BRUNA BARBOSA HACKBARTH

# ESTUDO DE FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À PREMATURIDADE

JOINVILLE
2015

BRUNA BARBOSA HACKBARTH

# ESTUDO DE FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À PREMATURIDADE

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville. Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França. Co-orientador: Prof. Dr. Jean Carl Silva.

JOINVILLE

2015

## TERMO DE APROVAÇÃO

Bruna Barbosa Hackbarth

**ESTUDO DE FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À PREMATURIDADE**

Dissertação julgada para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville. Área de concentração (Saúde). Aprovada em 09 de fevereiro de 2015.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Orientador Paulo Henrique Condeixa de França (UNIVILLE)

Prof. Dr. Co-orientador Jean Carl Silva (UNIVILLE)

Prof. Dr. Carlos Augusto Cardim de Oliveira, membro interno (UNIVILLE)

Profa. Dra. Deli Grace de Barros Araújo, membro externo (Centro Universitário – Católica de Santa Catarina);

Joinville, 09 de fevereiro de 2015

À Família Hackbosa e ao “meu” Fábio.

## AGRADECIMENTOS

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)/CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo fomento à pesquisa.

Ao orientador Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França pela imensa carga de conhecimento transmitido e pela confiança desde os tempos de graduação.

Ao co-orientador Prof. Dr. Jean Carl Silva pelo auxílio importante dirigido aos aspectos práticos e de coleta de dados em campo de estudo.

Aos estabelecimentos de saúde, Maternidade Darcy Vargas e Laboratório de Análises Clínicas Gimenes, que viabilizaram a realização do estudo.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular da UNIVILLE, composta essencialmente por Leslie Ecker Ferreira, Jéssica Augustini Ferreira e Heidi Pfutzenreuter Cartens, imprescindível para a realização das análises genéticas.

Aos incansáveis alunos da Graduação em Medicina, Augusto Radünz Amaral, Bruna da Silva Ferreira e Mariana Ribeiro Silva, pela captação de dados na Maternidade Darcy Vargas. Ao Augusto, um especial agradecimento pela extrema ajuda na análise estatística.

“*By all means let’s be open-minded, but not so open-minded that our brains drop out”*

(Richard Dawkins)

## RESUMO

A prematuridade é considerada um problema de saúde pública relevante. A Organização Mundial da Saúde estima que 15 milhões de bebês prematuros nasçam todos os anos no mundo. No Brasil, seguindo tendências semelhantes a outros países, vem sendo registrado um aumento na incidência da prematuridade. Propôs-se investigar a associação entre fatores de risco genéticos, sociodemográficos, comportamentais, biológicos e médicos e a ocorrência da prematuridade. O estudo foi realizado na Maternidade Darcy Vargas (MDV), localizada na cidade de Joinville/SC, dentre os meses de outubro de 2013 a outubro de 2014. O grupo caso foi composto por gestantes primíparas entre 18 e 35 anos, com trabalho de parto espontâneo, resultando em feto único, vivo e sem malformações evidentes, nascido anteriormente à 37ª semana de gestação. O grupo controle constituiu-se por partos ocorridos entre a 37ª e a 42ª semana de gestação. A avaliação dos fatores de risco propostos se deu através da aplicação de questionários validados ou desenvolvidos especificamente e da análise de prontuário eletrônico. A técnica de PCR em Tempo Real foi utilizada para analisar a influência dos polimorfismos rs12473815 do gene *FSHR* e rs1942836 do gene *PGR* sobre a prematuridade. Foram inclusas 157 gestantes (45 casos e 112 controles). Observou-se associação entre o nascimento prematuro e ingestão alcoólica, identificada pelo teste AUDIT-C (p=0,01), quando o consumo se dava em duas ou mais ocasiões mensais (OR 1,7 [IC 95%: 1,1-4,6]). O baixo IMC pré-gestacional se mostrou preditor do nascimento prematuro espontâneo (OR 3,8 [IC 95%: 1,3-11,6]), enquanto o elevado IMC reduziu a sua probabilidade (OR 0,6 [IC 95%:0,3-0,9]). Os genótipos CT do polimorfismo rs12473815 e TC e CC do polimorfismo rs1942836 mostraram-se associados a uma maior chance de desenvolver parto prematuro.



**Palavras chave:** nascimento prematuro; fatores de risco; polimorfismo de nucleotídeo único; receptor de progesterona; receptor do hormônio folículoestimulante.

**ABSTRACT**

Preterm birth is considered an important public health problem. The World Health Organization estimates that 15 million premature babies are born every year worldwide. In Brazil, following similar trends of other countries, has been registered an increase in the incidence of preterm birth. We aimed to investigate the association between genetic, sociodemographic, behavioral, biological, and medical risk factors and occurrence of prematurity. The study was conducted at the Darcy Vargas Maternity (MDV), located in Joinville / SC, from October 2013 to October 2014. The case group consisted of primiparous women between 18 and 35 years, with spontaneous preterm birth, resulting in a single live fetus with no apparent malformations, born before the 37th week of gestation. The control group consisted of births between the 37th and the 42nd week of gestation. The assessment of proposed risk factors was made through validated or specifically developed questionnaires and analysis of electronically recorded medical data. Real-time PCR was employed to analyze the influence of *FSHR* (rs12473815) and *PGR (*rs1942836) polymorphisms on preterm birth. One hundred and fifty-seven pregnant women were included (45 cases and 112 controls). There was an association between preterm birth and alcohol intake, identified by the AUDIT-C test (p = 0.01), when consumption occurred in 2 or more times per month (OR 1.7 [CI 95%: 1,1-4,6]). Low pre-pregnancy BMI was a predictor of spontaneous preterm birth (OR 3.8 [CI 95%: 1,3-11,6]), while high BMI reduced this likelihood (OR 0.6 [CI 95%: 0,3-0,9]). The genotypes CT of rs12473815 and TC and CC of rs1942836 were associated with a higher chance of developing premature birth.

**Key-words:** preterm birth; risk factors; single nucleotide polymorphism; progesterone receptor; follicle-stimulating hormone receptor.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número estimado de nascimentos prematuros em 2010 e ranking dos dez países responsáveis por 60% de todos os casos de prematuridade.....39

Figura 2 - Tendência nas taxas e nos números de nascimento prematuro em países desenvolvidos e da América Latina e Caribe, incluindo projeção até 2025.....40

Figura 3 – Porcentagem de partos cesáreos realizados no Brasil no período de 1996 a 2011. .....42

Figura 4 - Prevalência do tabagismo entre gestantes no Brasil, considerando estimativas de estudos populacionais. .....45

Figura 5 - Organização estrutural das isoformas A e B do receptor da progesterona, evidenciando a sequencia adicional de aminoácidos da isoforma B.....61

Figura 6 - Modelo esquemático do receptor do FSH. .....62

Figura 7 – Gel de agarose 1% com produtos da PCR do polimorfismo rs12473815 do gene *FSHR*.....70

Figura 8 - Exemplos de cromatogramas obtidos por meio de sequenciamento de amostras de DNA após reação convencional de PCR para o polimorfismo rs12473815 do gene *FSHR*. .....71

Figura 9 - Gráfico de amplificação por qPCR para o polimorfismo rs12473815 do gene FSHR, denotando paciente com genótipo heterozigoto. .....74

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Valores de glicose plasmática em mg/dL para diagnóstico do *Diabetes Mellitus*. .....54

Quadro 2 - Proporção dos reagentes para cada reação de qPCR para discriminação alélica dos polimorfismos rs12473815 do gene FSHR e rs1942836 do gene PGR. .73

Quadro 3 - Tempos, temperaturas e ciclos da qPCR para discriminação alélica do polimorfismo rs12473815 do gene *FSHR* e rs1942836 do gene *PGR*. .....73

.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Influência da ingestão alcoólica e do IMC pré-gestacional sobre o nascimento prematuro. ..... 86

Tabela 2 - Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos rs12473815 do gene FSHR e rs1942836 do gene PGR. ..... 87

Tabela 3 - Análise multivariada da ocorrência de prematuridade de acordo com a apresentação das variantes dos polimorfismos dos genes FSHR (rs12473815) e PGR (rs1942836). ..... 88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abep – Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa

