



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS PASSO FUNDO
CURSO DE MEDICINA**

RAFAELA CAMELO

PESQUISA DE MICOPLASMA E UREAPLASMA EM TECIDOS PLACENTÁRIOS

PASSO FUNDO - RS

2021

RAFAELA CAMELO

PESQUISA DE MICOPLASMA E UREAPLASMA EM TECIDOS PLACENTÁRIOS

Trabalho de Conclusão do Curso de graduação apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Médico da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jossimara Poletini

Coorientadora: Prof^a. Ms^a. Daniela Augustin Silveira.

PASSO FUNDO – RS

2021

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Camelo, Rafaela

Pesquisa de micoplasma e ureaplasma em tecidos placentários / Rafaela Camelo. -- 2021.
71 f.

Orientadora: Prof^a. Dra. Jossimara Polettini
Co-orientadora: Prof^a. Ms^a. Daniela Augustin Silveira
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina, Passo Fundo, RS, 2021.

1. Micoplasma. 2. Ureaplasma. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. 4. Gestação. I. Polettini, Jossimara, orient. II. Silveira, Daniela Augustin, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

RAFAELA CAMELO

PESQUISA DE MICOPLASMA E UREAPLASMA EM TECIDOS PLACENTÁRIOS

Trabalho de Conclusão do Curso de graduação apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Médico da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo.

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi defendido e aprovado pela banca em:

____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Jossimara Polettini
Orientadora

Prof^a. Caroline Rizzi – UFFS

Prof^a. Thieli Maldaner Budke - UFFS

RESUMO

Trata-se de um Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) de Graduação, realizado pela acadêmica Rafaela Camelo, orientado pela professora Jossimara Polettini e coorientado pela professora Daniela Augustin Silveira, elaborado conforme as normas do Manual de Trabalhos Acadêmicos da Universidade Federal da Fronteira Sul e está em conformidade com o Regulamento de TCC do Curso de Graduação em Medicina do campus Passo Fundo. Este trabalho é composto pelo projeto de pesquisa, relatório de atividades e artigo científico, tendo sido desenvolvido durante o quinto, o sexto e o sétimo semestres do curso de Medicina nos componentes curriculares de Pesquisa em Saúde, TCC I e TCC II, quando foram realizadas as etapas de escrita do projeto, relatório de pesquisa e versão final pela produção do artigo científico, respectivamente. Consta, então, de um estudo quantitativo, observacional, transversal, descritivo e analítico.

Palavras-chave: Micoplasma. Ureaplasma. Reação em Cadeia da Polimerase. Gestação.

ABSTRACT

This is an Undergraduate Final Paper, performed by the academic Rafaela Camelo, advised by Professor Jossimara Poletini and joint advised by Professor Daniela Augustin Silveira, prepared according to the Manual of Academic Works norms of the Federal University of Fronteira Sul and is in accordance with the Undergraduate Final Paper Course Regulation of the Undergraduate Medical Course in Passo Fundo campus. This work consists of the research project, activity report and scientific article, having been developed during the fifth, sixth and seventh semesters of the Medicine course in the curricular components of Health Research, TCC I and TCC II, when they were carried out the stages of writing the project, research report and final version for the production of the scientific article, respectively. It consists of a quantitative, observational, cross-sectional, descriptive and analytical study.

Keywords: Mycoplasma. Ureaplasma. Polymerase Chain Reaction. Pregnancy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 DESENVOLVIMENTO	10
2.1 PROJETO DE PESQUISA	10
2.1.1 Resumo	10
2.1.2 Tema	11
2.1.3 Problema	11
2.1.4 Hipóteses	11
2.1.5 Objetivos	11
2.1.5.1 Objetivos específicos	12
2.1.6 Justificativa	12
2.1.7 Referencial teórico	13
2.1.8 Metodologia	16
2.1.8.1 Tipo de estudo	16
2.1.8.2 Local e período de realização	17
2.1.8.3 População e amostragem	17
2.1.8.4 Variáveis e coleta de dados	18
2.1.8.5 Processamento, controle de qualidade e análise dos dados	20
2.1.8.6 Aspectos éticos	21
2.1.9 Recursos	22
2.1.10 Cronograma	22
2.1.11 Referências	23
2.1.12 Apêndices	26
APÊNDICE A – FICHA DE TRANSCRIÇÃO DE DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E RESULTADO DA ANÁLISE PCR	26
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	28
APÊNDICE C – TERMO DE COMPROMISSO PARA USO DE DADOS EM ARQUIVO	30
2.2 RELATÓRIO DE PESQUISA	31
3. ARTIGO CIENTÍFICO	34
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
5. APÊNDICES	56
APÊNDICE A – NOVA FICHA DE TRANSCRIÇÃO DE DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS, GESTACIONAIS E RESULTADO DAS ANÁLISES PCR	56
6. ANEXOS	60

ANEXO A – ACEITE DE ORIENTAÇÃO E COORIENTAÇÃO	60
ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	61
ANEXO C – PARECER DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	62
ANEXO D – NORMAS DA REVISTA PARA SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO	64
ANEXO E – TERMO DE CIÊNCIA DO VOLUME FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO	70

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a taxa de prematuridade no mundo é de 15 milhões/ano (OMS, 2012). Entre as causas multifatoriais para o parto pré-termo, ou seja, antes de 37 semanas de gestação, a mais expressiva é a infecção de tecidos placentários. Neste contexto, a invasão de microrganismos nos tecidos placentários, sejam eles advindos da microbiota vaginal ou de infecções do trato urinário, ou, menos frequentemente, por via hematogênica através da placenta, está associada ao aumento do risco de parto prematuro (GRAVETT; RUBENS; NUNES, 2010).

Dentre os microrganismos relacionados à ocorrência de partos pré-termo estão os dos gêneros bacterianos micoplasma e ureaplasma, sendo esses relacionados a desfechos gestacionais adversos, como rotura prematura de membranas e corioamnionite (inflamação das membranas fetais) (MARCONI et al., 2011; PARARAS; SKEVAKI; KAFETZIS, 2006). Adicionalmente, morbidades neo e perinatais como displasia broncopulmonar, hemorragia intraventricular e enterocolite necrosante têm sido relacionadas à presença dessas bactérias no ambiente intrauterino (VISCARDI, 2014)

Dados de Mendz et al. (2013), em revisão sistemática, demonstram que, dentre mulheres com colonização bacteriana intrauterina, 58,7% apresentaram micoplasmas e ureaplasma, sendo especificamente 32,1% *Ureaplasma ssp.* e 9,5% *Mycoplasma hominis*. Mesmo na vigência de parto cesárea, sem contato da placenta com canal vaginal, observa-se 9,6% de positividade de micoplasmas e ureaplasmas em parênquima placentário. Desse modo, constata-se que tais gêneros bacterianos frequentemente colonizam o trato geniturinário, demonstrando sua possível patogenicidade durante o período gestacional (COX et al., 2013). Por outro lado, Kacerovsky et al. (2014) reportaram que, mesmo uma carga microbiana alta de DNA de espécies de micoplasmas no cordão umbilical em gestações complicadas por rotura prematura de membranas não apresenta alta resposta inflamatória fetal e, portanto, parece não induzir morbidade neonatal. Dessa forma, observa-se que a fisiopatologia desses microrganismos no contexto gestacional ainda não está bem elucidado e, portanto, o conhecimento da frequência, etiologia, patogênese, diagnóstico e manejo de infecções na gestação, parto e período neonatal se torna

pertinente, pois tais infecções podem causar prejuízos para o feto e recém-nascido, tanto de maneira aguda quanto persistente, mesmo se não expressos no momento do nascimento (MUSSI-PINHATA; YAMAMOTO, 1999).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 PROJETO DE PESQUISA

2.1.1 Resumo

Micoplasma e ureaplasma são gêneros bacterianos que causam infecções nas mucosas, sendo as infecções do trato respiratório e urogenital as mais comuns. Estudos recentes buscam elucidar a relação destas bactérias com desfechos gestacionais, como prematuridade e infecção vertical. O objetivo do presente projeto é determinar a prevalência de micoplasma e ureaplasma em tecidos placentários. Trata-se de um estudo transversal, sendo a amostra composta por pacientes parturientes do Hospital São Vicente de Paulo, de Passo Fundo/RS, atendidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), cujas placentas foram encaminhadas para análise anatomopatológica no ano de 2017, no Laboratório de Patologia do referido hospital, devido a situações agravantes no parto ou em relação à mãe e recém-nascido, critérios determinados pela equipe obstétrica. As amostras de tecidos placentários incluídos em parafina serão seccionados em micrótomo comum, desparafinizados e submetidos à extração de DNA total, o qual será analisado através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para verificação da presença de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. A prevalência dos gêneros bacterianos será relacionada com o perfil da parturiente e as características do parto e do recém-nascido, dados esses coletados dos prontuários médicos da mãe e do recém-nascido. De acordo com estudos semelhantes, espera-se encontrar a positividade para o micoplasma e ureaplasma em cerca de 9% das amostras de placentas analisadas.

Palavras-chave: Micoplasma. Ureaplasma. Reação em Cadeia da Polimerase. Gestação.

2.1.2 Tema

Detecção de micoplasma e ureaplasma em tecidos placentários.

2.1.3 Problema

Qual a prevalência de micoplasma e ureaplasma em tecido placentário da população estudada?

Qual a relação da positividade de micoplasma e ureaplasma com desfechos gestacionais como o trabalho de parto prematuro e a rotura prematura de membranas?

Qual a relação da positividade de micoplasma e ureaplasma com os desfechos neonatais como baixo peso ao nascer e Apgar de primeiro e quinto minutos?

2.1.4 Hipóteses

Estima-se que a prevalência de colonização placentária por micoplasma e ureaplasma seja de 9%.

A presença de micoplasma e ureaplasma está relacionada com adversidades gestacionais como prematuridade e rotura prematura de membranas.

A presença de micoplasma e ureaplasma está relacionada com recém-nascido de baixo peso e menor APGAR de primeiro e quinto minutos.

2.1.5 Objetivos

2.1.5.1 Objetivo geral

Determinar a prevalência de micoplasma e de ureaplasma em tecidos placentários.

2.1.5.1 Objetivos específicos

Determinar taxa de co-infecção por micoplasma e ureaplasma nos tecidos placentários;

Relacionar a positividade de micoplasma e ureaplasma nos tecidos placentários com os desfechos gestacionais como trabalho de parto pré-termo e rotura prematura de membranas pré-termo;

Relacionar a positividade de micoplasma e ureaplasma nos tecidos placentários com os desfechos neonatais como baixo peso ao nascer e Apgar no primeiro e quinto minutos.

2.1.6 Justificativa

Complicações gestacionais relacionadas à infecção por micoplasma e ureaplasma nos tecidos placentários são relatadas na literatura, incluindo corioamnionite, rotura prematura de membrana, adversidades nos recém-nascidos e risco aumentado de parto pré-termo. Sabe-se que a morbidade e a mortalidade neonatal e infantil são secundárias à prematuridade em mais da metade dos casos (BITTAR, 2018). Dessa forma, conhecer a presença do micoplasma e ureaplasma nos tecidos placentários são de extrema importância para o entendimento do processo inflamatório que tais microrganismos podem desencadear.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, ocorrem cerca de 15 milhões de partos prematuros anualmente (OMS, 2012), e, portanto, o rastreio preventivo de agentes com potencial de desencadear tal desfecho, acompanhado de um manejo terapêutico coerente, mostra-se um importante fator preditivo no entendimento da fisiopatologia do trabalho de parto precoce, assim como no planejamento de gestação futura, a fim de evitar complicações. Sendo assim, investigações quanto à positividade de micoplasma e ureaplasma e sua relação com os desfechos gestacionais são essenciais para colaborar com estudos que visem compreender as causas multifatoriais do parto prematuro. Além disso, há poucos dados relatados sobre este tema na região, mostrando assim, a importância deste estudo para agregar

conhecimento para os serviços de saúde regionais, colaborando para ações diagnósticas e preventivas.

2.1.7 Referencial teórico

2.1.7.1 Microbiota vaginal e suas alterações

A microbiota vaginal considerada normal tem sido atribuída àquela predominantemente colonizada por *Lactobacillus* spp. Atualmente sabe-se que em algumas mulheres pode haver variabilidade de tais espécies bacterianas predominantes, sendo possível a mulher ser assintomática e saudável (FETTWEIS et al., 2019). Além disso, é relatado que, na gestação, pode ocorrer modificação da microbiota vaginal, a qual se ajusta conforme a idade gestacional e paridade (ROMERO et al., 2014; ELOVITZ et al., 2019). Relatos da população brasileira demonstram que aproximadamente metade das gestantes assintomáticas apresentam alteração de microbiota, sendo a vaginose bacteriana, na qual ocorre substituição de *Lactobacilos* por microbiota cocácea predominante de anaeróbios, identificada em cerca de 22% das gestantes (GONDO et al., 2011).

Tais alterações da microbiota vaginal têm sido apontadas como um fator de risco para complicações gestacionais (CARVALHO et al., 2001). Por exemplo, a vaginose bacteriana torna possível aos microrganismos desencadear resposta inflamatória, garantindo uma resposta imune inata, com liberação de citocinas pró-inflamatórias que podem ativar contratilidade uterina e conseqüente parto prematuro (FETTWEIS et al., 2019).

ELOVITZ et al. (2019) salientaram os achados de que não ter *Lactobacillus* spp. dominante na microbiota cervicovaginal está fortemente associado a resultados adversos da gravidez, incluindo prematuridade. O estudo mostrou que mulheres afro-americanas com microbiota cervicovaginal pobre em *Lactobacillus* spp., somado a fatores como baixa de defensas, um antimicrobiano natural, apresentaram maior número de partos pré-termo. Um estudo de coorte de mulheres grávidas predominantemente afro-americanas, revelou que uma diminuição significativa na abundância e na diversidade da microbiota vaginal e a menor estabilidade dos microrganismos constituintes da comunidade bacteriana local estão associadas ao

parto prematuro (STOUT et al, 2017). O estudo mostrou ainda que microbiotas pobres em lactobacilos tinham taxa maior de outros microrganismos, entre eles o micoplasma. Ademais, a análise mostrou que a incidência de ureaplasma aumentou entre as mulheres afro-americanas no segundo e terceiro trimestre entre aquelas que desencadearam trabalho de parto prematuro.

Nesse contexto, destacam-se as espécies de micoplasmas e ureaplasmas, especificamente *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*, organismos mais comuns isolados do líquido amniótico e placentas infectados, os quais, portanto, são relatados como principais colonizadores da cavidade amniótica e, epidemiologicamente, são relacionados a desfechos gestacionais complicados, embora a relação causal ainda não esteja totalmente estabelecida.

