelan JA, Marvin KW, Sato TA, Coleman M, McCowan LM, Mitchell MD. Cytokine abundance in placental tissues: evidence of inflammatory activation in gestational membranes with term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:1530-6.
27. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, et al. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000;164:5998-6004.
28. Lin Y, Lee H, Lisant MP, Shapiro L, Scherer PE. The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR) - 4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *J Biol Chem* 2000; 275:187-91.

29. Flo TH, Halaas O, Lien E, et al. Human toll-like receptor - 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes* , but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. J Immunol 2000;164:2064-9.
30. Holmlund U, Cebers G, Dahlfors AR, Sandstedt B, Bremme K, Ekström ES et al. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. Immunology 2002; 107:145-51.
31. Gonzalez JM, Xu H, Ofori E, Elovitz MA. Toll-like receptors in the uterus, cervix and placenta: is pregnancy an immunosuppressed state? Am J Obstet Gynecol 2007;197:296.e1-e6.
32. Beijar EC, Mallard C, Powell TL. Expression and subcellular localization of TLR-4 in term and first trimester human placenta. Placenta 2006;27:322-6.
33. Gestação de alto risco / Secretaria de Políticas, Área Técnica da Saúde da Mulher. Brasília: Ministério da Saúde, 2000.
34. Hargitai B, Marton T, Cox PM. Examination of the human placenta. J Clin Path 2005; 57:775-82.
35. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. Semin Reprod Med 2007;25:21-39.
36. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. N Engl J Med 2000;342:1500-07.
37. Arechavaleta-Velasco F, Koi H, Strauss 3rd JF, Parry S. Viral infection of the trophoblast: time to take a serious look at its role in abnormal implantation and placentation? J Reprod Immunol 2002;55:113-21.
38. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol 2001;2:675-80.

39. Cario E, Brown D, McKee M, Lynch-Devaney K, Gerken G, Podolsky DK. Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor - trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am Journal Pathol* 2002;160:165-73.
40. Baker BS, Ovigne JM, Powles AV, Corcoran S, Fry L. Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 2003;148:670-9.
41. Abrahams VM, Bole-Aldo P, Kim YM, et al. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. *J Immunol* 2004;173:4286-96.
42. Krikun G, Lockwood CJ, Abrahams VM, Mor G, Paidas M, Guller S. Expression of Toll-like receptors in the human decidua. *Histol Histopathol* 2007; 22:847-54.
43. Canavan TP, Simhan H. Innate immune function of the human decidual cell at the maternal-fetal interface. *J Reprol Immunol* 2007;74:46-52.
44. Hirata T, Osuga Y, Hirota Y, et al. Evidence for the presence of toll-like receptor 4 system in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:548-56.
45. Itoh H, Nasu K, Nishida M, Matsumoto H, Yuge A, Narahara H. Human oviductal stromal fibroblasts, but not oviductal epithelial cells, express Toll-like receptor-4 : the site-specific mucosal immunity of the human fallopian tube against bacterial infection. *Am J Reprod Immunol* 2006;56:91-101.
46. Ghidini A, Salafia CM, Kirn V, Doria V, Spong CY. Biophysical profile in predicting acute ascending infection in preterm rupture of membranes before 32 weeks. *Obstet Gynecol.* 2000;96:201-206.
47. Hensch SA, Stephens L, Markenson G, Bsat F. Prediction of pregnancy outcome in preterm premature rupture of membranes using vaginal pool amniotic fluid markers. *Obstet Gynecol.* 2001;97:S5.

48. Lahra MM, Jeffery HE. A fetal response to chorioamnionitis is associated with early survival after preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:147-51.
49. Seong HS, Lee SE, Kang JH, Romero R, Yoon BH. The frequency of microbial invasion of the amniotic cavity and histologic chorioamnionitis in women at term with intact membranes in the presence or absence of labor. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:375e1-375e5.
50. Adams KM, Lucas J, Kapur RP, Stevens AM. LPS induces translocation of TLR4 in amniotic epithelium. *Placenta* 2007;28:477-81.
51. Zahringer U, Lindner B, Inamura S, Heine H, Alexander C. TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology* 2008;213:205-24.
52. Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol* 2001;1:625-35.
53. Yudin MH. Bacterial vaginosis in pregnancy: diagnosis, screening and management. *Clin Perinatol* 2005;32:617-27.
54. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11:317-26.
55. Ma Y, Krikun G, Abrahams VM, Mor G, Guller S. Cell type-specific expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human placenta: implications in fetal infection. *Placenta* 2007;28:1024-31.

Anexos



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Distrito de Rubião Júnior, s/nº - Caixa Postal 564 - CEP 18.618-000 - Botucatu - SP - Brasil
(0143811-6238 - Ramais 6146/6042/6238 - Fax (014) 3815-2348

FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos a senhora para participar da pesquisa “**Expressão de receptores Toll like-2 e 4 em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por corioamnionite**” que tem por objetivo avaliar a expressão de proteínas das membranas que formam a bolsa das águas que envolve o feto durante a gestação. Esta pesquisa é de responsabilidade da graduanda Natália Prearo Moço, com a orientação da Profª Drª. Márcia Guimarães da Silva, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu e participação da pós-graduanda Jossimara Poletini e do Prof. Dr. José Carlos Peraçoli do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. No momento do parto, após retirada da placenta, as membranas serão coletadas para análise. Após retirada do fragmento necessário para a pesquisa, o restante da placenta será encaminhada para incineração.

Pelo presente instrumento, eu _____
devidamente esclarecida, ciente da autorização a mim solicitada, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, e ciente, também, de que as informações serão utilizadas exclusivamente pelas pesquisadoras, que manterão sigilo sobre minha identidade, e que as mesmas estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas e de que **posso retirar este consentimento a qualquer hora sem prejuízo do meu atendimento neste serviço**, firmo meu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**, concordando em participar da pesquisa proposta. Estou ciente também que este estudo não trará benefício imediato para minha gestação.

Botucatu, _____ de _____ de 200_

Assinatura da paciente

Natália Prearo Moço
Rua Av. Camilo Mazoni, 1055
Jardim Paraíso, Botucatu, 18610-285
Fone: (14) 3882 95 96

Profª. Drª. Márcia Guimarães da Silva
Rua Izidoro Bertaglia, 746
Jardim Paraíso II, Botucatu, 18610-140
Fone: (14) 3815 24 1



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, 04 de agosto de 2008

Of. 316/08-CEP

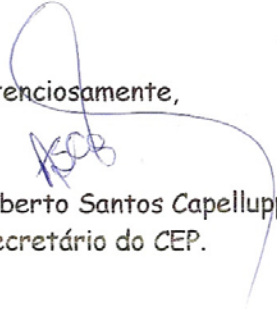
Ilustríssima Senhora
Prof^a Dr^a Márcia Guimarães Silva
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Dr^a Márcia,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Expressão de receptores Toll like-2 e 4 em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por corioamnionite", a ser conduzido por Natália Prearo Moço, orientada por Vossa Senhoria, com a colaboração dos Drs. Jossimara Polettini e José Carlos Peraçoli, recebeu do relator **parecer favorável**, aprovado em reunião de 04/08/2.008.

Situação do Projeto: **APROVADO**. **Apresentar Relatório Final de Atividades ao final da execução deste projeto.**

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.