AF-1 - Domínio de transativação 1 das isoformas A e B do receptor da progesterona

AF-2 - Domínio de transativação 2 das isoformas A e B do receptor da progesterona

AF-3 - Domínio de transativação 3 da isoforma B do receptor da progesterona

CCEB – Critério de Classificação Econômica Brasil

CDC – *Centers for Disease Control*

DATASUS - Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde

DBD – Domínio de ligação ao DNA; *DNA binding domain*

ddNTPs – *Dideoxynucleoside Triphosphate*/Dideoxinucleosídeo trifosfato

DEPC - Dietilpirocarbonato

DG – Diabetes Gestacional

DIM – Sequências importantes do receptor da progesterona para a dimerização do receptor

DM – *Diabetes mellitus*

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTPs – *Deoxynucleoside Triphosphate*/Deoxinuclesídeos trifosfatados

EUA – Estados Unidos da América

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

FSHR – Receptor do Hormônio Folículo Estimulante

IC – Intervalo de confiança

ID – Domínio inibitório; *Inhibitory domain*

IL-1β – Interleucina 1 *beta*

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IMC – Índice de massa corporal

KCNN3 - Canal de potássio ativado pelo cálcio da subfamília N, membro 3

LBD – Domínio de ligação ao ligante; *Ligand binding domain*

MDV – Maternidade Darcy Vargas

MMP-8 – Metaloproteinase-8

MP – Metaloproteinases

mRNA – RNA mensageiro

NIH – Instituto Nacional de Saúde; *National Institutes of Health*

OMS – Organização Mundial de Saúde

OR – *Odds Ratio*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase; *Polymerase Chain Reaction*

PG - Progesterona

PGR – Receptor da progesterona

PR-A – isoforma A do receptor da progesterona

PR-B – isoforma B do receptor da progesterona

qPCR – PCR em Tempo Real

RN – Recém-nascido

RPM – Ruptura prematura das membranas

SINASC - Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único; *Single-nucleotide Polymorphism*

SUS – Sistema Único de Saúde

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TIMP – Inibidores tissulares específicos

TIMP-2 – Inibidor tecidual da metaloproteinase de matriz 2

TLR4 - Receptores *Toll-like* da proteína D surfactante

TNFα – Fator de necrose tumoral *alfa*

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VDRL – *Veneral Disease Research Laboratory*

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO** ..... 289

**2 OBJETIVOS** ..... 33

2.1 OBJETIVO GERAL ..... 33

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 33

**3 REVISÃO DA LITERATURA** ..... 35

3.1 PREMATURIDADE - CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO ..... 35

3.2 POSSIBILIDADES CLÍNICAS DO PARTO PREMATURO ..... 35

3.2.1 Nascimento prematuro por indicação médica ..... 36

3.2.2 Nascimento prematuro pela Ruptura Prematura das Membranas ..... 36

3.2.3 Nascimento prematuro espontâneo ..... 37

3.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO PARTO PREMATURO ..... 38

3.4 FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À PREMATURIDADE ..... 42

3.4.1 Fatores comportamentais ..... 42

3.4.1.1 *Álcool* ..... 42

3.4.1.2 *Tabagismo* ..... 44

3.4.2 Fatores sociodemográficos ..... 46

3.4.2.1 *Idade materna* ..... 46

3.4.2.2 *Raça* ..... 48

3.4.2.3 *Condição socioeconômica* ..... 49

3.4.3 Condições médicas prévias e complicações da gravidez ..... 50

3.4.3.1. *Índice de Massa Corpórea pré-gestacional* ..... 50

3.4.3.2 *Infecções microbianas* ..... 51

3.4.3.3 *Diabetes mellitus* ..... 53

3.4.3.4 *Síndromes hipertensivas* ..... 55

3.4.4 Fatores genéticos ..... 56

3.4.4.1 *Receptores da progesterona e do hormônio folículo estimulante no trabalho de parto* ..... 60

**4. METODOLOGIA** ..... 63

4.1 TIPO DE ESTUDO ..... 63

4.2 LOCAL DO ESTUDO ..... 63

4.3 PERÍODO DE ESTUDO ..... 63

4.4 POPULAÇÃO ALVO E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO ..... 63

4.5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS ..... 64

4.5.1 Dados comportamentais, sociodemográficos, condições médicas prévias e complicações da gravidez ..... 65

4.5.2 Dados genéticos ..... 67

*4.5.2.1 Extração, purificação e quantificação do DNA* ..... 67

*4.5.2.2 Sequenciamento* ..... 68

*4.5.2.3 Genotipagem* ..... 71

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA ..... 74

4.7 ASPECTOS ÉTICOS ..... 75

**5. RESULTADOS E DISCUSSÃO** ..... 77

**6 CONCLUSÃO** ..... 94

**REFERÊNCIAS** ..... 99

**APÊNDICES** ..... 109

**ANEXOS** ..... 117

# 1 INTRODUÇÃO

O trabalho de parto constitui um processo natural do organismo feminino em que inúmeras modificações fisiológicas, finamente coordenadas, culminam no nascimento do bebê. São definidos cinco principais estágios relacionados a esse evento: a ruptura de membranas amnióticas, a dilatação cervical, a contração do miométrio, a separação placentária e, por fim, a involução uterina (OLSON et al., 1995). Sabe-se, no entanto, que esse equilíbrio pode ser alterado pela ação de diversos fatores de cunho físico, psicológico e socioeconômico, de modo a prolongar ou a antecipar o parto. Quando ocorre a antecipação desse processo, deparamo-nos com um problema de saúde pública: a prematuridade (CHALLIS et al., 2002).

O parto prematuro é motivo de grande preocupação atualmente, ensejando a realização de levantamentos e consultorias por diversas organizações nacionais e internacionais. A Organização Mundial da Saúde (OMS), em publicação de relatório em 2012, estima que aproximadamente 15 milhões de bebês prematuros nasçam todos os anos no mundo, determinando a proporção de um parto prematuro para cada dez nascimentos. Prevê-se, ainda, que desse montante, um milhão não sobreviva e que o restante possa desenvolver complicações neurológicas, auditivas, infecciosas e distúrbios respiratórios ocasionados pela sua imaturidade anátomo-fisiológica (OMS, 2012).

De modo agravante, em todos os países com dados confiáveis sobre a matéria, vem se percebendo um aumento nas taxas de ocorrência da prematuridade (OMS, 2012). Estudos nacionais e regionais, que envolviam inclusive o Estado de Santa Catarina, já corroboravam com essa tendência em publicações anteriores (CASCAES et al., 2008; SILVEIRA et al., 2008).

A fim de reverter essa perspectiva, diversas pesquisas voltaram-se à identificação das principais causas da prematuridade. Ainda que, até o momento, nem todos os resultados se mostrem absolutamente definitivos e esgotem o tema, já se apontam alguns fatores etiológicos do nascimento prematuro de grande interesse e relevância. De maneira geral, estes são agrupados em fatores comportamentais, sociodemográficos, condições médicas e biológicas e, por fim, em fatores genéticos (BEHRMAN; BUTLER, 2007).

O componente genético como causa da prematuridade é um dos objetos mais recentes de estudo (BEHRMAN; BUTLER, 2007). Os processos fisiológicos hormonais que levam ao trabalho de parto, as características de suscetibilidade a infecções e a pré-existência de condições médicas como a obesidade, diabetes e hipertensão sofrem grande influência por alterações genéticas. Sabe-se que a substituição de um único nucleotídeo de uma sequência de ácido nucleico (DNA) pode comprometer interações gene-gene e gene-ambiente. Por essa possibilidade, passaram a receber grande atenção os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) e as metodologias de estudo multidisciplinares capazes de identificar genes candidatos e a associação de seus SNPs com a prematuridade (GREEN et al., 2005; BEHRMAN; BUTLER, 2007).

Os SNPs mais estudados até o momento estão relacionados aos processos inflamatórios. Alterações na sequência genética de certas citocinas podem exacerbar ou suprimir suas atividades pró ou anti-inflamatórias, predispondo a gestante ao parto prematuro em situações de infecções agudas, um fator de risco clássico para a prematuridade (BEHRMAN; BUTLER, 2007).