2.1.7.2 Colonização de tecidos placentários por micoplasma e ureaplasma e sua relação com desfechos gestacionais e neonatais

Evidências em humanos e modelos animais sugerem etiologias infecciosas para parto pré-termo, as quais podem se originar no trato geniturinário inferior, mas também que a transmissão hematogênica é via alternativa de infecção (MYSOREKAR; CAO, 2014). Patógenos que são normalmente encontrados no trato gastrointestinal também podem atingir a vagina, causando invasão hematogênica do útero. Tem-se o exemplo da bactéria *Listeria monocytogenes*, a qual atravessa a barreira mucosa do intestino para disseminar via hematogênica para qualquer local, com uma tendência única de infectar a unidade fetoplacentária (BAUD; GREUB, 2011). A maior implicação da infecção intra-amniótica é a indução de parto pré-termo (COX et al., 2013). No entanto, a principal via de infecção é a ascendente da microbiota vaginal, hipótese essa constatada pela observação de que, na maioria dos casos de infecção intrauterina, os microrganismos isolados do líquido amniótico são os mesmos encontrados no trato genital inferior (ROMERO et al., 2006; SILVA et al., 2003; DIGIULIO, 2012). Ressalta-se que a cavidade amniótica deve ser estéril na sua normalidade, entretanto, a alteração da composição vaginal e do pH predispõe a subida de microrganismos para esta cavidade. A modificação do pH reflete em uma perda de dominância de *Lactobacillus* e, conseqüentemente, um crescimento de espécies comensais anaeróbicas, incluindo bactérias da família de micoplasmas e ureaplasmas (REDELINGHUYS et al., 2013; ALLEN-DANIELS et al., 2015).

MICHOU et al. (2014), isolaram DNA de *Mycoplasma hominis* em 13,7% e *Ureaplasma urealyticum* em 18,8% de amostras de tecidos menstruais de mulheres com problemas de fertilidade. Estes achados têm sido relacionados com o desenvolvimento de inflamação pélvica, abortos espontâneos e infertilidade. Além das condições acima citadas, esses microrganismos foram também relatados em casos de abortos de repetição, demonstrando a importância dos mesmos nas adversidades gestacionais (LATINO et al., 2018).

Um estudo de revisão sistemática, que incluiu 761 mulheres que tiveram parto pré termo, das quais 349 (46%) apresentaram infecção intrauterina, revelou que as maiores frequências foram de bactérias da ordem Mycoplasmatales, o qual é composto pelos gêneros micoplasma e ureaplasma. Bactérias do gênero *Ureaplasma* foram detectadas em 172 mulheres com infecção (49%), sendo que as espécies patogênicas genitais reconhecidas em altas frequências foram especificamente 32,1% *Ureaplasma urealyticum* e 9,5% *Mycoplasma hominis*. Este estudo apontou táxons presentes em frequências mais altas pertencentes a bactérias normalmente encontradas nos tratos urogenital e gastrointestinal (MENDZ; KAAKOUUSH; QUINLIVAN, 2013) sendo assim, estes achados suportam a hipótese de que a maioria dos casos de corioamnionite surge de patógenos ascendentes da vagina (LATINO et al., 2018).

COX et al. (2013), em um estudo de caso-controle, analisaram histologicamente 57 amostras de placentas de mulheres que deram à luz antes de 37 semanas de gestação com e sem inflamação das membranas corioamnióticas, quadro esse estabelecido pela infiltração tecidual por leucócitos polimorfonucleares. Assim, a inflamação foi confirmada em 24 (42,1%) placentas no estudo, sugerindo que cerca de 40% dos nascimentos prematuros estavam potencialmente relacionados à infecção. Os autores relatam ainda que a detecção de *Ureaplasma urealyticum* foi mais comum no tecido placentário com inflamação, sugerindo possível associação desses microrganismos com ativação inflamatória e consequente trabalho de parto prematuro.

Como consequência da infecção e inflamação intrauterina, pode-se destacar a ocorrência de morte neonatal, sepse neonatal de início precoce, restrição de crescimento intrauterino, comprometimento/lesão neurológica, hemorragia intraventricular e displasia broncopulmonar (SWEENEY et al., 2017). Dessa forma,

evidencia-se a importância do conhecimento das prevalências de microrganismos invasores da cavidade amniótica e, com isso, melhores medidas de diagnóstico precoce e intervenção poderão ser desenvolvidas para diminuir os resultados negativos neonatais.

2.1.7.3 Técnica de detecção de microrganismos por PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica de biologia molecular muito utilizada atualmente para investigar a presença do material genético de microrganismos em uma determinada amostra biológica. Essa importante ferramenta utiliza uma sequência de material genético (DNA ou RNA) específico e correspondente do microrganismo estudado, e, portanto, apresenta alta especificidade (TSAKOIANNIS et al., 2017). Dessa forma, a análise de tecidos placentários pela referida técnica é viável quanto ao objetivo de determinar a prevalência de colonização uterina por micoplasma e ureaplasma, microrganismos relacionados com desfechos gestacionais desfavoráveis.

Avaliação microscópica de secreções cervicovaginais é uma ferramenta para diagnosticar infecções dessa região, e, muitas vezes, pode refletir a infecção intramniótica. Entretanto, muitas espécies de microrganismos são fastidiosas, e a identificação por método clássico de microbiologia torna-se inviável. Estima-se que tais métodos confirmem apenas 70 a 80% das infecções do trato genital inferior e uma porcentagem ainda menor do superior, o que dificulta o diagnóstico totalmente correto e consequente tratamento (MICHOU et al., 2014). Dessa forma, a técnica de PCR é importante aliada para detecção dos microrganismos invasores da cavidade amniótica.

Portanto, o conhecimento de infecções nos tecidos placentários pode contribuir ao entendimento da fisiopatologia bacteriana e disfunção placentária, que pode provocar desfechos gestacionais e neonatais adversos.

2.1.8 Metodologia

2.1.8.1 Tipo de estudo

Estudo quantitativo, observacional, transversal, descritivo e analítico.

2.1.8.2 Local e período de realização

O estudo será realizado durante o período de março a novembro de 2020 no Laboratório de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal da Fronteira Sul, em Passo Fundo – RS.

2.1.8.3 População e amostragem

A população do estudo será constituída por pacientes parturientes do Hospital São Vicente de Paulo, atendidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), cuja placenta foi encaminhada para análise, devido a situações agravantes no parto ou em relação à mãe e recém-nascido, critérios determinados pela equipe obstétrica. A amostra, não probabilística, selecionada por conveniência, será constituída de pacientes cujas placentas foram encaminhadas para análise anatomopatológica no período de janeiro a dezembro de 2017 no laboratório de Patologia do referido hospital. O tamanho amostral será baseado em dados prévios do estudo “Pesquisa de Papiloma Vírus Humano (HPV) em tecidos placentários” em desenvolvimento na UFFS pela acadêmica do curso de Medicina Roberta Klering. Até o momento, no referido trabalho, está sendo realizada a etapa de levantamento do número de casos através de pesquisa no livro de registros de exames anatomopatológicos de placentas realizados no laboratório, e estima-se que tenham sido analisadas 300 placentas no referido período.

Critério de inclusão: todas as parturientes cuja placenta foi encaminhada para o setor de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo, pelo convênio do Sistema Único de Saúde (SUS), para análise anatomopatológica, no ano de 2017.

Quanto aos critérios de exclusão, serão considerados prontuários com o dado de desfecho gestacional (item 1 do Apêndice A) incompleto e inadequabilidade da amostra para realização das técnicas moleculares, como material genético degradado.

2.1.8.4 Variáveis e coleta de dados

Após aprovação da Comissão de Pesquisa e Pós-Graduação do HSVP e do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, a análise dos prontuários será iniciada em maio de 2020. Na primeira etapa do projeto, a acadêmica da equipe de pesquisa se deslocará para a sala de estudo do Laboratório de Patologia do HSVP quinzenalmente. Nesse período, estará disponível um computador para uso, com senha própria de acesso ao sistema, fornecida pelo serviço para coleta das variáveis. No segundo momento, a acadêmica realizará os procedimentos laboratoriais semanalmente, com a supervisão da docente-orientadora.

Com a finalidade de discutir e de organizar os achados do estudo, serão realizadas reuniões quinzenais junto à orientadora e coorientadora. A data e o horário serão definidos previamente, com duração de aproximadamente 1h30min. Para a obtenção dos dados e amostras que serão utilizados na pesquisa, será realizada uma busca no livro de registros de análises anatomopatológicas de placentas, de pacientes que realizaram seu parto na maternidade do Hospital São Vicente de Paulo, R. Teixeira Soares, 808 – Centro de Passo Fundo – RS, no ano de 2017, pelo convênio do Sistema Único de Saúde (SUS), e que tiveram suas placentas encaminhadas para análise anatomopatológica. Nos livros de registros do Laboratório de Patologia do HSVP estão contidos os nomes e os números de prontuários de todas as pacientes. A partir desse número, será realizada a busca dos dados da situação demográfica das pacientes no programa TASY (Philips), utilizado pelo HSVP e Laboratório de Patologia. A equipe de pesquisa realizará essa busca ou em sala privada da Biblioteca do hospital ou no Laboratório de Patologia, com o intuito de preservar a privacidade dos pacientes e não interferir na rotina diária do Laboratório. Tal etapa está em desenvolvimento conforme descrito no item 2.1.8.3.

Os dados obtidos através dos prontuários eletrônicos serão transcritos para a ficha de coleta de dados (Apêndice A). As variáveis sociodemográficas das parturientes analisadas no estudo serão: idade, etnia, estado civil, grau de escolaridade. As variáveis obstétricas serão: idade gestacional no parto, paridade, tipo de parto e desfechos gestacionais, tais como parto a termo, prematuridade e

rotura prematura de membranas. As variáveis analisadas do recém-nascido serão peso ao nascimento e APGAR no 1º e 5º minuto. A variável obtida da análise de tecidos placentários através da Reação em Cadeia da Polimerase será a positividade para micoplasma e ureaplasma. A diferenciação entre as variáveis quantitativas dependentes e independentes está detalhada no item 2.1.8.5 (processamento, controle de qualidade e análise dos dados).

No mesmo Laboratório de Patologia do HSVP também estão armazenados os blocos de parafina das amostras das pacientes. Os materiais correspondentes às pacientes selecionadas serão transportados ao Laboratório de Bioquímica da UFFS, seccionados em micrótomo comum para obtenção dos cortes de tecidos placentários, os quais serão submetidos às análises de PCR para verificação da presença do micoplasma e ureaplasma. As análises serão realizadas no Laboratório de Bioquímica da UFFS, pela acadêmica da pesquisa, com auxílio da Dra. Jossimara Poletini. Após, os dados das análises de PCR serão registrados na ficha de coleta de dados (Apêndice A), e após, serão digitados no sistema de dados da pesquisa.

Os blocos de parafina referentes às amostras das pacientes selecionadas para o estudo serão seccionados em micrótomo comum, obtendo-se 3 cortes de 10 µm de espessura. Os fragmentos serão acondicionados em microtubos estéreis e submetidos à desparafinização em xilol e subsequente extração de DNA total pelo método CTAB/NaCl.

Após desparafinização e acondicionamento dos fragmentos em tampão TET (Tris-EDTA-Tween), será adicionado 50µL de proteinase K em uma concentração final de 400 µg/ul. As amostras serão incubadas a 56°C por 12h para a digestão do material e, após esse período, a proteinase K será inativada por aquecimento a 96°C durante 7 minutos. Em seguida, serão adicionados 100 µl de uma solução de NaCl 5M e 100µl da solução CTAB/NaCl pré-aquecida a 65°C, com posterior incubação por 10 minutos a 65°C. Após a incubação será acrescentado 750 µl de clorofórmio - álcool isoamilico 24:1 e centrifugação por 5 minutos 12.000 rpm à temperatura ambiente (TA). O sobrenadante será então transferido para novo tubo e adicionado 450 µl de etanol absoluto a - 20°C com posterior incubação por 10 minutos à TA. Após centrifugação por 15 minutos, 12.000 rpm a 4°C, o sobrenadante será descartado e 450 µl de etanol 70% será adicionado ao pellet.

Após centrifugação por 15 minutos, 12.000 rpm a 4°C, o etanol 70% será removido e as amostras serão ressuspensas em 50 µl de tampão TRIS/EDTA (TE) estéril para posterior utilização na detecção do DNA através das técnicas de PCR.

Para pesquisa de micoplasma e ureaplasma será empregada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os iniciadores específicos (*primers*) para as bactérias de interesse. Os controles positivos das reações, ou seja, positividade para micoplasma e ureaplasma, e os respectivos *primers* para as PCRs serão gentilmente cedidas pela Dra. Márcia Guimarães da Silva, do Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

As reações de PCR serão realizadas em volume final de 20µL, composto por 10µL de *Go Taq Green Master Mix 2X* (cód. M 7122- Promega, Madison, Wisconsin, EUA); 0,6µL de cada iniciador (*primer*) na concentração de 10µM; 4,8 µL de água estéril e 4µL de cada amostra de DNA pesquisada. As incubações serão realizadas em termociclador com os parâmetros de 95°C durante 5 minutos e 95°C durante 45 segundos para desnaturação, 52°C durante 45 segundos para anelamento dos iniciadores e 72°C durante 1 minuto para polimerização, seguido de mais 44 ciclos idênticos ao descrito. Finalizando, a temperatura de extensão final será de 72°C por 7 minutos e resfriamento a 4°C.

A eficiência das amplificações será monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5%, preparado em tampão 1X TBE (Tris/Ácido Bórico/EDTA) e corada com Brometo de Etídio. O tamanho dos produtos amplificados será comparado com o padrão de 100 pb e posteriormente fotografados sob transiluminação ultra-violeta.

2.1.8.5 Processamento, controle de qualidade e análise dos dados

Os dados obtidos nos livros de registros do Laboratório de Patologia do HSVP serão duplamente digitados, com o objetivo de aumentar a precisão dos resultados, em banco de dados desenvolvido no programa Epidata versão 3.1 (distribuição livre). A análise estatística será executada no programa de análises estatísticas PSPP

(distribuição livre) e compreenderá a média e desvio padrão das variáveis numéricas e distribuição de frequências, absoluta e relativa, das variáveis categóricas.