No entanto, ao se considerar o aspecto genético, uma nova possibilidade se estabelece para a compreensão desse importante problema de saúde pública. Recentemente, aventou-se a possibilidade do nascimento prematuro constituir o resultado de um processo evolutivo (PLUNKETT et al., 2011).

Alterações aleatórias na constituição óssea e no desenvolvimento de certos órgãos provocaram modificações corporais significativas na linhagem humana ao longo do tempo. Durante esse processo, indivíduos com características que facilitavam sua reprodução e sobrevivência tornaram-se muito mais frequentes, através da seleção natural. Ressaltam-se, dentre tais atributos, o aumento do crânio, capaz de acomodar um cérebro maior e com maior número de circunvoluções, e o estreitamento da bacia pélvica e do canal cervical, adequado para suportar a tensão e o peso associados ao bipedalismo. Tais alterações, que inicialmente dificultariam o trabalho de parto, foram acompanhadas de outros processos adaptativos. Uma hipótese sugerida indica que a seleção natural favoreceu indivíduos que manifestavam antecipação do parto, uma alternativa capaz de permitir a transposição de um feto pelo canal cervical quando este ainda se encontrava em tamanho reduzido (PLUNKETT et al., 2011).

No entanto, para que isso fosse possível, alguns dos mecanismos deflagradores do parto deveriam ser ativados precocemente. Alterações na sequencia genética são a base para tornar esse fenômeno possível.

Em estudo publicado em 2011, investigaram-se mais de 8.400 SNPs contidos em 150 genes relacionados ao parto que mostraram uma rápida evolução na espécie humana. Dentre eles, após pesquisas adicionais, encontraram-se resultados promissores em certos polimorfismos dos genes *FSHR* (receptor do hormônio folículo estimulante) e *PGR* (receptor da progesterona) (PLUNKETT et al., 2011).

Fisiologicamente, em relação ao trabalho de parto, a ativação dos receptores do hormônio folículo estimulante (FSH) e da progesterona (PG) está envolvida com o relaxamento dos músculos uterinos. Verificou-se, entretanto, que a substituição de um único nucleotídeo em ambos os genes pode comprometer a sua função, levando a um aumento das contrações do miométrio. Estudos observacionais do tipo caso-controle mostraram que certas variáveis desses polimorfismos são encontradas mais frequentemente em gestantes que desenvolvem partos prematuros (DODD; CROWTHER, 2010; HASCALIK et al., 2010).

O polimorfismo do gene *FSHR* denominado rs12473815 apresenta alelo de risco representado pela substituição de uma citosina por uma timina. A sua relação com a prematuridade se mostrou positiva quando estudada em populações de diversas raças (PLUNKETT et al., 2011). No gene *PGR* destaca-se o polimorfismo rs1942836, cujo alelo de risco corresponde, inversamente ao caso anterior, à substituição de uma timina por uma citosina. Esta variável se destaca pela sua relação com a prematuridade mesmo em casos considerados limítrofes, não demandando necessariamente a ocorrência de casos de prematuridade moderada ou extrema para averiguação de seu efeito (EHN et al., 2007; MANN et al., 2013).

Considerando a importância desse tópico no planejamento e na gestão da assistência à saúde integral das gestantes, desenvolveu-se um estudo para apuração da associação dos fatores de risco comportamentais, sociodemográficos, biológicos, médicos e genéticos com a prematuridade em gestantes atendidas na Maternidade Darcy Vargas (MDV) em Joinville/SC.

# 2 OBJETIVOS

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a associação entre fatores de risco genéticos, sociodemográficos, comportamentais, biológicos e médicos e a ocorrência da prematuridade.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a possível associação entre os polimorfismos rs12473815 do gene *FSHR* e rs1942836 do gene *PGR* e a ocorrência de prematuridade em gestantes atendidas na Maternidade Darcy Vargas (MDV) em Joinville/SC;
- Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos estudados;
- Avaliar a associação dos fatores sociodemográficos (*escolaridade* e *condição socioeconômica*), comportamentais (*uso de tabaco e álcool durante a gestação*), biológicos e médicos (IMC - Índice de Massa Corporal *pré-gestação, diabetes gestacional* (DG) *e infecções microbianas agudas*) relacionados à prematuridade.
- Estratificar a possível associação dos fatores de risco estudados com o parto prematuro considerando bebês prematuros limítrofes (nascidos entre a 35ª e a 37ª semanas), moderados (entre a 32ª a 34ª semanas), muito prematuros (28ª a 31ª semanas) e extremos (anteriores à 28ª semana).

# 3 REVISÃO DA LITERATURA

## 3.1 PREMATURIDADE - CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define como prematuro todo recém-nascido (RN) vivo oriundo de gestação inferior a 37 semanas (ou 259 dias), contadas a partir do primeiro dia do último ciclo menstrual regular (BECK et al., 2010).

De acordo com a semana gestacional em que ocorre o nascimento, os casos de prematuridade podem ser classificados em: limítrofes, quando o nascimento ocorre entre a 35ª e a 37ª semana; moderados, quando ocorre entre a 32ª e a 34ª semana; muito prematuro, quando ocorre entre a 28ª e a 31ª semana e extremo, quando ocorre em período inferior a 28ª semana. De maneira geral, em cada categoria o RN tende a apresentar diferenças no seu comportamento biológico, com repercussões distintas sobre seu estado de saúde e necessidade de cuidados médicos específicos (BLENCOWE et al., 2012).

Os prematuros limítrofes correspondem a, aproximadamente, 65% de todos os pré-termos nascidos vivos. A sua imaturidade funcional é manifestada por meio de sintomas mais brandos e passíveis de serem controlados com maior facilidade. Destacam-se debilidade de sucção, instabilidade térmica, insuficiência respiratória e icterícia intensa. A prematuridade moderada, em centros médicos com capacidade instalada operacional satisfatória, tende a apresentar baixa taxa de mortalidade. Sua principal complicação reside na Síndrome da Angústia Respiratória, uma insuficiência na produção de surfactante por imaturidade do sistema respiratório do RN. Por sua vez, as complicações observadas nos muito prematuros e nos prematuros extremos são muito semelhantes as já descritas acima. No entanto, as condições fisiológicas bastante deficientes em que os bebês se encontram ao nascer tornam tais eventos mais regulares e graves. Nessa categoria, lesões neurológicas são muito mais frequentes (CASTRO, 2005).

## 3.2 POSSIBILIDADES CLÍNICAS DO PARTO PREMATURO

O nascimento prematuro, de maneira geral, pode ser resultado de três possibilidades clínicas: *a)* indicação médica; *b)* ruptura prematura de membranas

(RPM) e *c)* causas idiopáticas (MOUTQUIN, 2003). Aproximadamente, 45-50% dos casos de prematuridade correspondem às causas idiopáticas, 30% estão relacionados à RPM e o restante (15 a 20%) é atribuído aos partos realizados por indicação médica (BECK et al., 2010).

### 3.2.1 Nascimento prematuro por indicação médica

Os casos de nascimento prematuro por indicação médica ocorrem, principalmente, quando a manutenção da gravidez proporciona maior risco ao feto e/ou à gestante do que a sua interrupção (MOUTQUIN, 2003).

Dentre as condições capazes de oferecer risco à gestante destacam-se as desordens hipertensivas, tais como a hipertensão gestacional e a pré-eclâmpsia, que acometem de 6 a 10% de todas as gestações. Existem, também, outras circunstâncias médicas pré-existentes passíveis de serem agravadas com a gravidez. Nessa categoria podem ser citadas doenças cardíacas (cardiomiopatias, arritmias, doença arterial coronariana), renais, pulmonares e neoplasias malignas (WONG; GROBMAN, 2011).

Há, entretanto, condições médicas e situações que comprometem em maior grau a saúde do feto. Os casos de anemia fetal induzida por aloimunização, pela infecção materna por parvovírus B19 e por hemorragia feto-materna; o crescimento intrauterino restrito; e as gestações múltiplas provocam situações inadequadas a seu crescimento e manutenção, ensejando, também, a indicação médica de parto prematuro (WONG; GROBMAN, 2011).

### 3.2.2 Nascimento prematuro pela Ruptura Prematura das Membranas

A RPM ou amniorrexe prematura é definida como a ruptura espontânea das membranas ovulares após a 20ª semana e antes do início do trabalho de parto. Em cerca de 10% de todas as gestações ocorre esse rompimento. Em 20 a 25% destas, a rotura ocorre antes da 37ª semana, estabelecendo-se a caracterização de um parto prematuro (BRASIL, 2010).

Tais membranas ovulares são compostas por uma diversidade de células permeadas por uma matriz de colágeno. Duas classes de enzimas, as metaloproteinases (MP) e os inibidores tissulares específicos (TIMP), são

responsáveis pela sua integridade. As MP, cuja atividade é regulada pelos TIMP, constituem um complexo de enzimas capazes de degradar outras moléculas, como o colágeno e elastina, prejudicando a unidade da membrana (GOLINO et al., 2006).

Análises, por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), da expressão de MP e de TIMP em gestantes com parto prematuro espontâneo e de gestantes com parto a termo (vaginal ou por cesárea eletiva) indicam que o primeiro grupo apresenta um desequilíbrio entre ambas as proteínas. As MP são expressas em maior quantidade do que seus inibidores, os TIMP, aumentando a degradação da matriz de colágeno e predispondo à RPM e ao parto prematuro (WANG; ZHOU; ZHANG, 2005).

São diversas as condições capazes de alterar tal equilíbrio de enzimas, permitindo a alteração morfológica da membrana ovular. Dentre elas, destacam-se a ocorrência de corioamnionite, distensões excessivas da parede uterina, anomalias cervicais, gestações múltiplas e tabagismo (MOUTQUIN, 2003).

### 3.2.3 Nascimento prematuro espontâneo

Verificam-se, também, partos prematuros em decorrência de causas idiopáticas, considerados espontâneos. O diagnóstico clínico do parto prematuro, nesse caso, se dá pela observação de contrações dolorosas e palpáveis com duração mínima de trinta segundos e intervalos inferiores a cinco minutos, juntamente com evidências na mudança de posição, consistência, comprimento e/ou dilatação do canal cervical, antes da 37ª semana de gestação. Diversos estudos tentam estabelecer diretrizes para o melhor uso de agentes tocolíticos, capazes de suprimir as contrações uterinas. A compreensão dos fatores etiológicos pode colaborar para a prevenção dessa condição (RENZO et al., 2006).

Alguns dos fatores de risco ao parto prematuro espontâneo estão incluídos em categorias distintas. Certos fatores sociodemográficos, como idade materna, escolaridade e condições socioeconômicas; características biológicas, como baixos IMC pré-gestacional e ganho de peso durante a gestação; e aspectos comportamentais, como o tabagismo e o etilismo, já são indicados como elementos capazes de predispor a esse desfecho (BEHRMAN; BUTLER, 2007).

## 3.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO PARTO PREMATURO

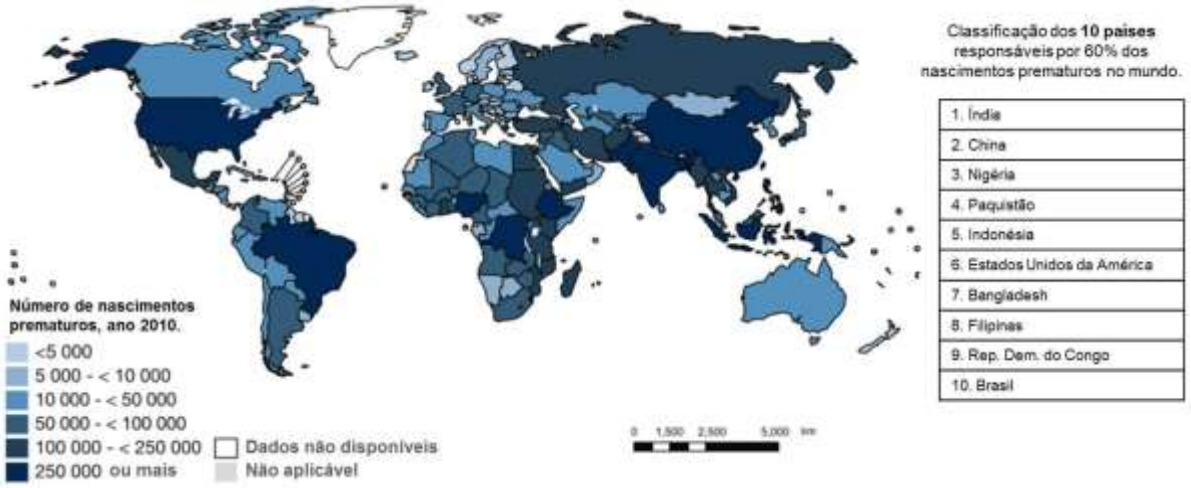
A prematuridade, além de constituir um fator determinante para a morbimortalidade neonatal, também é responsável pelo comprometimento em longo prazo do estado geral de saúde do RN e de parte dos orçamentos públicos destinados ao setor da saúde. Estimativas do *Committee on Understanding Premature Birth and Assuring Healthy Outcomes* indicam que o custo anual com a prematuridade nos Estados Unidos da América (EUA) alcança cerca de 26 bilhões de dólares, o equivalente a US$51.600 por prematuro e à metade de todo o orçamento destinado às hospitalizações infantis nesse país (BEHRMAN; BUTLER, 2007; GREEN et al., 2005). Estudos de impacto econômico relativos à prematuridade no Brasil são escassos (MENDES et al., 2006). No entanto, os elevados custos operacionais e assistenciais associados ao cuidado neonatal são motivos de preocupação, exigindo a constante execução de avaliações das práticas clínicas (MENDES et al., 2006).

Estudo publicado em 2010, após realização de revisão sistemática sobre morbimortalidade materna, estimou que os nascimentos prematuros no mundo, em 2005, correspondiam a 9,6% de todos os nascimentos, totalizando 12,9 milhões de casos. Previu-se, ainda, que as maiores taxas de prematuridade se encontravam na África e na América do Norte, com 11,9% e 10,6%, respectivamente, seguidos pela Ásia (9,1%), América Latina (8,1%), Oceania (6,4%) e Europa (6,2%) (BECK et al., 2010).

Dados reunidos de diversos países em uma estimativa da OMS, em 2012, indicaram resultados semelhantes ao do estudo mencionado acima. Foi possível observar, entretanto, um ligeiro aumento na ocorrência de casos prematuros. Percebeu-se que, dos 135 milhões de nascidos vivos em 2010, 15 milhões eram prematuros, determinando uma taxa de prematuridade mundial de 11,1%. Na África subsaariana e no sul da Ásia encontrou-se a maior parte dos países com taxas de prematuridade superiores a 15%. São eles, em ordem decrescente: Malaui, Congo, Comores, Zimbábue, Guiné Equatorial, Moçambique, Gabão, Paquistão, Indonésia, Mauritânia e Botsuana. No entanto, outros dez países são responsáveis por aproximadamente 60% de todos os nascimentos prematuros (Figura 1). A grande extensão territorial, o elevado número de habitantes, o maior número de cesárias eletivas e a redução do número de mortalidade dos nascidos prematuros podem

contribuir para o maior índice em tais locais. Nesse grupo, o Brasil ocupa a 10ª posição (BLENCOWE et al., 2012; OMS, 2012).

Figura 1 - Número estimado de nascimentos prematuros em 2010 e ranking dos dez países responsáveis por 60% de todos os casos de prematuridade.




Fonte: OMS, 2012, p.26.