A análise de distribuição das variáveis dependentes com as variáveis independentes será verificada por meio do teste Qui-quadrado, empregando-se nível de significância de 5%. Será avaliada a positividade de micoplasma e ureaplasma, assim como a relação da positividade com os desfechos gestacionais e neonatais.

Será analisada a variável independente, prevalência de micoplasma e ureaplasma em relação às variáveis dependentes categóricas de desfecho gestacional, APGAR no 1º e 5º minuto e peso ao nascer. O restante dos dados contidos na Ficha de Transcrição (Apêndice A) serão utilizados para a descrição da amostra.

2.1.8.6 Aspectos éticos

Para cumprimento dos aspectos éticos, o estudo será submetido, primeiramente, à Comissão de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital São Vicente de Paulo. Após aprovação por essa comissão, será submetido para avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal da Fronteira Sul, de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). A pesquisa será realizada com respeito a todos os preceitos éticos estabelecidos, zelando pela legitimidade, privacidade e sigilo das informações, quando necessárias, tornando os resultados desta pesquisa públicos.

Presente no Apêndice B, encontra-se a solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A solicitação de dispensa é adequada uma vez que os pacientes não são acompanhados regularmente pelo hospital, mudaram de endereço ou podem ter vindo ao óbito.

Por fim, no Apêndice C está contido o termo de compromisso para uso de dados em arquivo, com o objetivo de afirmar o comprometimento da equipe em preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados. Visto que a equipe terá acessos aos dados através de cadastro eletrônico, existe o risco de o paciente ter seus dados de identificação revelados. Como forma de minimizar esse risco, o nome de cada paciente será substituído por um número específico. No caso

Levantamento bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Elaboração do projeto/Submissão e aprovação CEP	X	X	X	X								
Coleta de dados					X	X	X	X	X			
Análise dos dados					X	X	X	X	X			
Revisão e redação dos resultados								X	X	X	X	
Divulgação dos resultados												X
Relatórios parciais e finais de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa						X						X

2.1.11 Referências

ALLEN-DANIELS, M. J. et al. Identification of a gene in *Mycoplasma hominis* associated with preterm birth and microbial burden in intra-amniotic infection. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 212, n. 6, p. 779.e1-779.e13, 2015.

BAUD, D.; GREUB, G. Intracellular bacteria and adverse pregnancy outcomes. **Clinical Microbiologic Infection**, v. 17, n. 9, p. 1312-22, 2011.

BITTAR, R. E. Parto pré-termo. **Revista Medica, São Paulo**, v. 97, n. 2, p. 195-207, 2018.

BLENCOWE, H. et al. Born Too Soon : The global epidemiology of 15 million preterm births. **Reproductive Health**, v. 10, n. Suppl 1, p. 1-14, 2013.

CARVALHO, M. H. B. et al. Associação da vaginose bacteriana com o parto prematuro espontâneo. **Revista Brasileira Ginecologia Obstetrícia**, v. 23, n. 8, p. 529-33, 2001.

COX, C. et al. The common vaginal commensal bacterium *Ureaplasma parvum* is associated with chorioamnionitis in extreme preterm labour. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 29, n. 22, p. 3646-51, 2013.

DIGIULIO, D. B. Diversity of microbes in amniotic fluid. **Seminars in fetal & neonatal medicine**, v. 17, n. 1, p. 2-11, 2012.

ELOVITZ, M. A. et al. Cervicovaginal microbiota and local immune response modulate the risk of spontaneous preterm delivery. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2019.

FETTWEIS, J. M. et al. The vaginal microbiome and preterm birth. **Nature Medicine**, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2019.

GONDO, F. et al. Vaginal flora alterations and clinical symptoms in low-risk pregnant women. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 71, n. 3, p. 158-62, 2011.

GRAVETT, M. G.; RUBENS, C. E.; NUNES, T. M. Global report on preterm birth and stillbirth (2 of 7): discovery science. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 10, n. 1:S2, 2010.

KACEROVSKY, M.; et al. Microbial load of umbilical cord blood *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* in preterm prelabor rupture of membranes. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 27, n. 16, p. 1627-32, 2014.

LATINO, M. A.; BOTTA, G.; BADINO, C.; et al. Association between genital mycoplasmas, acute chorioamnionitis and fetal pneumonia in spontaneous abortions. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 46, n. 5, p. 503-8, 2018.

MARCONI, C. et al. Amniotic fluid interleukin-1 beta and interleukin-6, but not interleukin-8 correlate with microbial invasion of the amniotic cavity in preterm labor. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 65, n. 6, p. 549-56, 2011.

MENDZ, G. L.; KAAKOUSH, N. O.; QUINLIVAN, J. A. Bacterial aetiological agents of intra-amniotic infections and preterm birth in pregnant women. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 1-7, 2013.

MICHOU, V., et al. Molecular investigation of menstrual tissue for the presence of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* collected by women with a history of infertility. **Journal Obstetrics Gynaecology Research**, v. 40, n. 1, p. 237-42, 2014.

MUSSI-PINHATA, M. M.; YAMAMOTO, A. Y. Infecções congênitas e perinatais. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 75, n. S1, p. 15-30, 1999.

MYSOREKAR, I. U.; CAO, B. Microbiome in parturition and preterm birth. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 32, n. 1, p. 50-5, 2014.

PARARAS, M. V; SKEVAKI, C. L.; KAFETZIS, D. A. Preterm birth due to maternal infection: Causative pathogens and modes of prevention. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 25, n. 9, p. 562-9, 2006.

REDELINGHUYS, M. J. et al. Comparison of the new Mycofast Revolution assay with a molecular assay for the detection of genital mycoplasmas from clinical specimens. **BMC Infectious Disease**, v. 13, p. 453, 2013.

ROMERO, R. et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. **Microbiome**, v. 2, n. 4, p. 1-19, 2014.

ROMERO, R. et al. The preterm parturition syndrome. **BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology**, v. 113, n. 3, p. 17-42, 2006.

SWEENEY, E. L. et al. The human Ureaplasma species as causative agents of chorioamnionitis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 349–379, 2017.

SILVA, M. G. et al. Cervical Lactobacillus and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. **International Journal Gynaecology Obstetric**, v. 81, p. 175-82, 2003.

STOUT. M. J. et al. Early pregnancy vaginal microbiome trends and preterm birth. **American Journal Obstetrics Gynecology**, v. 217, n. 3, p. 356.e1-356.e18, 2017.

TSAKOGIANNIS, D. et al. Molecular approaches for HPV genotyping and HPV-DNA physical status. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1-20, 2017.

VISCARDI, R. M. Ureaplasma species: Role in neonatal morbidities and outcomes. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v. 99, n. 1, p. F87-F92, 2014.

2.1.12 Apêndices

APÊNDICE A – FICHA DE TRANSCRIÇÃO DE DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E RESULTADO DA ANÁLISE PCR

Pesquisador Responsável: Prof^ª. Dra. Jossimara Poletini

Contatos: telefone (14) 998027402 – Email: jossimara.poletini@uffs.edu.br

UFFS-PESQUISA: Pesquisa de micoplasma e ureaplasma em tecidos placentários	
Equipe de pesquisa: Rafaela Camelo. Contato: rafaelacamel07@gmail.com (54)99207-3766	
Número do formulário:	nform _ _ _ _ _
DADOS DA PARTURIENTE	
Desfecho gestacional	
Número do atendimento:	natend _ _ _ _ _
Idade na entrada do serviço:	idad _ _
Raça (1) Branca (2) Preta (3) Parda (4) Indígena (5) Amarela	cor _ _
Estado civil: (1) Com companheiro(a) (2) Sem companheiro(a)	estaciv _ _
Grau de escolaridade: (1) Ensino Fundamental completo (2) Ensino Médio completo (3) Ensino Superior completo (4) Não consta	grauesc _ _ _ _
Tabagismo: (1) Sim (2) Não	Tabag _ _ _ _
Idade gestacional no parto	ldgest _ _ _ _
Paridade	G _ P _ C _ A _
Tipo de parto (1) Vaginal (2) Cesárea	part _ _
Comorbidades (1) Pré-eclâmpsia (2) Diabetes gestacional (3) RCIU (4) outras. Qual(is)? _____	cb _ _
DADOS DO RECÉM NASCIDO	
Escala APGAR 1º minuto	apg1 _ _
Escala APGAR 5º minuto	apg5 _ _
Peso ao nascimento (kg)	peso _ _ _ _
RESULTADO ANÁLISE PCR	
Resultado da análise PCR para micoplasma (1) Positivo (2) Negativo	pcrmico _ _
Resultado da análise PCR para ureaplasma	pcrureapl _ _ _ _

(1) Positivo	(2) Negativo	
--------------	--------------	--

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

SOLICITAÇÃO DE DISPENSA

PESQUISA DE MICOPLASMA E UREAPLASMA EM TECIDOS PLACENTÁRIOS

Esta pesquisa será desenvolvida por Rafaela Camelo, discente do curso de Graduação em Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus de Passo Fundo, sob orientação da Prof^a. Dra. Jossimara Polettini e coorientação da Prof^a. Ms^a. Daniela Augustin Silveira.

O objetivo central do estudo é identificar a prevalência de micoplasma e ureaplasma em tecidos placentários de pacientes que realizaram seu parto no Hospital São Vicente de Paulo (HSVP), no ano de 2017, cujas amostras estão armazenadas no Laboratório de Patologia do Hospital. Além disso, pretende-se avaliar a relação da presença das bactérias com as comorbidades gestacionais, como parto prematuro e rotura prematura de membranas.

Apesar de não haver benefícios diretos aos participantes da pesquisa, uma vez que a gestação já ocorreu, o estudo se justifica por proporcionar benefícios indiretos através das informações geradas aos profissionais de saúde, gestantes e população em geral. Além de possibilitar aos profissionais um conhecimento melhor sobre a condição patológica estudada e seus modos de transmissão, o estudo poderá auxiliar na busca de planos de ação relacionados à mesma, gerando um impacto positivo no desfecho de pacientes sabidamente infectadas pelas bactérias.

Da mesma forma, não haverá devolutiva direta às participantes, uma vez que as mesmas não estão em acompanhamento e/ou estiveram no Hospital apenas por ocasião do parto. No entanto, de maneira a fornecer uma devolutiva às instituições envolvidas, a equipe produzirá um relatório documentando os resultados obtidos na pesquisa.

Serão garantidas a confidencialidade e a privacidade das informações obtidas. Visto que a equipe terá acesso aos dados em prontuário eletrônico, há o risco de o

paciente ter sua identidade revelada. De maneira a minimizar esse risco, o nome do paciente será substituído por um número. Os dados computados serão armazenados por um período de cinco anos, em local seguro, e serão destruídos após esse período.

As informações serão utilizadas para realização de um estudo quantitativo, observacional, retrospectivo, descritivo e analítico. A coleta de dados ocorrerá no Laboratório de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo, em Passo Fundo. Os instrumentos de coleta consistem em formulários, que serão preenchidos com dados sociodemográficos e clínicas (dados da parturiente: idade, raça, estado civil, grau de escolaridade, idade gestacional, paridade, tipo de parto e comorbidades, dados do recém-nascido: escala APGAR no 1º e 5º minuto e peso ao nascimento), conforme contido no prontuário eletrônico de cada participante. A amostra será composta por 300 participantes. A coleta de dados iniciará somente após a ciência e concordância do hospital, aprovação do protocolo de pesquisa e Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFFS, conforme Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Devido à importância da pesquisa e com base na Resolução CNS Nº 466 de 2012 – IV.8, solicito a dispensa da obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pois o estudo trata-se de uma pesquisa retrospectiva, baseado em dados de prontuários eletrônicos e os pacientes não são acompanhados regularmente pelo hospital. Além disso, alguns pacientes são procedentes de outros locais, uma vez que a maternidade do HSVP é referência para diversos municípios que compõem a 6ª Coordenadoria Regional de Saúde.

Os resultados serão divulgados em eventos e/ou publicações científicas mantendo sigilo dos dados pessoais.

Passo Fundo, _____ de _____ de 2020.

Profª. Drª. Jossimara Poletini

Email: jossimara.poletini@uffs.edu.br

APÊNDICE C – TERMO DE COMPROMISSO PARA USO DE DADOS EM ARQUIVO



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS PASSO FUNDO
CURSO DE MEDICINA**

TERMO DE COMPROMISSO PARA USO DE DADOS EM ARQUIVO

Título da Pesquisa: PESQUISA DE MICOPLASMA E UREAPLASMA EM TECIDOS PLACENTÁRIOS

O(s) pesquisador(es) do projeto acima identificado(s) assume(m) o compromisso de:

- I. Preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados;
- II. Assegurar que as informações serão utilizadas única e exclusivamente para a execução do projeto em questão;
- III. Assegurar que as informações somente serão divulgadas de forma anônima, não sendo usadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o sujeito da pesquisa.

Dr^a. Jossimara Poletini

Ms^a Daniela Augustin Silveira

Rafaela Camelo

2.2 RELATÓRIO DE PESQUISA

Visando verificar a prevalência de micoplasma e ureaplasma para relacioná-la com desfechos gestacionais e neonatais, buscou-se desenvolver uma pesquisa a partir de prontuários médicos juntamente com a realização de PCR nos tecidos placentários das gestantes. O tema do projeto foi decidido juntamente com a orientadora Jossimara Poletini em julho de 2019. Após, foi decidido que a Professora Daniela Augustin Silveira seria a coorientadora.

A estruturação dos itens do projeto iniciou-se em agosto de 2019 a partir do componente curricular de Pesquisa em Saúde, no qual foi formulado o Projeto de Pesquisa. No decorrer do semestre seguinte, o projeto previsto foi realizado a partir dos dados do Laboratório de Patologia do HSVP. Como este projeto é uma continuidade da pesquisa ainda em andamento pela acadêmica Roberta Klering, orientada pela professora Daniela Augustin Silveira e coorientada pela professora Jossimara Poletini, intitulada “Pesquisa de Papiloma Vírus Humano (HPV) em tecidos placentários”, possui as mesmas amostras placentárias deste projeto. Por isso, utilizaram-se os dados de prontuários coletados pela acadêmica do projeto supracitado mediante a aprovação da pesquisa pelo Hospital São Vicente de Paulo em dezembro de 2019. Ademais, como a metodologia de ambas as pesquisas são iguais, apenas modificando os microrganismos pesquisados, foi realizada uma emenda na Plataforma Brasil, em setembro de 2020, propondo a adição de uma pesquisa molecular dos outros microrganismos (micoplasmas genitais) além do HPV anteriormente previsto. Justifica-se a emenda uma vez que o estudo é retrospectivo e nenhuma abordagem adicional quanto à coleta de dados clínicos, coleta adicional de material biológico ou mudança/adição de metodologia foram necessárias.