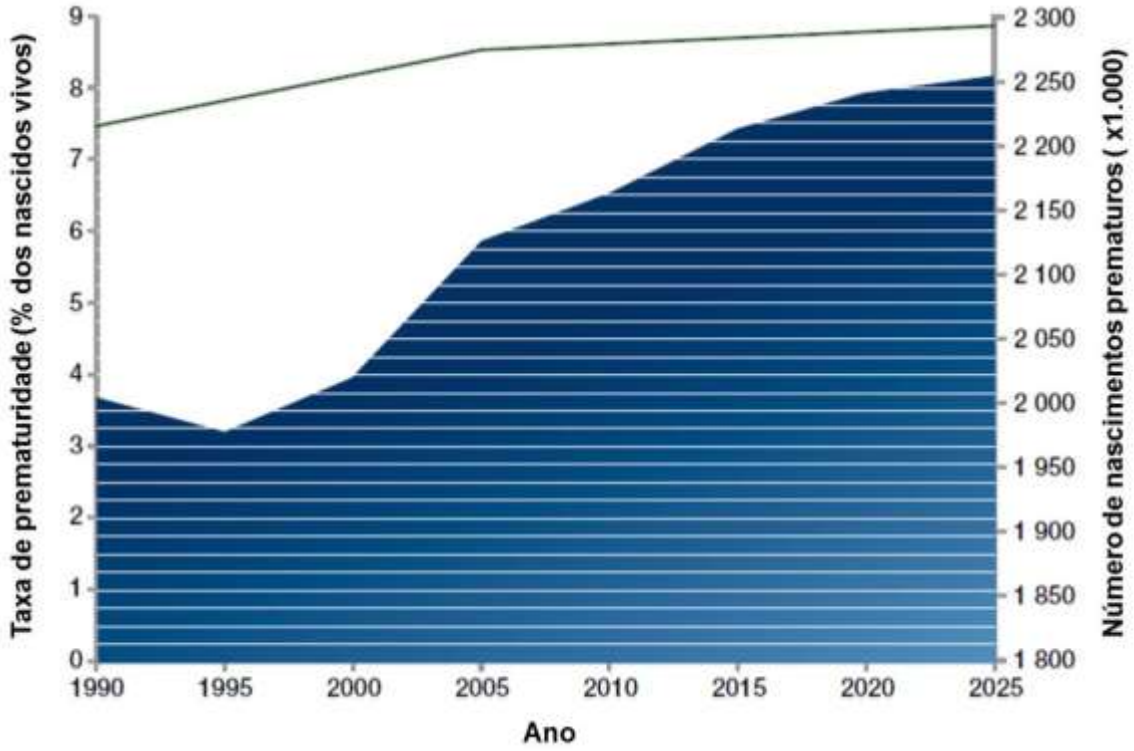
A mesma tendência de crescimento na ocorrência da prematuridade pode ser observada quando analisadas, isoladamente, séries de dados históricos de alguns países. Informes do CDC (*Centers for Disease Control*) mostram que, em 2003, as taxas de prematuridade nos EUA correspondiam a 12,3%. Traçando uma regressão histórica, percebeu-se que essa taxa havia aumentado 16% desde 1990 e 30% se considerada desde 1981 (MARTIN et al., 2005). Estudo envolvendo informações de 65 países mostrou que 48 deles apresentaram crescimento expressivo nos números absolutos e nas taxas de prematuridade no período compreendido entre 1990 e 2010. A figura 2 mostra a tendência de nascimentos prematuros em países desenvolvidos e da América Latina, considerando dados desde 1990 e incluindo sua projeção até 2025 (OMS, 2012).

Revisões realizadas no Brasil mostram perfis de crescimento muito semelhantes. Em uma delas, considerando dados do *Medline* e *Lilacs*, verificou-se em Ribeirão Preto (SP) taxas de prematuridade de 6% em 1978-79 e de 13,3% em 1994. Em Pelotas, encontrou-se prevalência de 6% em 1982, 7,5% em 1993 e 15% em 2004. (SILVEIRA et al., 2008).

Contrariamente ao que evidenciam os estudos populacionais, uma análise da base de dados do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (SINASC) no

Estado de Santa Catarina, referente a 2005, mostra uma taxa de prematuridade de apenas 6,1% (CASCAES et al., 2008).

Figura 2 - Tendência nas taxas e nos números de nascimento prematuro em países desenvolvidos e da América Latina e Caribe, incluindo projeção até 2025.




Fonte: OMS, 2012, p.26.

A grande discrepância nas taxas de prematuridade se deve, muitas vezes, à base de dados utilizada como referência. O Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) desenvolveu o SINASC e o implantou a partir de 1990 com o objetivo de reunir dados epidemiológicos referentes aos nascimentos informados no território nacional. É consenso, no entanto, que subnotificações e subregistros conferem baixa confiabilidade às informações referentes à prematuridade. Nesse sentido, os estudos populacionais são considerados os mais indicados para avaliar sua prevalência e evolução temporal (SILVEIRA et al., 2008; BETTIOL; BARBIERI; SILVA, 2010).

Artigo publicado em 2001 corrobora com tal entendimento. O estudo realizado com 2.831 partos hospitalares ocorridos em São Luís (MA) comparou informações do SINASC com dados do inquérito perinatal. Concluiu-se que sexo, hospital de nascimento, idade materna, tipo de parto e peso ao nascer são campos do SINASC

com boa confiabilidade. Já a ocorrência de prematuridade se mostrou mais elevada no inquérito perinatal do que no SINASC, indicando o conhecido problema de variáveis incompletas e de subregistros (SILVA et al. 2001). Aventa-se, ainda, que o método utilizado para estimar a idade gestacional pode alterar a prevalência da prematuridade. Além da ultrassonografia, em alguns serviços de saúde a idade gestacional é avaliada pelo método Capurro, baseado em critérios físicos e neurológicos do recém-nascido (CASCAES et al., 2008). Estudo realizado para avaliar a acurácia de ambos os métodos concluiu que o Capurro tende a superestimar a idade gestacional em RN menores de 39 semanas, justamente a faixa capaz de identificar os nascimentos prematuros (NUNES et al., 2011).

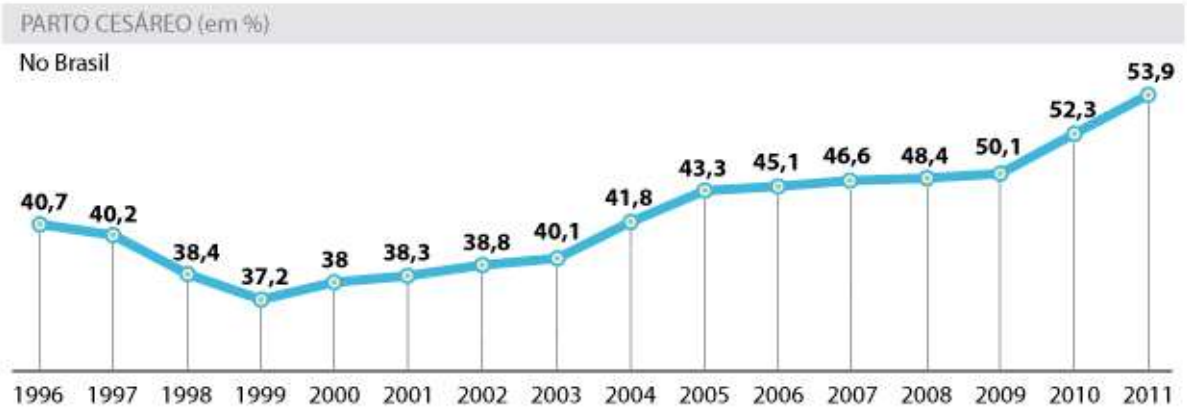
Considerando tal situação, um grupo de pesquisadores utilizou a distribuição do peso ao nascer informada pelo SINASC e a aplicou nas prevalências de prematuridade obtidas em estudos populacionais primários, a fim de se construir curvas de correção. Dessa forma, os dados oficiais do SINASC, que mostravam uma prevalência de nascimentos pré-termos de 6 a 7% no período entre 2000 a 2010, mostraram valores corrigidos entre 11 a 12%, estimativas muito mais próximas dos dados primários brasileiros e internacionais (MATIJASEVICH et al., 2013).