A coleta de dados inicia com as amostras selecionadas por conveniência, constituída de pacientes cujas placentas foram encaminhadas para análise anatomopatológica no período de janeiro a dezembro de 2017 no Laboratório de Patologia do HSVP. Foram incluídas todas as parturientes cuja placenta foi encaminhada para o setor de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo, pelo convênio do Sistema Único de Saúde (SUS), para análise anatomopatológica, no ano de 2017. Quanto aos critérios de exclusão, foram considerados prontuários com o dado de desfecho gestacional incompleto e inadequabilidade da amostra para realização das técnicas moleculares, como material genético degradado.

A partir da listagem obtida pelo registro do Laboratório de Patologia do HSVP foram buscados os blocos de parafina que continham os tecidos placentários para realizar o procedimento. Os procedimentos e o acompanhamento da técnica foram executados pela orientadora e pela acadêmica. A realização da técnica de PCR foi preparada no Laboratório de Bioquímica da UFFS. Os materiais utilizados foram adquiridos por meio de financiamento próprio. Foram executadas reações de PCR como testes de otimização, visando avaliar diferentes concentrações de reagentes e ciclos de amplificação.

Com o início do recesso acadêmico da Universidade Federal da Fronteira Sul, teve início a coleta de dados de prontuários, que foi realizada entre dezembro de 2019 e março de 2020. Visando complementar os dados colhidos em prontuários, novas variáveis foram adicionadas à Ficha de transcrição de dados sociodemográficos. Entre os novos dados coletados estão o resultado do exame anatomopatológico das placentas, informações sobre a mortalidade dos recém nascidos e informações da gestação. A ficha de coleta de dados atualizada pode ser consultada no Apêndice A deste volume.

Devido à suspensão do calendário acadêmico da Universidade Federal da Fronteira Sul, em março de 2020, em virtude da pandemia do Covid-19, conforme deliberação do Conselho Universitário (conforme Portaria Nº 363/GR/UFFS/2020), o corte dos blocos de parafina referentes às amostras selecionadas e, por conseguinte, a execução das análises de PCR sofreram atraso em seu prazo de realização previsto.

Em julho de 2020, foi divulgada a Proposta de Retorno Gradual às Atividades Presenciais do Campus Passo Fundo, que previu o retorno das atividades acadêmicas para o dia 10 de agosto, com consequente encurtamento do semestre. Dessa forma, com o atraso do calendário acadêmico em decorrência da pandemia, o início das análises de PCR ocorreu em setembro em 2020 e, por isso, foi decidido que a pesquisa abordaria somente a detecção de *Mycoplasma hominis*.

Nos meses seguintes a setembro de 2020, prosseguiram-se as análises de detecção de *Mycoplasma hominis* em tecidos placentários no Laboratório de Biologia Molecular da UFFS juntamente com a análise estatística dos dados dos prontuários. Em janeiro de 2021, foi entregue a primeira versão do artigo. Após esta entrega, foi realizada a escrita do artigo final e a confecção do presente volume final de TCC. A

revista escolhida para nortear as normas do artigo foi a Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil, conforme Anexo D.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

PESQUISA DE MICOPLASMA EM TECIDOS PLACENTÁRIOS

Rafaela Camelo¹, Daniela Augustin Silveira², Jossimara Polettini²

¹Discente, Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo, RS, Brasil.

²Docente, Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo, RS, Brasil.

Autor correspondente:

Jossimara Polettini

Universidade Federal da Fronteira Sul

R. Cap. Araújo, 20 - Centro, Passo Fundo - RS

CEP 99010-200

E-mail: jossimara.polettini@uffs.edu.br

Resumo

Introdução: O micoplasma é um gênero bacteriano que, ao invadir tecidos placentários, está associado ao aumento do risco de resultados adversos, como trabalho de parto prematuro e infecção neonatal, porém sua fisiopatologia não está completamente elucidada. **Objetivo:** Determinar a prevalência de *Mycoplasma hominis* em tecidos placentários e relacionar com o perfil sociodemográfico e as características do parto e do recém-nascido. **Material e Métodos:** Estudo transversal com dados e amostras de tecidos placentários (parênquima e membranas fetais) de parturientes de um hospital terciário, atendidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no ano de 2017, cuja placenta foi encaminhada para análise anatomopatológica. As amostras parafinizadas foram seccionadas, desparafinizadas em xilol e submetidas à extração de DNA total. A pesquisa de *M. hominis* foi realizada pela técnica de PCR em tempo real utilizando o sistema Sybr Green e iniciadores específicos. Os dados sociodemográficos, gestacionais e dos

recém-nascidos foram coletados dos prontuários eletrônicos. Os dados foram apresentados como distribuição de frequências absoluta e relativa das variáveis. **Resultados:** Foram incluídas 327 gestantes, e observou-se que mais de 20% das pacientes estudadas eram de idade materna avançada (> 35 anos). Em relação aos dados obstétricos, observou-se a maioria das mulheres na sua primeira gestação, cesárea como tipo de parto mais prevalente e altas taxas de comorbidades materna. Gestações pré-termo foram associadas a doenças hipertensivas maternas, hipoperfusão placentária e corioamnionite. A pesquisa de *M. hominis* foi positiva em 2/65 (3,0%) das amostras de gestações pré-termo. **Conclusão:** A positividade de *M. hominis* foi inferior à relatada na literatura e, portanto, não foi relacionada aos dados sociodemográficos, gestacionais e neonatais. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novos estudos com amostragens maiores para melhor elucidar a relação de *M. hominis* com desfechos gestacionais adversos.

Palavras chave: *Mycoplasma hominis*. Reação em Cadeia da Polimerase. Gestação. Prematuridade.

Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a taxa de prematuridade no mundo é de 15 milhões/ano (OMS, 2012), sendo este um problema mundial de saúde pública. Entre as causas multifatoriais de trabalho de parto prematuro, tem-se a infecção placentária por microrganismos. Dentre os microrganismos relacionados à ocorrência de partos pré-termo está o gênero bacteriano micoplasma, sendo este relacionado a desfechos gestacionais adversos, como rotura prematura de membranas e corioamnionite (inflamação das membranas fetais)¹.

Os micoplasmas constituem um grupo amplo de microrganismos e algumas espécies como *Mycoplasma* e *Ureaplasma* são patógenos em humanos. Estes habitam principalmente as mucosas do trato respiratório e do sistema geniturinário². *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*), *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*) e *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) são

chamados de “micoplasmas genitais”, pois a infecção acontece por contato sexual², sendo o *M. hominis* uma das espécies mais estudadas.

Os micoplasmas também podem ser comensais da microbiota do trato geniturinário, principalmente em indivíduos sexualmente ativos². Entretanto, quando ascendem para os tecidos placentários, podem ocasionar adversidades gestacionais. Alguns desfechos gestacionais por infecção de micoplasma incluem gravidez ectópica, parto prematuro e ruptura prematura de membranas, corioamnionite, endometrite pós-parto, salpingite, baixo peso ao nascer e aborto tardio³.

Quanto à infecção placentária, esta pode ser limitada à decídua, chegar até o espaço entre o âmnio e o córion ou estender-se à cavidade amniótica e ao feto^{4,5}. As vias de infecção intrauterina podem ocorrer por meio da ascensão da vagina e do colo uterino, por disseminação hematogênica através da placenta, introdução durante algum procedimento invasivo e disseminação retrógrada através das tubas uterinas^{4,6,7}.

Dados de Mendzs et al⁸, em revisão sistemática que incluiu 761 mulheres com parto prematuro, apontou que 349 (46%) apresentaram infecção intrauterina. Neste estudo, foi demonstrado que, dentre os microrganismos intrauterinos, 58,7% correspondiam a micoplasmas e ureaplasma, sendo que 9% eram especificamente por *M. hominis*. Em outro estudo, Michou et al⁹, isolaram DNA de *M. hominis* em 13,7% e *U. urealyticum* em 18,8% de amostras de tecidos menstruais de mulheres com problemas de fertilidade.

Nesse contexto, o exame anatomopatológico da placenta é um aliado nas investigações das alterações relacionadas ao parto e à gestação¹⁰. Através do exame macro ou microscópico desse órgão é possível identificar e mensurar alterações na estrutura, implantação, vascularização, inflamação ou adversidades no ambiente intrauterino, que resultam em consequências fetais¹¹. Dessa forma, sua análise é altamente relevante para o melhor

entendimento da fisiopatologia placentária, cujas alterações podem levar ao comprometimento do desenvolvimento neonatal ou ainda à natimortalidade¹².

Sendo assim, o conhecimento da incidência, etiologia, patogênese, diagnóstico e manejo de infecções na gestação, parto e período neonatal se torna pertinente, pois tais infecções podem causar prejuízos para o feto e recém-nascido, tanto de maneira aguda quanto persistente, mesmo se não expressos no momento do nascimento¹³.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo determinar a prevalência de *M. hominis* nos tecidos placentários, relacionando-a com desfechos gestacionais em gestantes atendidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em um hospital terciário da região norte do estado do Rio Grande do Sul. Ressalta-se que tal diagnóstico é relevante para o entendimento do perfil da população estudada, fisiopatologia e disfunção placentária.

Métodos

Trata-se de um estudo transversal desenvolvido no Laboratório de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal da Fronteira Sul, em Passo Fundo – RS. A amostra foi constituída por pacientes parturientes, atendidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no HSVP, que, por motivo de gestação de alto risco, ou critérios estabelecidos pela equipe obstétrica, tiveram suas placentas encaminhadas para análise anatomopatológica no ano de 2017. Foram excluídos os casos nos quais não foi possível encontrar o prontuário materno a partir do exame anatomopatológico.

Os dados sociodemográficos e gestacionais foram obtidos através de prontuários eletrônicos mediante aprovação pela Comissão de Pesquisa e Pós-Graduação do HSVP e do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS (CAAE 21478519.4.0000.5564). As variáveis da parturiente analisadas foram

etnia, situação conjugal, escolaridade e dados obstétricos da gestação atual. Em relação ao recém-nascido, foram coletados dados do peso ao nascer e APGAR de 1º e 5º minutos.

Para a pesquisa de micoplasmas, foram utilizados os tecidos armazenados em blocos de parafina arquivados no setor de patologia do HSVP, os quais foram seccionados em micrótomo comum, obtendo-se 3 cortes de 10 µm de espessura. Os fragmentos foram acondicionados em microtubos estéreis e submetidos à desparafinização em xilol e subsequente extração de DNA total pelo método CTAB/NaCl.

Após desparafinização e acondicionamento dos fragmentos em tampão TET (Tris-EDTA-Tween), foram adicionados 50µL de proteinase K na concentração final de 400 µg/ul. As amostras foram incubadas a 56°C por 12h para a digestão do material e, após esse período, a proteinase K foi inativada por aquecimento a 96°C durante 7 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µl de NaCl 5M e 100µl da solução CTAB/NaCl pré-aquecida a 65°C, com posterior incubação por 10 minutos a 65°C. Após a incubação foi acrescentado 750 µl de clorofórmio - álcool isoamílico 24:1 e centrifugação por 5 minutos 12.000 rpm à temperatura ambiente (TA). O sobrenadante foi então transferido para novo tubo e adicionado 450 µl de etanol absoluto a - 20°C com posterior incubação por 10 minutos à TA. Após centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm e a 4°C, o sobrenadante foi descartado e 450 µl de etanol 70% foram adicionados ao *pellet*. Após centrifugação por 15 minutos, 12.000 rpm a 4°C, o etanol 70% foi removido e as amostras foram ressuspensas em 50 µl de tampão TRIS/EDTA (TE) estéril para posterior utilização na detecção do DNA através das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A presença de DNA total foi verificada através da positividade para o gene endógeno de beta globina, utilizando-se os iniciadores específicos (*primers*) PCO4 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3') e GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3')¹⁴. As amostras positivas para beta globina foram submetidas à PCR para pesquisa de *M. hominis*,

utilizando os iniciadores específicos (*primers*) M1 (5'-CAATGGCTAATGCCGGATACGC-3') e M2 (5'-GGTACCGTCAGTCTGCAAT-3')¹⁵. Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de ATTC (*American Type Culture Collection*) da bactéria de interesse.

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 20µL, composto por 10µL de Go Taq Green Master Mix 2X (cód. M 7122- Promega, Madison, Wisconsin, EUA); 0,6µL de cada primer na concentração de 10µM; 4,8 µL de água estéril e 4µL de cada amostra pesquisada. As incubações foram realizadas em termociclador com os parâmetros de 95°C durante 5 minutos e 95°C durante 45 segundos para desnaturação, 52°C (beta-globina) e 62 °C (*M. hominis*) durante 45 segundos para anelamento dos iniciadores e 72°C durante 1 minuto para polimerização, seguido de mais 44 ciclos idênticos ao descrito. Finalizando, a temperatura de extensão final foi de 72°C por 7 minutos e resfriamento a 4°C.

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5%, preparado em tampão 1X TBE (Tris/Ácido Bórico/EDTA) e corada com Brometo de Etídio. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100 pb e posteriormente fotografados sob transiluminação ultravioleta.

Os resultados da pesquisa de *M. hominis* foram confirmados pela PCR em tempo real em aparelho QuantiStudio 5 (ThermoFisher Inc, Massachusetts, USA) empregando-se o sistema de detecção SYBR Green em 20µL de reação total, constituída por 2x qPCRBIO SyGreen Mix (PCR Biosystems Inc, London, UK), 0,8uM de cada um dos iniciadores e 4uL da amostra de DNA. A técnica foi realizada no Laboratório de Imunopatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Curva padrão para a região analisada foi gerada a partir de diluição seriada de DNA controle (extraído de ATCC). As reações seguiram os seguintes parâmetros: 95°C por 3min, e 40 ciclos de 95°C por 5seg e 62°C por 30seg. A curva de *melting* foi gerada para verificar eficiência dos iniciadores.

Os dados sociodemográficos e clínicos foram duplamente digitados em planilha no programa Epidata versão 3.1. A análise estatística foi realizada em software *Graph Pad Prism*, versão 6.0, e compreendeu a distribuição de frequências absoluta e relativa das variáveis categóricas, bem como associação das variáveis analisada pelo teste do X^2 ou Exato de Fisher, e o nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

Foram identificados 3412 nascimentos no HSVP pelo SUS no ano de 2017, e, de acordo com critérios do local, 339 exames anatomopatológicos placentários foram realizados. Discrepâncias entre a identificação do exame e o prontuário materno foram encontradas em 12 casos, sendo assim, dados de 327 pacientes estavam disponíveis. Dessa forma, a amostra analisada correspondeu a 9,9% dos nascimentos, aproximadamente.