Além dos fatores de risco individuais e ambientais, deve-se perceber que o aumento dos casos de prematuridade também se deve a alguns aspectos adicionais. A especialização e o desenvolvimento da neonatologia e das técnicas de cuidado ao RN, nas últimas décadas, permitem a sobrevivência de bebês que possivelmente alimentariam dados acerca da mortalidade até alguns anos atrás. Adicionalmente, o aprimoramento e padronização de métodos e tecnologias para avaliação da idade gestacional permitem uma análise mais precisa e, portanto, possibilitam a identificação de casos limítrofes com maior facilidade (OMS, 2012).

Por fim, percebem-se também mudanças na maneira como o trabalho de parto é conduzido nos últimos anos e na popularização de cesáreas eletivas. No Brasil, a elevada porcentagem de partos cesáreos representa um grande desafio para a política de saúde e um fator responsável pelo aumento dos casos de prematuridade limítrofe. Enquanto a OMS recomenda uma taxa de cesáreas de até 15%, o 5º Relatório Nacional de Acompanhamento das Metas dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio elaborado pelo governo federal mostra que o índice nacional está em aproximadamente 54% (figura 3) (IPEA, 2014). Considerando

apenas os planos de saúde privados, constata-se que as taxas de partos por cesárea chegam a 88% do total (LEAL; GAMA, 2014).

Figura 3 – Porcentagem de partos cesáreos realizados no Brasil no período de 1996 a 2011.




Fonte: IPEA, 2014, p.81.

## 3.4 FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À PREMATURIDADE

Diversos estudos têm identificado inúmeras causas e fatores de risco para o nascimento prematuro. Embora muitas vezes estejam intrinsecamente relacionados entre si, tais fatores podem ser didaticamente classificados em fatores comportamentais, fatores sociodemográficos, condições médicas prévias ou complicações da gravidez e fatores genéticos (BEHRMAN; BUTLER, 2007).

### 3.4.1 Fatores comportamentais

Dentre os fatores comportamentais, enfatizam-se aspectos como o tabagismo e a ingestão de álcool. Ainda que tais informações estejam associadas a viés de informação devido ao autorrelato e que o estabelecimento de relação causa-efeito seja difícil, fatores comportamentais são estudados extensivamente por serem passíveis de modificação (BEHRMAN; BUTLER, 2007).

#### 3.4.1.1 *Álcool*

A ingestão de álcool durante a gestação e seu efeito sobre a prematuridade têm demonstrado dados inconsistentes. Diversos estudos, até o momento, evidenciam que a ingestão baixa e moderada de álcool durante a gestação possui

pouco impacto sobre esse desfecho. Revisão sistemática com metanálise realizada em 2011, envolvendo 36 estudos, não identificou a influência da ingestão de até 1,5 doses de álcool (18g) por dia sobre a ocorrência de prematuridade. No entanto, o consumo a partir de três doses diárias (ou 36g/dia) aumentou em 23% a chance de se desenvolver parto prematuro quando tais gestantes foram comparadas com abstêmias (OR 1,23 [IC 95%: 1,05-1,44]) (PATRA et al., 2011).

Em outro estudo, a análise de dados de mais de 1,2 milhões de gestantes norte-americanas, no entanto, mostrou associação entre ingestão alcoólica e a ocorrência de parto prematuro espontâneo em todos os níveis de consumo. As gestantes denominadas classe 1 (consumo de 1-2 doses/semana), classe 2 (3-4 doses/semana) e classe 3 (>5 doses/semana) apresentaram OR crescentes de 1,16 (IC 95%: 1,10-1,23), 1,97 (IC 95: 1,73-2,24) e 2,10 (IC 95%: 1,84-2,39), respectivamente. Quando considerados os casos de muito prematuros (<33 semanas), o consumo de álcool se mostrou ainda mais influente nas classes 1 (OR 1,36 [IC 95%: 1,21-1,53]), 2 (OR 2,52 [IC 95%: 2,01-3,15]) e 3 (OR 3,12 [IC 95%: 2,54 – 3,83]) (ALIYU et al., 2010).

Estudo inglês, analisando o consumo de mais de quatro doses de álcool em uma única ocasião (*binge drinking*), verificou que o perfil de gestantes com tal comportamento tende a diminuir durante a progressão da gestação. Antes da gravidez, consumidoras dessa quantidade de álcool compreendiam 24,5% das mulheres. Durante o primeiro trimestre, caíam para 9% e, em seguida para 3,1% no segundo trimestre. No entanto, a pesquisa não conseguiu mostrar nenhuma associação entre esse perfil etilista com o aumento do risco de nascimento prematuro (COOPER; PETHERICK; WRIGHT, 2013). Em estudo de coorte do Reino Unido, que considerava o *binge drinking* na fase inicial da gestação (até a 15ª semana), também não se encontraram mudanças nas chances de ocorrência de parto prematuro (McCARTHY et al., 2013).

De maneira controversa, observou-se um efeito protetor do álcool em relação à prematuridade num estudo que combinava pacientes de pesquisas holandesa (OR 0,31 [IC 95%: 0,13-0,77) e alemã (OR 0,75 [IC 95%: 0,57-0,99). O risco de nascimento prematuro se mostrou menor entre mães com ingestão leve a moderada de bebida alcoólica comparadas com gestantes não usuárias de álcool (PFINDER et al., 2013). Em um segundo estudo, identificou-se também redução no risco de parto

prematuro quando considerada a ingestão alcoólica no terceiro trimestre gestacional (OR 0,60 [IC 95%: 0,42-0,87) (LUNDSBERG et al., 2015).

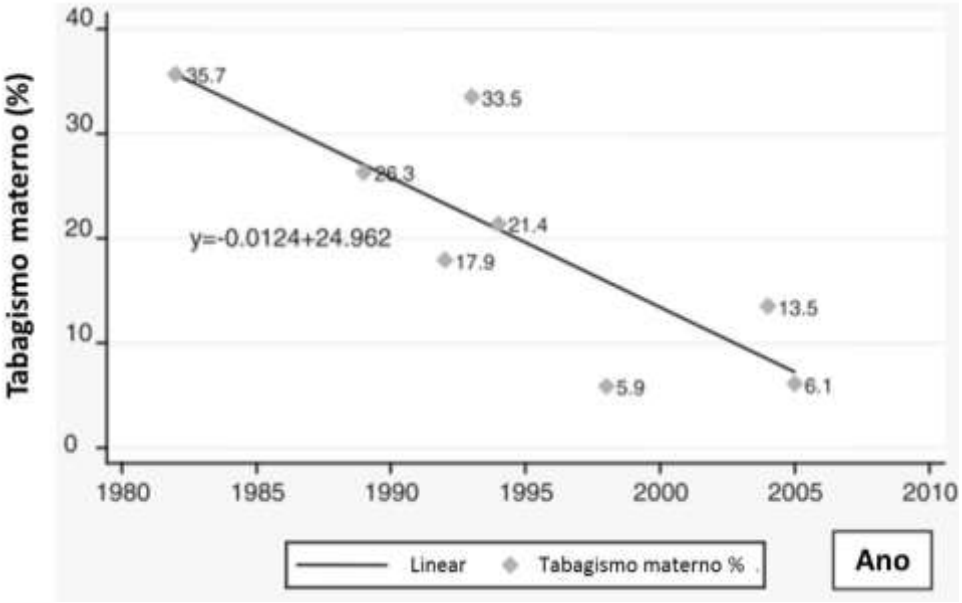
3.4.1.2 *Tabagismo*

Assim como o álcool, o tabagismo também consiste em outro fator de risco comportamental de grande importância para o estudo da prematuridade. Análises econômicas afirmam que o fumo durante a gestação eleva em 20% as chances de se utilizar assistência em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) neonatal, serviço de saúde de maior custo e complexidade (ADAMS et al., 2002).

Em alguns países, as grandes campanhas de conscientização e as instruções fornecidas durante as consultas médicas já demonstram uma redução na prática do tabagismo pelas gestantes. Informe publicado pelo CDC afirma que, nos EUA, o fumo durante a gestação reduziu de 18,1% em 1991 para 11,4% em 2002 (CDC, 2004). É possível perceber, consequentemente, as repercussões sobre os desfechos perinatais. Uma revisão sistemática com metanálise, considerando publicações de diversos países, concluiu que nos locais em que se instituíram legislações antifumo houve uma redução da prematuridade em 10,4% (IC 95%: 2,0-18,8) (BEEN et al., 2014).

No Brasil, em 2008, a prevalência de gestantes fumantes correspondia a 7,7% das mulheres entre 15 a 49 anos. Quando divididas por idade, obteve-se uma prevalência de 7,2% entre mulheres de 15 a 19 anos, 7,5%, entre mulheres de 20 a 29 anos, 5,2% entre mulheres de 30 a 39 anos e de 5,2% entre mulheres de 40-49 anos. Considerando dados de diversos estudos populacionais desde a década de 1980, pode-se observar uma queda pronunciada na prevalência do tabagismo entre gestantes, indicando uma tendência semelhante à observada na população feminina em geral, gestante ou não (Figura 4). Em 1989, por exemplo, estimava-se que 6,9% dos nascimentos prematuros eram atribuídos ao tabagismo. Em 2008, calculou-se uma taxa de apenas 3,4% (LEVY et al., 2013).

Figura 4 - Prevalência do tabagismo entre gestantes no Brasil, considerando estimativas de estudos populacionais.




Fonte: LEVY et al., 2013, p.1799.

Entretanto, mesmo com todos os esforços, o tabagismo permanece como uma das causas preveníveis mais prevalentes em relação à prematuridade (DIETZ et al., 2010).

Em estudo realizado no Estado do Novo México (EUA), com o intuito de identificar diversas causas predisponentes ao nascimento prematuro, concluiu-se que o uso do tabaco durante a gestação aumentou em 37% as chances de ocorrência desse desfecho (OR 1,37 [IC 95%: 1.32-1.42]) (GWIN et al.,2012).

Em uma coorte de população tailandesa percebeu-se que a incidência de partos prematuros aumentou proporcionalmente ao número de cigarros consumidos pela mãe. A correlação é ainda mais intensa quando a quantidade utilizada foi superior a vinte cigarros diários. Nessa categoria de consumo, uma maior incidência de prematuridade foi encontrada mesmo se a prática do tabagismo tenha se dado em diferentes momentos da gestação. Assim, nessa coorte, quando a prática do tabagismo ocorreu em período anterior à gestação, no primeiro trimestre ou nos segundo e terceiro semestres conjuntamente, verificaram-se taxas de prematuridade de 19,2%, 21,4% e 27,3%, respectivamente (KO et al., 2014).

No Brasil, uma pesquisa realizada em Londrina (PR), com 328 casos de nascimento prematuro, analisou a sua relação com o tabagismo, dentre outros

fatores de risco. Inicialmente, obtiveram um OR bruto de 1,61 (IC 95%: 1,08-2,40), indicando associação positiva entre os dois parâmetros. Entretanto, após ajuste, percebeu-se ausência de significância entre o tabagismo materno e a prematuridade (SILVA et al., 2009).

Um estudo chinês alerta sobre uma nova questão, cujos dados são bastante inconsistentes até o momento: o tabagismo passivo. Em uma coorte com 10.095 gestantes não fumantes, percebeu-se uma associação positiva entre a inalação do fumo e a prematuridade, principalmente ao considerar os partos ocorridos com idade gestacional inferior a 32 semanas (OR 1,98 [IC 95%: 1,41-2,76]). Observou-se que o local de maior exposição corresponde à própria residência da gestante e que tempos maiores de exposição aumentam diretamente o risco de parto prematuro. Tais constatações mantêm padrões similares independentemente do trimestre em que ocorreu a exposição (QIU et al., 2014).

### 3.4.2 Fatores sociodemográficos

Os fatores sociodemográficos destacáveis incluem idade materna, raça e condições socioeconômicas.

#### 3.4.2.1 *Idade materna*

A idade materna possui grande relevância, principalmente quando são considerados os extremos da vida reprodutiva, envolvendo os períodos inferiores a 19 anos e superiores a 35 anos. Gestantes adolescentes recebem grande atenção pelos elevados riscos de morbidade e mortalidade perinatais. De maneira geral, tal grupo apresenta certa imaturidade fisiológica, tornando-o incapaz de suportar adequadamente o estresse característico da gestação (COHEN, 2014). Ainda, por se encontrarem em fase de crescimento, tais gestantes com progressivas necessidades nutricionais apresentam dificuldade em mobilizar parte de suas reservas ao feto, proporcionando restrições ao crescimento deste. No entanto, na maioria das vezes, a gravidez em mulheres com idade inferior a 19 anos está acompanhada de outros fatores de risco para a prematuridade. Fatores sociais, comportamentais e psicológicos, como o tabagismo, baixa escolaridade e

instabilidade emocional, contribuem para ocorrência desse desfecho (BARROS, 2002).

A gestação em idade avançada (>35 anos) tem atraído atenção especial, ultimamente. Isso se deve a uma grande mudança nos padrões sociais e de estruturação familiar encontrada, principalmente, em países desenvolvidos. Casamentos mais tardios, a busca por alto nível de aprimoramento profissional e a possibilidade de técnicas de reprodução assistida cada vez mais acessíveis têm facilitado a ocorrência de tais gestações (GIRI et al., 2012).

Atualmente, em diversos locais, as gestantes com idade superior a 35 anos já representam uma parcela significativa dentre todas as gestações. Estudo de coorte na Noruega entre 2004 e 2007 encontrou uma proporção de 33,4% (WANG et al., 2011). Em Taiwan, essa parcela de gestantes já apresentou um aumento de 11,4% para 19,1% de 1990 até 2003 (HSIEH et al., 2010). Levantamento realizado pela OMS em diversos países mostrou uma grande variação na prevalência de gestações em idades avançadas, compreendendo prevalência de 2,8% no Nepal até 31,1% no Japão. No Brasil, percebeu-se uma prevalência de aproximadamente 12% (LAOPAIBOON et al., 2014).

Diversas pesquisas buscam identificar se tais extremos da vida reprodutiva são, realmente, fatores preditivos do nascimento prematuro. Em estudo realizado no Nepal, as gestações em idade avançada analisadas não mostraram associação positiva com o nascimento prematuro, quando comparadas às gestantes com menos de 35 anos (GIRI et al., 2012).

Em uma coorte retrospectiva organizada na China, ambos extremos de idade reprodutiva apresentaram maior chance de desenvolverem parto prematuro. Entre as adolescentes (15-19 anos) verificou-se um OR 2,1 (IC 95%: 1,7-2,4) quando comparadas com grupo de 25 a 29 anos. Quando analisadas as gestantes com 35-39 anos e com mais de 40 anos, os OR foram de 1,8 (IC 95%: 1,7-1,9) e 2,4 (IC 95%: 2,1-2,8) respectivamente (XIAOLI; WEIYUAN, 2014).

Estudo de caso-controle realizado na Espanha mostra dados semelhantes. Gestantes com idades inferiores a 19 anos ou superiores a 35 anos possuem maior chance de parto prematuro se comparadas com grupo de 20 a 24 anos. No primeiro extremo da vida reprodutiva, encontraram-se OR de 2,41 (IC 95%: 1,51-3,84) nos casos de prematuridade anterior à 32ª semana e de 1,71 (IC 95%: 1,33-2,19) nos

casos moderados a limítrofes (entre 32 e 37 semanas). Considerando idade materna superior a 35 anos e os mesmos subgrupos de prematuridade, os OR verificados foram de 1,86 (IC 95%: 1,39-2,48) e 1,66 (IC 95%: 1,44-1,91) (CASTELL et al., 2013).

3.4.2.2 *Raça*

Quanto à raça, nas diversas pesquisas desenvolvidas, é bastante evidente a presença de disparidades em relação à prematuridade e a outros desfechos neonatais. Um centro de pesquisas médicas estadunidense, o *National Institutes of Health* (NIH), define como disparidade a diferença na incidência, prevalência, mortalidade e carga de doença que existe em subgrupos específicos da população (CARTER-POKRAS; BAQUET, 2002).