A Tabela 1 demonstra as características sociodemográficas das pacientes estudadas. Em relação à idade, 4,3% possuía menos de 18 anos, 74,6% entre 18 e 34 anos e 21,1% possuía 35 anos ou mais. A etnia branca (82,9%) e estado conjugal com companheiro (82,6%) foram os mais prevalentes e 42,5% das gestantes possuíam o Ensino Médio Completo. Dentre os hábitos de vida, o tabagismo foi reportado em 10,7% das pacientes.

Os dados da história pregressa reprodutiva e gestação atual das pacientes estudadas estão apresentados na Tabela 2. As primigestas representaram 42,2% da amostra, enquanto a multiparidade (3 ou mais partos) foi observada em 26,6% dos casos. Abortos prévios ocorreram em 14,3% das mulheres. Em relação à gestação em estudo, o tipo de parto mais prevalente foi o parto por cesárea (84,4%), 31 (9,5%) foram gestações gemelares e 2 tiveram como desfecho o aborto (0,6%). Dos 327 casos estudados, 206 (62,9%) foram partos entre 22 e 36 semanas completas de gestação, considerados pré-termo, 119 (36,4%) partos com mais de 37 semanas (a termo) e 2 abortos (<22 semanas).

Ainda, a Tabela 2 demonstra as comorbidades das pacientes, sendo que as condições de Pré-eclâmpsia, Síndrome *HELLP*, Eclâmpsia, Crescimento Intrauterino Restrito (CIUR), Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), doença hipertensiva específica da gestação (DHEG), trabalho de parto prematuro e alterações de volume do líquido amniótico estiveram presentes de 15 a 20% das gestações estudadas.

Em relação aos recém-nascidos, conforme Tabela 3, observou-se que 43,4% dos recém-nascidos 1 e 51,6% dos recém-nascidos 2 (quando gemelar) necessitou de internação em UTI neonatal, assim como mais da metade apresentou baixo peso ao nascer. Os escores de APGAR foram satisfatórios em 68,9% dos recém-nascidos 1 e 51,7% dos recém-nascidos 2 no 1º minuto, e em 90% dos recém-nascidos 1 e 93,2% dos recém-nascidos 2 no 5º minuto pós nascimento. Os números de mortes neonatais precoces e tardias variaram entre 3 e 7%.

Os resultados dos exames anatomopatológicos das placentas e anexos referentes a alterações inflamatórias demonstrou corioamnionite em 78 (24,3%), funisite (cordão umbilical) em 20 (6,2%) e vilite (parênquima) em 14 (4,4%) das amostras avaliadas. Adicionalmente, infartos placentários e maturação irregular foram observados em 83 (25,9%) e 28 (8,7%) dos casos.

A associação das variáveis sociodemográficas, obstétricas e neonatais com a ocorrência de prematuridade está apresentada na Tabela 4. Ressalta-se que para essa análise, foram excluídos dos casos de gemelaridade e abortos, pois são condições que independentemente relacionam-se com prematuridade. Observa-se que a idade gestacional do parto não foi influenciada por fatores como idade, etnia, situação conjugal, escolaridade ou hábito tabagista ($p > 0,05$). Por outro lado, gestações pré-termo apresentaram maiores taxas de comorbidades como pré-eclâmpsia, síndrome *HELLP* ou eclâmpsia, e Hipertensão arterial sistêmica ou doença hipertensiva específica da gestação, além de piores desfechos neonatais como baixo peso, valores de APGAR, necessidade de UTI e morte neonatal tardia. Já as gestações a termo

apresentaram maior taxa de partos cesárea, crescimento intrauterino restrito e Diabetes Mellitus e/ou Diabetes Mellitus gestacional. A análise histopatológica demonstrou predomínio de corioamnionite e infarto placentário nas gestações pré-termo.

Os resultados da pesquisa de *M. hominis* são apresentados de forma parcial. Devido à possível degradação do material genético das amostras na forma de preservação em formalina e parafinização, não foi possível recuperar o DNA total em todas as amostras tanto de parênquima placentário como de membranas corioamnióticas. Dessa forma, foram avaliadas 65 amostras com material satisfatório para pesquisa do DNA bacteriano, o que foi evidenciado pela positividade da PCR para o gene constitutivo da beta-globina (Figura 1). A pesquisa de *M. hominis* foi positiva em 2/65 (3,0%) das amostras avaliadas. Tais resultados foram confirmados pela PCR em tempo real. A Figura 2A demonstra a amplificação da curva padrão realizada com diluição de DNA extraído de ATCC de *M. hominis*, além da amplificação das amostras avaliadas. A Figura 2B demonstra a curva de *melting* e consequente especificidade do fragmento referente ao gene bacteriano. Apesar da positividade de duas amostras em casos de prematuridade, não foi observada associação estatisticamente significativa com esse desfecho (Tabela 4).

Discussão

O período gestacional ocorre sem complicações na maioria dos casos, no entanto, existem situações consideradas gestações de alto risco, nas quais a vida ou a saúde da mãe e/ou do feto e/ou do recém-nascido tem maiores chances de serem atingidas que as da média da população considerada^{16,17}. Dentre as condições clínicas características, destacam-se agravos como desvio quanto ao crescimento uterino, alteração do volume de líquido amniótico, desenvolvimento de diabetes gestacional, índice ponderal inadequado, hemorragias da gestação, insuficiência istmo-cervical, trabalho de parto prematuro, gravidez prolongada, amniorrexe prematura, pré-eclâmpsia e eclâmpsia, além de óbito fetal^{16,18}. Nesses casos, o

exame histopatológico da placenta é recomendado, a fim de se aumentar o entendimento sobre a fisiopatologia dessas adversidades. Adicionalmente, a presença de infecção placentária pode contribuir para tais agravos e, nesse contexto, a presença de Micoplasmas na interface materno-fetal tem sido associada a complicações gestacionais^{1,19}. Por outro lado, esses dados são majoritariamente epidemiológicos e, portanto, a relação causal de tais microrganismos e as suas adversidades ainda é controversa na literatura.

No presente estudo foi possível caracterizar gestantes parturientes, que, por motivo de gestação de alto risco ou critérios estabelecidos pela equipe obstétrica, tiveram suas placentas encaminhadas para análise anatomopatológica de acordo com recomendação do Ministério da Saúde. Nessa população, observou-se dados de etnia, situação conjugal e escolaridade nas faixas encontradas na maioria dos estudos brasileiros^{20,21}. Observou-se que mais de 20% das pacientes estudadas eram de idade materna avançada (> 35 anos), o que aumenta as chances de adversidades gestacionais^{22,24} e pode estar relacionado às diversas comorbidades observadas, embora essa análise não tenha sido realizada.

Em relação aos dados obstétricos, observa-se que a maioria das mulheres estavam na sua primeira gestação, com parto cesáreo presente em quase 85%, e esta alta taxa pode ser justificada pelos inúmeros casos de complicações gestacionais encontradas na população estudada. É importante ressaltar que o HSVP é um hospital terciário, de referência regional de atendimento do SUS, por isso a alta taxa de adversidades como pré-eclâmpsia, diabetes, prematuridade, entre outras. Nesse mesmo contexto, o peso do recém-nascido foi abaixo do esperado em mais de 50% dos casos, assim como alta porcentagem de neonatos apresentou baixo escore de APGAR. Saloio et al.²⁵ reportaram que peso ao nascer de 1.500 a 2.499g apresentam 2,7 vezes risco aumentado de mortalidade, enquanto que para peso ao nascer menor que 1.500g o risco é de 62,42.²⁵ Em concordância, em revisão sistemática recente, Veloso et al.²⁶ reportaram fatores de risco significativamente associados com a mortalidade neonatal no Brasil, dentre os quais alguns em concordância com os achados deste estudo, como idade

materna ≥ 35 anos, presença de intercorrências durante a gestação, de malformação congênita na gestação em estudo, APGAR < 7 no quinto minuto, baixo e muito baixo peso ao nascer, idade gestacional ≤ 37 semanas e parto cesariano²⁶. Dessa forma, evidencia-se que a população estudada apresenta características condizentes com fatores de adversidades gestacionais e neonatais, o que deve ser considerado nas políticas de atendimento e seguimento dessas pacientes.

Adicionalmente, a condição de prematuridade foi avaliada, uma vez que esta acomete, anualmente, cerca de 15 milhões de bebês e aproximadamente 1 milhão de crianças morrem a cada ano devido a complicações de parto prematuro^{27,28}. A associação das variáveis com a condição de prematuridade demonstrou homogeneidade quanto às variáveis sociodemográficas, o que pode ser justificado pela população estudada serem gestações de alto risco, encaminhadas a um serviço de referência. Apesar da condição de alto risco, observou-se que os casos com idade gestacional inferior a 37 semanas foram estatisticamente associados a comorbidades materna de doenças circulatórias de perfusão placentária e sistêmicas, além da presença mais frequente de infartos placentários. A remodelação vascular inadequada e uma placenta hipoperfundida, podem levar a uma placenta isquêmica, e, por sua vez, leva à liberação de fatores que estão associados à disfunção de endotélio vascular materno. Dessa forma, é bem estabelecido na literatura que tais disfunções circulatórias maternas são uma das principais causas de trabalho de parto prematuro e mortalidade e morbidade infantil^{27,28,29}.

Embora seja bem estabelecida a etiologia multifatorial para o parto pré-termo, a infecção da cavidade amniótica, geralmente advinda do trato genital inferior, é, até o momento, o principal fator associado à sua fisiopatologia por ativar precocemente a cascata inflamatória na interface materno-fetal³⁰. Nesse contexto, a presença de micoplasma no ambiente intrauterino tem sido relacionada a morbidades neonatais e perinatais como displasia broncopulmonar, hemorragia intraventricular, enterocolite necrosante⁵, além de baixo peso e APGAR < 7 ³¹. Por outro lado, diversos estudos falharam em demonstrar relação causal

particularmente de *M. hominis* e adversidades, demonstrando que os dados ainda são escassos sobre essa análise, sendo necessários novos estudos para complementar tal hipótese ^{32,33}.

No presente estudo, a positividade para esse microrganismo foi encontrada em 3,0% (2/65) das amostras avaliadas, taxa inferior à média de 10% relatada na literatura ^{8,9}. No entanto, alguns aspectos podem ser discutidos. Uma possível justificativa para tal resultado é o baixo número de amostras processadas para pesquisa de *M. hominis*, e uma amostragem maior poderia refletir a positividade esperada. Ademais, o processo de inclusão de amostras teciduais em parafina, apesar de oportunizar às unidades hospitalares o armazenamento das amostras a longo prazo e proporcionar uma importante fonte para estudos adicionais retrospectivos, envolve a utilização de formol, o qual, juntamente com o posterior processamento histológico, causa certa degradação e modificações químicas nas células, as quais podem se apresentar em graus variáveis, interferindo na qualidade e na viabilidade do DNA. Sugere-se, portanto, que o aumento da amostragem e a melhoria nos protocolos de recuperação de DNA poderão gerar dados mais condizentes sobre a real prevalência de *M. hominis* nos tecidos placentários na população estudada.

Sendo assim, considerando a amostra e a metodologia empregadas, conclui-se que a prevalência de *M. hominis* foi inferior à relatada na literatura e, portanto, não foi relacionada aos dados sociodemográficos, gestacionais e neonatais. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novos estudos com amostragens maiores para melhor elucidar a relação de *M. hominis* com desfechos gestacionais adversos. A pesquisa de microrganismos intrauterinos é extremamente relevante para compreender o perfil da população estudada. A detecção de micoplasma, principalmente em gestantes, pode contribuir para o entendimento da fisiopatologia bacteriana e suas possíveis interferências desfavoráveis.

Referências

1. Marconi C. et al. Amniotic fluid interleukin-1 beta and interleukin-6, but not interleukin-8 correlate with microbial invasion of the amniotic cavity in preterm labor. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2011; 65 (6):549-56.
2. Zdrodowska-Stefanow B, Kłosowska WM, Ostaszewska-Puchalska I, Bułhak-Koziół V, Kotowicz B. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infection in women with urogenital diseases. *Adv Med Sci*. 2006; 51: 250-3.
3. Taylor-Robinson D, Lamont RF. *Mycoplasmas* in pregnancy. *BJOG*. 2011; 118(2): 164-74.
4. Larsen B, Hwang J. *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2010. pii: 521921.
5. Viscardi, R. M. *Ureaplasma* species: Role in neonatal morbidities and outcomes. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2014; 99 (1): F87-F92.
6. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008 5; 371: 75-84.
7. Gonçalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2002; 8: 3-13.
8. Mendz GL, Kaakoush NO, Quinlivan JA. Bacterial aetiological agents of intra-amniotic infections and preterm birth in pregnant women. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2013; 3: 1-7.
9. Michou V, et al. Molecular investigation of menstrual tissue for the presence of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* collected by women with a history of infertility. *Journal Obstetrics Gynaecology Research*, 2014; 40(1): 237-42.
10. Silva TG, Lima TABC, Mota AVP, Guedes VR. A importância do exame anatomopatológico da placenta em obstetrícia e neonatologia. *HU rev*. 2016; 42(3): 171-5.
11. Araujo CP. et al. Alterações placentárias macroscópicas associadas à ocorrência de fetos/recém-nascidos macrossômicos na gestação de alto risco. 58ª Reunião Anual da SBPC; 2006; Florianópolis.
12. Chang GKT. Pathological examination of the placenta: raison d'etre, clinical relevance and medicolegal utility. *Singapore Med J*. 2009; 5(12): 1123-33.
13. Mussi-pinhata MM, Yamamoto AY. Infecções congênitas e perinatais. *Jornal de Pediatria, Rio de Janeiro*, 1999; 75(S1):15-30.

14. Bauer HM, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 1991; 265:472-7.
15. Blanchard A, Yanez K, Dybvig HL, et al. Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16S rRNA gene of *Mycoplasma hominis* and detection by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1993; 31: 1358-61.
16. Coco L, Giannone T, Zarbo G. Management of high-risk pregnancy. *Minerva Ginecol*. 2014; 66(4): 383-9.
17. Riboni F, Garofalo G, Pascoli I, et al. Labour induction at term: clinical, biophysical and molecular predictive factors. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2012; 286(5): 1123-9.
18. Ministério da Saúde. *Gestação de alto risco manual técnico*. 5a.ed. Brasília, DF: MS; 2010.
19. Bittar RE. Parto pré-termo. *Revista Medica, São Paulo*, 2018; 97(2):195-207.
20. Barbosa CNS, Gonçalves LRB, Silva GRF, Brandão EC, Rêgo ES, Ferreira MM. Caracterização dos partos segundo aspectos obstétricos e sócio-demográficos das parturientes de Teresina-PI. *Rev Enf UFPI*. 2013; 02(02): 40-7.
21. Queiroz MVO, Brasil EGM, Alcântara CM de, Carneiro M da GO. Profile of pregnancy in adolescence and related clinical-obstetric occurrences. *Rev Rene*. 2014; 15(3): 455-62.
24. Santos GHN, Martins MG, Sousa MS, Batalha SJC. Impacto da idade materna sobre os resultados perinatais e via de parto. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009; 31(7): 326-34.
23. Andréia A, Gravena F, Gisleine De Paula M, Marcon SS, Dalva Barros De Carvalho M, Pelloso SM, et al. Maternal age and factors associated with perinatal outcomes. *Acta Paul Enferm*. 2013;2 6(2): 130-5.
24. Santos LAV, Lara MO, Lima RCR, Rocha AF, Rocha EM, Glória JCR, et al. História gestacional e características da assistência pré-natal de puérperas adolescentes e adultas em uma maternidade do interior de Minas Gerais, Brasil. *Ciênc. saúde coletiva*. 2018; 23(2): 617-26.
25. Saloio CA, Morais Neto OL, Gonçalves DA, Bessa HEM, Coelho Júnior JP, Afonso MSM, et al. Magnitude e determinantes da mortalidade neonatal e pós-neonatal em Goiânia, Goiás: um estudo de coorte retrospectivo. *Epidemiol Serv Saúde*. 2012; 29(5): e2020132.

26. Veloso FCS, Kassar LML, Oliveira MJC, Lima THB, Bueno NB, Gurgel RQ et al. Analysis of neonatal mortality risk factors in Brazil: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J. Pediatr.* 2019; 95(5): 519-30.
27. Blencowe EH, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller A-B, Narwal R. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet.* 2012; 379(9832): 2162-72.
28. Liu L, Oza S, Hogan D, Chu Y, Perin J, Zhu J, et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet.* 2016; 388(10063): 3027-35.
29. Amaral LM, Wallace K, Owens M, LaMarca B. Pathophysiology and Current Clinical Management of Preeclampsia. *Curr Hypertens Rep.* 2017;19(8): 61.
30. Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, Reybrouck R, Van Den Bosch T, Riphagen I, Van Lierde S. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG.* 2009; 116(10): 1315-24.
31. Cocucci SE, Santacruz Silvero MG, Losada MO, Touzón MS, RudaVega H, Vazquez Blanco M, et al. Microbiological analysis of the maternal genital tract and umbilical cord blood and its association with neonatal damage. *Rev Argent Microbiol.* 2019; 51(2): 157-63.
32. Govender S, Theron GB, Odendaal HJ, Chalkley LJ. Prevalence of genital mycoplasmas, ureaplasmas and chlamydia in pregnancy. *J Obstet Gynaecol.* 2009; 29(8): 698-701.
33. Lee SE, Romero R, Kim EC, Yoon BH. A high Nugent score but not a positive culture for genital mycoplasmas is a risk factor for spontaneous preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009; 22(3): 212-7.

Tabela 1. Caracterização sociodemográfica de gestantes com resultado de exame anatomopatológico da placenta, atendidas pelo Sistema Único de Saúde, no Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS, 2017 (n=327).

Variáveis	n	%
Idade na entrada do serviço		
< 18	14	4,3
18-24	110	33,6
25-34	134	41
35 ou mais	69	21,1
Etnia		
Branca	271	82,9
Não-branca	55	16,8
NA	1	0,3
Situação conjugal		
Com companheiro	270	82,6
Sem companheiro	53	16,2
NA	4	1,2
Grau de escolaridade		
Ensino Fundamental incompleto	78	23,9
Ensino Fundamental completo	92	28,1
Ensino Médio completo	139	42,5
Ensino Superior completo	18	5,5
Hábitos de vida		
Tabagismo	35	10,7
Alcoolismo	1	0,3
Usuária de drogas	2	0,6

NA: não analisado/informado

Tabela 2. Caracterização gestacional de pacientes com resultado de exame anatomopatológico da placenta atendidas pelo Sistema Único de Saúde, no Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS, 2017. (n=327).

Variáveis	n	%
Número de gestações		
1	138	42,2
2	102	31,2
≥ 3	87	26,6
Número de abortos prévios		
0	280	85,6
1	38	11,6
≥2	9	2,7
Tipo de parto na gestação atual		
Vaginal	49	15
Cesárea	276	84,4
Aborto	2	0,6
Gemelaridade	31	9,5
Idade gestacional em semanas + dias		
< 21+6 semanas	2	0,6
22 até 36+6 semanas	206	63,0
37 até 41+6	119	36,4
> 42		
Comorbidades maternas		
Pré-eclâmpsia, síndrome HELLP e eclâmpsia	66	20,2
Crescimento intrauterino restrito (CIUR)	63	19,3
Hipertensão arterial sistêmica (HAS) e doença hipertensiva específica da gestação (DHEG)	57	17,4
Trabalho de parto prematuro	53	16,2
Alterações de volume do líquido amniótico	52	15,9
Hipotireoidismo	47	14,4
Ruptura prematura de membranas	36	11,0
Diabetes Mellitus (DM) e DM gestacional	33	10
Descolamento prematuro de placenta (DPP)	29	8,9
Corioamnionite	23	7,0
Infecção gestacional por Sífilis, Toxoplasmose e HPV	19	5,8
Obesidade	13	4,0
Depressão	3	0,9

Tabela 3. Caracterização neonatal de gestações com resultado de exame anatomopatológico da placenta, realizados pelo Sistema Único de Saúde, no Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS, 2017. (n=327).

Variáveis	Recém-nascido 1		Recém-nascido 2	
	n	%	n	%
Desfecho gestacional				
Aborto (< 22 semanas)	2	0,6	2	6,4
Feto morto intraútero/natimorto (> 22 semanas)	17	5,2	0	0
Alojamento Conjunto	108	33,0	7	22,6
Berçário/Observação	58	17,8	6	19,3
UTI Neonatal	142	43,4	16	51,6
Peso ao nascimento (g)				
Até 999 (Extremo baixo peso)	31	10,0	3	11,1
1000 - 1499 (Muito baixo peso)	35	11,2	4	14,8
1500 - 2499 (Baixo peso)	137	44,0	14	51,8
2500-3999	104	33,4	6	22,2
> 4000 (Macrossomia)	4	1,3	0	0
Escala APGAR 1º minuto				
0-3	41	13,2	2	6,8
4-6	55	17,9	12	41,3
>7	212	68,9	15	51,7
Escala APGAR 5º minuto				
0-3	9	2,9	1	3,4
4-6	22	7,1	1	3,4
>7	277	90	27	93,2
Morte Neonatal Precoce (0-6 dias)				
Sim	14	4,5	2	6,9
Morte Neonatal Tardia (7-27 dias)				
Sim	10	3,3	1	3,4

Tabela 4. Características sociodemográficas, obstétricas e neonatais em relação à prematuridade de gestações com resultado de exame anatomopatológico da placenta, realizados pelo Sistema Único de Saúde, no Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS, 2017. (n=327).

	Termo (n=119) n (%)	Pré-termo (n=206) n (%)	p
Variáveis sociodemográficas			
Idade na entrada do serviço[#]	27,6 ± 6,7	28,1 ± 7,5	0,64
Etnia			
Branca	97 (81,5)	174 (84,4)	0,49
Não-branca	22 (18,5)	32 (15,6)	
Situação conjugal			
Com companheiro	100 (84,0)	173 (84,0)	0,99
Sem companheiro	19 (16,0)	33 (16,0)	
Grau de escolaridade			
Ensino Fundamental incompleto	25 (21,0)	53 (25,7)	0,70
Ensino Fundamental completo	32 (26,9)	58 (28,2)	
Ensino Médio completo	55 (46,2)	84 (40,8)	
Ensino Superior completo	7 (5,9)	11 (5,3)	
Hábitos de vida			
Tabagismo	11	24	0,57
Variáveis obstétricas e neonatais			
	Termo (n=117)	Pré-termo (n=182)	
Paridade			
Primigesta	52 (44,4)	75 (41,2)	0,58
Secundigesta ou múltipara	65 (55,6)	107 (58,8)	
Tipo de parto na gestação atual			
Vaginal	11 (9,4)	36 (19,8)	0,016*
Cesárea	106 (90,6)	146 (80,2)	
Comorbidades maternas			
Pré-eclâmpsia, síndrome HELLP e eclâmpsia	11 (9,4)	48 (26,4)	0,0016*
Crescimento intrauterino restrito (CIUR)	32 (27,4)	31 (17,0)	0,012*
Hipertensão arterial sistêmica (HAS) e doença hipertensiva específica da gestação (DHEG)	15 (12,8)	42 (23,1)	0,034*
Diabetes Mellitus (DM) e DM gestacional	15 (12,8)	15 (8,2)	0,017*
Desfecho neonatal			
Alojamento Conjunto ou Berçário	111 (94,9)	48 (26,4)	<0,0001*
UTI Neonatal	5 (4,3)	114 (62,6)	
Feto morto intraútero/natimorto (> 22 semanas)	1 (0,8)	16 (8,8)	
Peso ao nascimento (g)			
<1499 (Extremo baixo peso e Muito baixo peso)	0	59 (32,4)	<0,0001*
1500 - 2499 (Baixo peso)	36 (30,7)	85 (45,0)	
2500-3999	78 (66,7)	24 (13,2)	
> 4000 (Macrossomia)	3 (2,6)	1 (0,55)	
Escala APGAR 1º minuto			
0-3	3 (2,6)	34 (18,7)	<0,0001*
4-6	12 (10,2)	33 (18,1)	

>7	102 (87,2)	98 (53,8)	
Escala APGAR 5º minuto			
0-3	1 (0,8)	7 (3,8)	
4-6	2 (1,6)	17 (9,3)	0,034*
>7	114 (97,6)	141 (77,5)	
Morte Neonatal Precoce (0-6 dias)			
Sim	2 (1,6)	11 (6,0)	0,08
Morte Neonatal Tardia (7-27 dias)			
Sim	0	9 (4,9)	0,013*
Corioamnionite histológica			
Sim	19 (16,2)	52 (28,6)	0,017*
Infarto placentário			
Sim	4	24	0,004*
Positividade para <i>Mycoplasma hominis</i>	0	2 (1,1)	0,52

^a Dados de gestações gemelares (n=26) e abortos (n=2) não foram considerados (n termo = 117 e n pré-termo = 182)

média ± DP, teste t Student

n(%), teste X² ou Teste Exato de Fisher

* p < 0,05

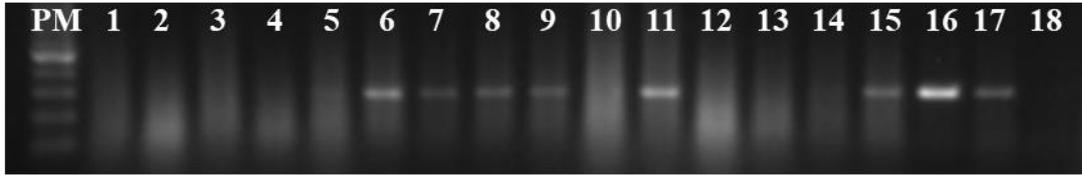


Figura 1. Gel de agarose corado com brometo de etídeo após eletroforese para separação e visualização das bandas representativas do gene da beta-globina, demonstrando extração do DNA total das amostras. Linhas 1-4; 10; 12-14: amostras negativas; linhas 6-9; 11; 15-16: amostras positivas; linha 17: controle positivo; linha 18: controle negativo). (PM: peso molecular 100 pares de base (bp); tamanho esperado do produto amplificado: 268pb)

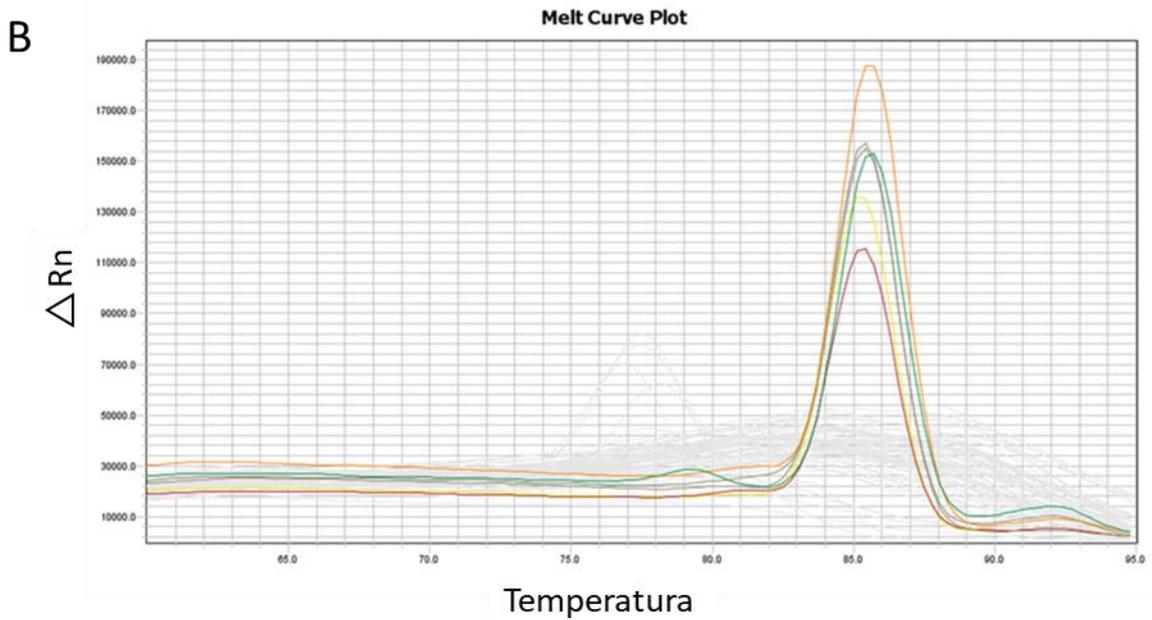
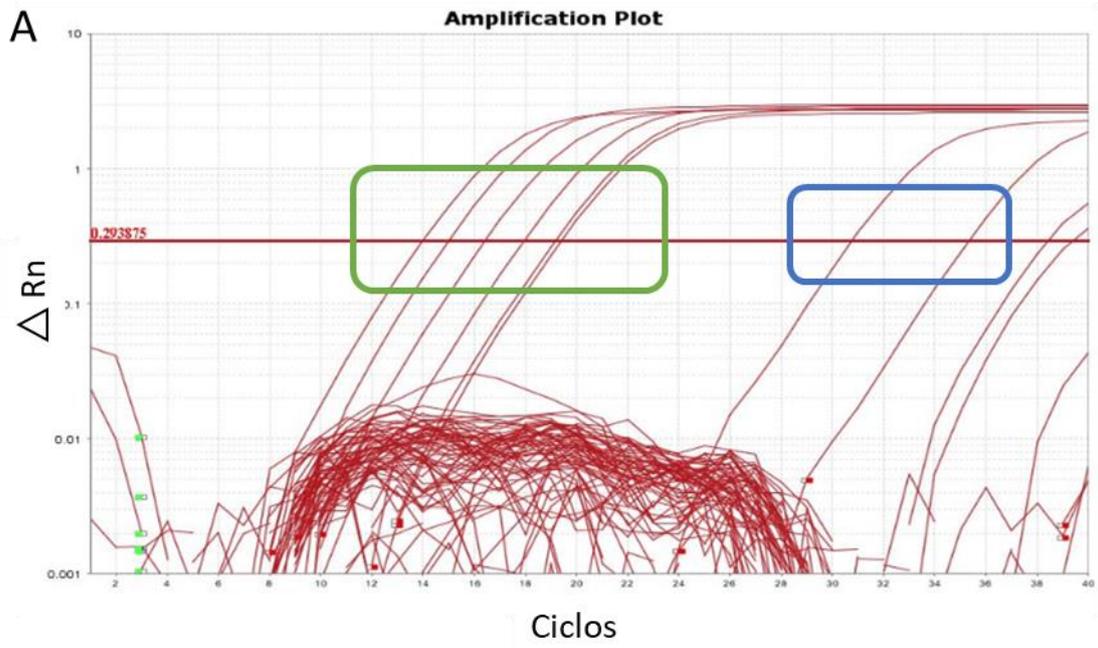


Figura 2. A. Curva de amplificação da curva padrão com diluição 1:2 das amostras de DNA extraído de ATCC de *Mycoplasma hominis* (destaque em verde) e curva de amplificação de duas amostras positivas (destaque em azul). **B.** Curva de *melting* demonstrado a especificidade do fragmento amplificado (Temperatura de melting = 85,4°C); ΔRn =fluorescência.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após execução do projeto de pesquisa e a apresentação de resultados no artigo científico, foi concluído que o objetivo de determinar a prevalência de micoplasma e ureaplasma em tecidos placentários foi cumprido parcialmente. Devido às dificuldades relacionadas a pandemia por Covid-19, referente a suspensão do calendário acadêmico e pelas dificuldades impostas pelas técnicas de extração de DNA e análises por PCR.

Quanto aos resultados obtidos, foram incluídos dados de 327 pacientes, relacionados as características sociodemográficas, história reprodutiva pregressa e da gestação atual, bem como caracterização neonatal, conforme resultados apresentados no artigo científico. A positividade de *Mycoplasma hominis* não foi observada e, portanto, não foi possível fazer a correlação dessa variável com a prematuridade ou outras características gestacionais e novos estudos com maior amostragem devem ser realizados para melhor compreensão das características da população estudada.

A revista escolhida para nortear as normas do artigo foi a Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil. No entanto, alguns ajustes ainda devem ser realizados no artigo científico de maneira a obedecer às normas da revista, como por exemplo, o número máximo de palavras e referências.

5. APÊNDICES

APÊNDICE A – NOVA FICHA DE TRANSCRIÇÃO DE DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS, GESTACIONAIS E RESULTADO DAS ANÁLISES PCR

Pesquisador Responsável: Prof^a. Dra. Jossimara Poletini

Contatos: telefone (14) 998027402 – Email: jossimara.poletini@uffs.edu.br

1. Número do formulário:	nform _____
Dados da parturiente	
2. Número do prontuário:	npront _____
3. Número do exame anatomopatológico:	nap A17- _____
4. Idade na entrada do serviço:	idad _____
5. Etnia: (1) Branco (2) Pardo (3) Negro (4) Não consta	etn ____
6. Estado civil: (1) Casado (2) Solteiro (3) Divorciado (4) União estável (5) Não consta	estciv ____
7. Grau de escolaridade: (1) Ensino Fundamental incompleto (2) Ensino Fundamental completo (3) Ensino Médio completo (4) Ensino Superior completo (5) Não consta	esc ____
8. Idade gestacional em dias	idgest _____

9. Número de gestações		G __
10. Número de partos vaginais		P __
11. Número de cesáreas		C __
12. Número de abortos		A __
13. Tipo de parto (1) Vaginal (2) Cesárea		part __
Comorbidades da mãe e informações da gestação		
14. Tabagismo	(1) Sim (2) Não	tab __
15. Alcoolismo	(1) Sim (2) Não	alc __
16. HAS	(1) Sim (2) Não	has __
17. DHEG	(1) Sim (2) Não	dheg __
18. Diabetes Mellitus	(1) Sim (2) Não	dm __
19. DM Gestacional	(1) Sim (2) Não	dmg __
20. Hipotireoidismo	(1) Sim (2) Não	hipo __
21. Hipertireoidismo	(1) Sim (2) Não	hiper __
22. Depressão	(1) Sim (2) Não	dep __
23. Epilepsia	(1) Sim (2) Não	epi __
24. Plaquetopenia	(1) Sim (2) Não	plaq __
25. Asma	(1) Sim (2) Não	asm __
26. Trombofilia	(1) Sim (2) Não	tbf __
27. Usuária de drogas	(1) Sim (2) Não	dro __
28. Obesidade	(1) Sim (2) Não	obe __
29. Câncer de colo uterino	(1) Sim (2) Não	cac __
30. HIV	(1) Sim (2) Não	hiv __
31. Sífilis na gestação, tratada	(1) Sim (2) Não	st __
32. Sífilis na gestação, inadequadamente tratada	(1) Sim (2) Não	snt __
33. Toxoplasmose na gestação, tratada	(1) Sim (2) Não	txt __
34. Toxoplasmose na gestação, inadequadamente tratada	(1) Sim (2) Não	txnt __
35. HPV	(1) Sim (2) Não	hvp __
36. Anidrâmnio	(1) Sim (2) Não	ani __
37. Oligodrâmnio	(1) Sim (2) Não	oli __
38. Polidrâmnio	(1) Sim (2) Não	poli __
39. CIUR	(1) Sim (2) Não	ciur __
40. Centralização fetal	(1) Sim (2) Não	centf __
41. Corioamnionite	(1) Sim (2) Não	corio __
42. Pré-eclâmpsia	(1) Sim (2) Não	prec __
43. HELLP	(1) Sim (2) Não	hel __
44. Eclâmpsia	(1) Sim (2) Não	ecl __
45. Alterações no US morfológico (malformações)	(1) Sim (2) Não	altus __
46. Alterações na Cardiotocografia (CTG)	(1) Sim (2) Não	ctg __

47. Aloimunização	(1) Sim (2) Não	aloi __
48. Alteração no ducto venoso	(1) Sim (2) Não	altdu __
49. Lesão placentária identificada no US	(1) Sim (2) Não	lesp __
50. Anemia fetal	(1) Sim (2) Não	ane __
51. Macrossomia fetal	(1) Sim (2) Não	mac __
52. Hidropsia fetal	(1) Sim (2) Não	hid __
53. Incompetência istmo-cervical	(1) Sim (2) Não	iic __
54. Descolamento prematuro de placenta (DPP)	(1) Sim (2) Não	dpp __
55. Ruptura Prematura de Membranas (RUPREME-PT)	(1) Sim (2) Não	rup __
56. Depósito de mecônio	(1) Sim (2) Não	mec __
57. Acretismo placentário	(1) Sim (2) Não	acr __
58. Placenta prévia ou baixa	(1) Sim (2) Não	plp __
59. Desproporção cefalopélvica (DCP)	(1) Sim (2) Não	dcp __
60. Iteratividade	(1) Sim (2) Não	ite __
61. Trabalho de parto prematuro	(1) Sim (2) Não	tpp __
62. Apresentação desfavorável	(1) Sim (2) Não	apd __
63. Desfecho gestacional		
(1) Aborto (< 22 semanas) (2) Feto morto intraútero/natimorto (> 22 semanas) (3) Alojamento Conjunto (4) Berçário/Observação (5) UTI Neonatal		desf __
Dados do recém-nascido		
64. Escala APGAR 1º minuto		apg1 __
65. Escala APGAR 5º minuto		apg5 __
66. Peso ao nascimento (kg)		peso _____
67. Morte Neonatal Precoce (0-6 dias)	(1) Sim (2) Não	mnp __
68. Morte Neonatal Tardia (7-27 dias)	(1) Sim (2) Não	mnt __
69. Gestação gemelar	(1) Sim (2) Não	gem __
Dados do recém-nascido 2 (Gemelar)		
70. Escala APGAR 1º minuto		2apg1 __
71. Escala APGAR 5º minuto		2apg5 __
72. Peso ao nascimento (kg)		2peso _____
73. Desfecho gestacional do recém-nascido 2 (Gemelar)		
(1) Aborto/< 22 semanas (2) Feto morto intraútero/natimorto/> 22 semanas (3) Alojamento Conjunto (4) Berçário/Observação (5) UTI Neonatal		2desf __
74. Morte Neonatal Precoce (0-6 dias)	(1) Sim (2) Não	2mnp __
75. Morte Neonatal Tardia (7-27 dias)	(1) Sim (2) Não	2mnt __
Resultado do exame anatomopatológico		
Alterações da maturação		
76. Maturação irregular	(1) Sim (2) Não	matir __
77. Imaturidade vilosa	(1) Sim (2) Não	imavil __
Alterações inflamatórias		
78. Membranas (Corioamnionite)	(1) Sim (2) Não	corioam __
79. Parênquima (Vilite)	(1) Sim (2) Não	vil __
80. Vasos umbilicais (Funisite)	(1) Sim (2) Não	fun __
Alterações circulatórias do parênquima		
81. Infartos	(1) Sim (2) Não	inf __
82. Vasculites	(1) Sim (2) Não	vas __

83. Tromboses	(1) Sim (2) Não	tro __
84. Arteriopatia decidual	(1) Sim (2) Não	artdec __
85. Corioangioma	(1) Sim (2) Não	corang __
86. Neoplasia	(1) Sim (2) Não	neop __
87. Depósito de mecônio	(1) Sim (2) Não	meco __
88. Cordão curto	(1) Sim (2) Não	cordc __
89. Malformações	(1) Sim (2) Não	malf __
Segunda placenta (gestação gemelar)	(1) Sim (2) Não	plac2 __
Resultado do exame anatomopatológico da placenta 2		
Alterações da maturação		
90. Maturação irregular	(1) Sim (2) Não	matir __
91. Imaturidade vilosa	(1) Sim (2) Não	imavil __
Alterações inflamatórias		
92. Membranas (Corioamnionite)	(1) Sim (2) Não	corioam __
93. Parênquima (Vilite)	(1) Sim (2) Não	vil __
94. Vasos umbilicais (Funisite)	(1) Sim (2) Não	fun __
Alterações circulatórias do parênquima		
95. Infartos	(1) Sim (2) Não	inf __
96. Vasculites	(1) Sim (2) Não	vas __
97. Tromboses	(1) Sim (2) Não	tro __
98. Arteriopatia decidual	(1) Sim (2) Não	artdec __
99. Corioangioma	(1) Sim (2) Não	corang __
100. Neoplasia	(1) Sim (2) Não	neop __
101. Depósito de mecônio	(1) Sim (2) Não	meco __
102. Cordão curto	(1) Sim (2) Não	cordc __
103. Malformações	(1) Sim (2) Não	malf __
104. Resultado da análise PCR		
(1) Positivo para Mycoplasma hominis (2) Negativo para Mycoplasma hominis		pcr __

6. ANEXOS

ANEXO A – ACEITE DE ORIENTAÇÃO E COORIENTAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS PASSO FUNDO/RS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO – TCC

FORMULÁRIO DE ACEITE DE ORIENTAÇÃO E COORIENTAÇÃO

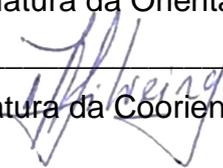
Eu, professora, Jossimara Poletini aceito orientar o TCC da Acadêmica Rafaela Camelo, cujo tema é Pesquisa de micoplasma e ureaplasma em tecidos placentários.

Eu, professora Daniela Augustin Silveira, aceito coorientar o TCC da Acadêmica Rafaela Camelo, cujo tema é Pesquisa de micoplasma e ureaplasma em tecidos placentários.

Por ser verdade, firmo o presente documento.

Passo Fundo, 30 de janeiro de 2021.


Assinatura da Orientadora


Assinatura da Coorientadora



Assinatura da Acadêmica

ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PESQUISA DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) EM TECIDOS

Pesquisador: Daniela Augustin Silveira

Versão: 2

CAAE: 21478519.4.0000.5564

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – UFFS

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 121761/2019

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto PESQUISA DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) EM TECIDOS PLACENTÁRIOS que tem como pesquisador responsável Daniela Augustin Silveira, foi recebido para análise ética no CEP Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS em 20/09/2019 às 11:45.

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
Bairro: Área Rural **CEP:** 89.815-899

UF: SC **Município:** CHAPECO
Telefone: (49)2049-3745

E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br

ANEXO C – PARECER DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PESQUISA DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) EM TECIDOS PLACENTÁRIOS

Pesquisador: Daniela Augustin Silveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 21478519.4.0000.5564

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.704.977

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há impedimentos éticos no protocolo de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador(a)

A partir desse momento o CEP passa a ser corresponsável, em termos éticos, do seu projeto de pesquisa – vide artigo X.3.9. da Resolução 466 de 12/12/2012.

Fique atento(a) para as suas obrigações junto a este CEP ao longo da realização da sua pesquisa. Tenha em mente a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, a Norma Operacional CNS 001/2013 e o Capítulo III da Resolução CNS 251/1997. A página do CEP/UFFS apresenta alguns pontos no documento “Deveres do Pesquisador”.

Lembre-se que:

1. No prazo máximo de 6 meses, a contar da emissão deste parecer consubstanciado, deverá ser enviado um relatório parcial a este CEP (via NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil) referindo em que fase do projeto a pesquisa se encontra. Veja modelo na página do CEP/UFFS. Um novo relatório parcial deverá ser enviado a cada 6 meses, até que seja enviado o relatório final.
2. Qualquer alteração que ocorra no decorrer da execução do seu projeto e que não tenha sido prevista deve ser imediatamente comunicada ao CEP por meio de EMENDA, na Plataforma Brasil. O não cumprimento desta determinação acarretará na suspensão ética do seu projeto.

3. Ao final da pesquisa deverá ser encaminhado o relatório final por meio de NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil. Deverá ser anexado comprovação de publicização dos resultados. Veja modelo na página do CEP/UFFS.

Em caso de dúvida:

Contate o CEP/UFFS: (49) 2049-3745 (8:00 às 12:00 e 14:00 às 17:00) ou cep.uffs@uffs.edu.br;

Contate a Plataforma Brasil pelo telefone 136, opção 8 e opção 9, solicitando ao atendente suporte Plataforma Brasil das 08h às 20h, de segunda a sexta;

Contate a “central de suporte” da Plataforma Brasil, clicando no ícone no canto superior direito da página eletrônica da Plataforma Brasil. O atendimento é online.

Boa pesquisa!

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1432044.pdf	01/11/2019 20:21:18		Aceito
Outros	NovoTermoUsodeDados.pdf	01/11/2019 20:20:16	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhadoAtualizado.pdf	01/11/2019 20:05:19	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Outros	CartadePendencias.pdf	01/11/2019 19:56:23	Daniela Augustin Silveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	NovoTCLE.pdf	01/11/2019 19:47:28	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Outros	termodecienciainstituicaoHSVP.pdf	13/09/2019 19:46:19	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Outros	fichadeoletadedados.pdf	13/09/2019 19:45:02	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	13/09/2019 19:36:56	Daniela Augustin Silveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CHAPECO, 14 de Novembro de 2019

**Assinado por:
Fabiane de Andrade Leite (Coordenadora)**

ANEXO D – NORMAS DA REVISTA PARA SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO

Normas da Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil

Artigos Originais divulgam resultados de pesquisas inéditas e devem procurar oferecer qualidade metodológica suficiente para permitir a sua reprodução. Para os artigos originais recomenda-se seguir a estrutura convencional, conforme as seguintes seções: *Introdução*: onde se apresenta a relevância do tema estudos preliminares da literatura e as hipóteses iniciais, a questão da pesquisa e sua justificativa quanto ao objetivo, que deve ser claro e breve; *Métodos*: descrevem a população estudada, os critérios de seleção inclusão e exclusão da amostra, definem as variáveis utilizadas e informam a maneira que permite a reprodutividade do estudo, em relação a procedimentos técnicos e instrumentos utilizados. Os trabalhos quantitativos devem informar a análise estatística utilizada. *Resultados*: devem ser apresentados de forma concisa, clara e objetiva, em sequência lógica e apoiados nas ilustrações como: tabelas e figuras (gráficos, desenhos, fotografias); *Discussão*: interpreta os resultados obtidos verificando a sua compatibilidade com os citados na literatura, ressaltando aspectos novos e importantes e vinculando as conclusões aos objetivos do estudo. Aceitam-se outros formatos de artigos originais, quando pertinente, de acordo com a natureza do trabalho.

Os manuscritos deverão ter no máximo 5.000 palavras, e as tabelas e figuras devem ser no máximo cinco no total; recomenda-se citar até 30 referências bibliográficas.

Notas

1. Em todos os tipos de arquivo a contagem do número de palavras exclui títulos, resumos, palavras-chave, tabelas, figuras e referências;
2. Por ocasião da submissão os autores devem informar o número de palavras do manuscrito.
3. Nos artigos de título extenso (12 ou mais termos) é exigido também apresentar o título abreviado (máximo 9 termos).
4. *Cover Letter*. No texto de encaminhamento do manuscrito para a Revista (cover letter) deve ser informado sobre a originalidade do mesmo e a razão porque foi submetida à RBSMI. Além disso deve informar a participação de cada autor na

elaboração do trabalho, o autor responsável pela troca de correspondência, as fontes e tipo de auxílio e o nome da agência financiadora.

Apresentação dos manuscritos

Os manuscritos deverão ser digitados no programa Microsoft Word for Windows, em fonte Times New Roman, tamanho 12, espaço duplo.

Estrutura do manuscrito

Identificação título do trabalho: em português ou espanhol e em inglês, nome e endereço completo dos autores e respectivas instituições (uma só por autor).

Resumos deverão ter no máximo 210 palavras e serem escritos em português ou espanhol e em inglês. Para os Artigos Originais, Notas de Pesquisa e Artigos de Revisão Sistemática os resumos devem ser estruturados em: *Objetivos, Métodos, Resultados, Conclusões*. Relatos de Caso/Série de Casos devem ser estruturados em: *Introdução, Descrição, Discussão*. Nos artigos de Revisão Sistemática os resumos deverão ser estruturados em: *Objetivos, Métodos* (fonte de dados, período, descritores, seleção dos estudos), *Resultados, Conclusões*. Para o Informes Técnico-Institucionais e Artigos Especiais o resumo não é estruturado.

Palavras-chave para identificar o conteúdo dos trabalhos os resumos deverão ser acompanhados de três a seis palavras-chave em português ou espanhol e em inglês, utilizando-se os Descritores em Ciências da Saúde (DECS) da Metodologia LILACS, e o seu correspondente em inglês o Medical Subject Headings (MESH) do MEDLINE, adequando os termos designados pelos autores a estes vocabulários.

Ilustrações tabelas e figuras somente em branco e preto ou em escalas de cinza (gráficos, desenhos, mapas, fotografias) deverão ser inseridas após a seção de Referências. Os gráficos deverão ser bidimensionais.

Agradecimentos à colaboração de pessoas, ao auxílio técnico e ao apoio financeiro e material, especificando a natureza do apoio, e entidade financiadora.

Citações e Referências as citações no texto devem ser numeradas em sobrescrito conforme sua ordem de aparecimento. As referências devem ser organizadas em sequência numérica correspondente às citações; não devem ultrapassar o número estipulado em cada seção de acordo com estas Instruções aos Autores. A Revista adota as normas do *International Committee of Medical Journals Editors* - ICMJE (Grupo de Vancouver), com algumas alterações; siga o formato dos exemplos aqui especificados:

Quando autor for o mesmo da casa editora: não mencionar a casa editora:
WHO (World Health Organization). WHO recommendations for prevention and
treatment of pre-eclampsia and eclampsia. Geneva; 2011.

- Livro (Autor. Título. Edição. Local: casa editora; Ano)

Heeringa SG, West BT, Berglund PA. Applied survey data analysis. 2 ed. Boca
Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group; 2017.

**- Capítulo de Livro (Autor. Título do capítulo. In: organizadores. Título do
livro. Edição. Local: casa editora; Ano. Páginas inicial e final do capítulo)**

Demakakos P, McMunn A, Steptoe A. Well-being in older age: a
multidimensional perspective. In: Banks J, Lessof C, Nazroo J, Rogers N, Stafford M,
Steptoe A, editors. Financial circumstances, health and well-being of the older
population in England. The 2008 English Longitudinal Study of Ageing (Wave 4).
London: The Institute for Fiscal Studies; 2010. p. 131-93.

- E-book

**Editor, Organizador, Compilador (Autor (es), editor. Título. Local: casa
editora; Ano)**

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer. Washington,
D.C.: National Academy Press; 2001.

- Eventos no todo (Reuniões, Encontros Científicos)

(Evento; Data; Local do evento. Local: casa editora; Ano)

Anais do IX Congresso Estadual de Medicina Veterinária; 13-16 jul 1985; Santa
Maria, RS. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 1985.
Proceedings of the 12th International Triennial Congress of the International
Ergonomics Association; 1994 Aug 15-19; Toronto, CA. Toronto: IEA; 1994.

- Trabalho apresentado em evento (anais publicados)

**(Autor. Título do trabalho. In: evento; Data; Local do evento. Local: casa
editora; Ano. Páginas inicial e final)**

Jung MRT. As técnicas de marketing a serviço da Biblioteconomia. In: Anais IX
Congresso Brasileiro de Biblioteconomia e Documentação; 18 - 19 maio 2005;
Salvador, BA. Brasília, DF: Associação Brasileira de Bibliotecários; 2005. p. 230-9.

- Trabalho apresentado em evento (não publicados)

(Autor. Título [Evento; Data; Local do evento])

Philippi Jr A. Transporte e qualidade ambiental [Apresentação ao Seminário
Riscos do Cotidiano no Espaço Urbano: desafios para a saúde pública; 1994 set 20;
Rio de Janeiro, Brasil].

- Dissertações e Teses

(Autor. Título [dissertação/tese]. Local: entidade responsável; Ano.)

Pedroso M. Inteligência decisória e análise de políticas públicas: o caso das Unidades de Pronto Atendimento (UPAs) **[tese]**. Brasília: Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade da Universidade de Brasília; 2011.

Jardim DMB. Pai-acompanhante e a sua compreensão sobre o processo de nascimento do filho **[dissertação]**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2009.

Considerando que o estilo Vancouver não considera com as informações das leis brasileiras, há adaptações:

- Documentos de Natureza Governamental

Competência (país, estado, cidade). Título (especificações da legislação, número e data). Ementa. Título da publicação oficial. Local (cidade), Data (dia, mês abreviado e ano); Seção, volume, número, paginação.

Brasil. Ministério da Educação e Cultura. Secretaria da Cultura. Portaria n.º 23, de 26 de outubro de 1982. Modifica o Plano Nacional de Microfilmagem de Periódicos Brasileiros criado pela Portaria DAC n.º. 31, de 11 de dezembro de 1978. Diário Oficial da União [DOU]. Brasília, 1 dez 1982; Seção 1, v.120, n.227, p. 22438.

Brasil. Ministério da Saúde. Lei nº 8.080, 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. [acesso em 10 mai 2009]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/LEI880.pdf>

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 154, 24 de janeiro de 2008. Cria os Núcleos de Apoio à Saúde da Família (NASF). [acesso em 20 set 2009]. Disponível em: http://dtr2004.saude.gov.br/dab/docs/legislacao/portaria154_24_01_08.pdf

- Artigo Publicado em Periódico

(Autor. Título. Sigla do Periódico. Ano; Volume (número): páginas inicial e final)

El Hachem H, Crepaux V, May-Panloup P, Descamps P, Legendre G, Bouet PE. Recurrent pregnancy loss: current perspectives. Int J Women Health. 2017; 9: 331-45.

- Artigo Publicado em Número Suplementar

(Autor. Título. Sigla do Periódico. Ano; Volume (número suplemento): páginas inicial e final)

Lothian JA. The coalition for improving maternity services evidence basis for the ten steps of mother-friendly care. J Perinat Educ. 2007; 16 (Suppl.): S1-S4.

- Citação de Editorial, Cartas

(Autor. Título [Editorial/Carta]. Sigla do Periódico. Ano; Volume (número): páginas inicial e final)

Cabral-Filho JE. Pobreza e desenvolvimento humano: resposta das revistas científicas ao desafio do Council of Science Editors [editorial]. Rev Bras Saúde Matern Infant. 2007; 7 (4): 345-6.

Fernandes EC, Ferreira ALCG, Marinho TMS. Das ações às palavras [Carta]. Rev Bras Saúde Mater Infant. 2009; 9 (1): 95-6.

- Artigo Publicado em periódico eletrônico

(Autor. Título. Sigla do Periódico [internet]. Ano [data de acesso]; Volume (número): páginas inicial e final. Site disponível)

Neuman NA. Multimistura de farelos não combate a anemia. J Pastoral Criança [periódico *on line*]. 2005 [acesso em 26 jun 2006]. 104: 14p. Disponível em: www.pastoraldacrianca.org.br/105/pag14/pdf.

Najim RA, Al-Waiz MM, Al-Razuqi RA. Acetylator phenotype in Iraqui patients with atopic dermatitis. Dermatol Online J [Internet]. 2006 [cited 2007 Jan 9]; 12 (7). Available from: <http://dermatology.cdlib.org/127/original/acetylator/najim.html>

National Osteoporosis Foundation of South Africa. Use of generic alendronate in the treatment of osteoporosis. S Afr Med J [Internet]. 2006 [cited 2007 Jan 9]; 96 (8): 696-7. Available from:

http://blues.sabinet.co.za/WebZ/Authorize?essionid=0:autho=pubmed:password=pubmed2004&/AdvancedQuery?&format=F&next=images/ejour/m_samj/m_samj_v96_n8_a12.pdf

- Artigo aceito para publicação em periódico (Autor. Título. Sigla do Periódico. Ano. (No prelo).

Quinino LRM, Samico IC, Barbosa CS. Análise da implantação do Programa de Controle da Esquistossomose em dois municípios da zona da mata de Pernambuco, Brasil. Cad Saúde Coletiva (Rio J.). 2010. (No prelo).

- Materiais eletrônicos disponíveis em CD-Rom (Autor. Título [tipo de material]. Editor, Edição. Versão. Local: Editora; Ano.)

Reeves JRT, Maibach H. CDI, clinical dermatology illustred [monografia em CD-ROM]. Multimedia Group, producers. 2 ed. Version 2.0. San Diego: CMEA; 1995.

- Material de acesso exclusivo em meio eletrônico

- **Homepage**

Autoria. Título. [suporte]. Local; Ano [acesso dia mês ano].

Disponibilidade de acesso

Instituto Oswaldo Cruz. Departamento de Ensino. IOC ensino [*online*]. Rio de Janeiro, Brasil; 2004. [acesso 3 mar 2004]. Disponível em: <http://157.86.113.12/ensino/cgi/public/cgilua.exe/web/templates/html>

Para outras informações consulte o site ICMJE: https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

**ANEXO E – TERMO DE CIÊNCIA DO VOLUME FINAL DO TRABALHO DE
CONCLUSÃO DE CURSO**

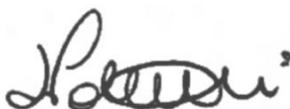
PESQUISA DE MICOPLASMA E UREAPLASMA EM TECIDOS PLACENTÁRIOS

TERMO DE CIÊNCIA DO VOLUME FINAL DO TCC

Eu, professora Jossimara Polettini, declaro ter conferido as correções realizadas no artigo científico, conforme sugestão da Comissão Examinadora. Declaro também que estou ciente do conteúdo que compõe o volume final do TCC da Acadêmica Rafaela Camelo.

Por ser verdade, firmo o presente documento.

Passo Fundo, 28 de fevereiro de 2021.



Prof^ª. Dr^ª. Jossimara Polettini