Dados do CDC mostram elevada disparidade quando consideradas, principalmente, as raças branca e negra. Em informe publicado em 2013, percebeu-se que, mesmo com a redução das taxas de prematuridade nos EUA, o nascimento prematuro entre negros foi 60% maior em relação aos brancos, correspondendo a taxas de 17,1% e 10,8%, respectivamente. Quando analisados os nascimentos prematuros anteriores à 34ª semana de gestação, os dados se tornam ainda mais preocupantes. A taxa desse desfecho em negros (6,1%) equivaleu ao dobro da encontrada em brancos (2,9%). Destaca-se, enfim, que os principais fatores capazes de predispor a esse quadro devem também envolver diferenças socioeconômicas, a extensão do cuidado pré-natal, fatores comportamentais e nutricionais maternos, a ocorrência de infecções durante a gestação, a presença de situações de estresse e ansiedade anterior ao parto e de possíveis determinantes genéticos (CDC, 2013).

De maneira consonante, determinaram-se dados em estudo de coorte realizado na Holanda com 969.491 gestantes. As maiores taxas de prematuridade foram encontradas em mulheres africanas (7,5%) e do sul asiático (8,5%). Ao se analisar apenas os partos prematuros espontâneos anteriores à 32ª semana, a população de origem africana apresentou prevalência duas vezes maior do que a de mulheres brancas europeias (1,5% e 0,6%, respectivamente) e OR de 1,92 (IC 95%: 1,69-2,17) (SCHAAF; MOL; ABU-HANNA, 2012).

No Brasil, percebe-se uma maior dificuldade em identificar a repercussão da raça sobre desfechos perinatais pela elevada miscigenação da população. No

entanto, estudo realizado no país considerando grupos de ascendência africana isolada e mista permitiram, nos dois casos, apontar maiores taxas de prematuridade quando comparadas com gestantes de ascendência europeia. Partos prematuros de gestantes com ascendência africana isolada apresentaram OR de 1,30 (IC 95%: 1,05-1,61), enquanto sob ascendência mista o OR foi de 1,39 (IC 95%: 1,16-1,65). Dentre as diversas variáveis analisadas passíveis de explicar esse cenário, as de maior efeito consistem no menor número de consultas pré-natais realizadas dentre as pacientes de ascendência africana e na sua localização geográfica. Nesse último caso, o efeito geográfico pode se dar através da disponibilidade e da qualidade dos serviços de atenção à saúde, de seu crescimento econômico e da infraestrutura social (NYARKO et al., 2014).

Em uma revisão sistemática com metanálise sobre as disparidades raciais relacionadas ao risco de parto prematuro, dos 45 estudos inclusos, 41 identificaram associação positiva entre um maior risco de prematuridade em gestantes negras ao se comparar às de raça branca (OR 2,0 [IC 95%: 1,8-2,2]) (SCHAAF et al., 2013).

#### 3.4.2.3 *Condição socioeconômica*

Por fim, tem-se a condição socioeconômica materna como outro fator de risco sociodemográfico para o parto prematuro. Diversas são as abordagens empregadas para a identificação e mensuração desse aspecto. A mais aceita envolve medidas de prestígio e de diferenciação positivas baseadas em capital social e no acesso a bens e serviços (ANTUNES, 2008). No entanto, de maneira contrária aos demais, sua identificação e mensuração é reconhecidamente mais difícil. A condição socioeconômica da gestante é influenciada por diversos fatores individuais e ambientais, tornando extremamente árduo o estabelecimento de sua associação com a prematuridade (NIEDHAMMER et al., 2011).

Em uma revisão baseada em fatores psicossociais que predispõem ao parto prematuro no Irã, constatou-se que a combinação da escolaridade, ocupação e renda maternas resulta em um determinante estrutural para o parto prematuro. Ou seja, a partir de um determinante estrutural (condição socioeconômica) emanam determinantes denominados intermediários, capazes de aumentar as chances, efetivamente, de um nascimento prematuro. Dessa forma, observa-se que gestantes com baixas condições socioeconômicas geralmente apresentam maior tendência a

hábitos tabagistas e etilistas e estão mais expostas às situações de estresse e ansiedade, fatores que diretamente são capazes de induzir ao parto prematuro (DOLATIAN et al., 2013).

Em uma coorte prospectiva realizada nesse mesmo país, identificou-se condição semelhante. Baixas condições socioeconômicas normalmente estão relacionadas ao menor apoio social (emocional e material) e, consequentemente, a gestante estará mais predisposta a exibir quadros de depressão e ansiedade. A exposição a fatores psicológicos estressores é reconhecidamente um fator responsável pela diminuição do tempo de gestação (MIRABZADEH et al., 2013).

Numa população irlandesa retirada de um estudo de coorte também se percebeu que baixas condições socioeconômicas, representadas pela escolaridade materna, representam fatores preditivos para a prematuridade. Mulheres com baixo nível de escolaridade estavam mais propensas a apresentar um parto prematuro (OR 2,14 [IC 95%: 1,04-4,38]). Segundo os autores, o baixo nível socioeconômico estava associado a outros fatores que potencialmente auxiliaram na ocorrência desse desfecho, os determinantes intermediários. Destacam-se: consumo de álcool e tabaco, dieta rica em ácidos graxos saturados e ausência de casa própria, geralmente acomodando elevado número de pessoas (NIEDHAMMER et al., 2011).

### 3.4.3 Condições médicas prévias e complicações da gravidez

Certas condições médicas prévias ou características biológicas próprias da gestante podem favorecer uma antecipação do parto, tornando-o prematuro espontaneamente, por RPM ou por indicação médica.

#### 3.4.3.1. *Índice de Massa Corpórea pré-gestacional*

O índice de massa corpórea é uma ferramenta utilizada como indicadora de gordura corporal, notável pela sua simplicidade e custo irrisório. Dados do IMC pré-gestacional têm fornecido informações importantes acerca do nascimento prematuro. Ambos os extremos do IMC materno parecem exercer influência sobre esse desfecho, segundo coorte realizada nos EUA com mais de 11.000 gestantes. Nesse estudo, gestantes com IMC <17 kg/m² e >35 kg/m² apresentaram maior chance de desenvolver prematuridade. Baixo IMC predispôs a um maior risco de

parto prematuro espontâneo. Elevado IMC desencadeou majoritariamente partos por RPM. Ambos também estavam relacionados aos partos realizados por indicação médica (LYNCH et al., 2014).

Em outra coorte estadunidense, também se mostrou positiva a associação entre elevado IMC (>30kg/m²) e nascimentos prematuros por indicação médica, com OR de 1,49 (IC 95%: 1,09-2,04) nas gestações entre a 34ª e 36ª semana e de 1,78 (IC 95%: 1,19-2,66), nas anteriores à 34ª semana (PARKER et al., 2014).

Em pesquisa realizada no Malaui, percebeu-se, principalmente, a associação de baixo IMC com a prematuridade. Ao se considerar IMC <18.5kg/m² verificou-se que este se encontrava em uma proporção de 9,3% entre pré-termos e de 3,2% entre a termos (p=0,005) (VAN DEN BROEK; JEAN-BAPTISTE; NEILSON, 2014). Resultado semelhante foi encontrado em estudo dos EUA, em que gestantes com baixo IMC pré-gestacional (<19kg/m²) apresentaram risco quase três vezes maior de parto prematuro, quando comparadas a gestantes com IMC normal (OR 2,84 [IC 95%: 1,61-5,01]) (KOSA et al. 2011).

Um dos mecanismos possivelmente envolvido no desencadeamento do parto prematuro por baixo IMC corresponderia a um estado de nutrição inadequado da gestante, com baixas concentrações de macro e micronutrientes na dieta. Dessa maneira, predispõe-se um crescimento restrito do feto e maior ocorrência de infecções e inflamações, por alterações do sistema imunológico. Assim, tal categoria geralmente estaria associada a partos prematuros espontâneos (LYNCH et al., 2014). Os casos relacionados ao outro extremo do IMC estariam, por sua vez, mais associados aos partos por indicação médica ou RPM, devido às doenças decorrentes do sobrepeso ou obesidade. Desordens hipertensivas e o diabetes gestacional são condições que ensejam, com certa frequência, a realização de parto prematuro. Sabe-se que a obesidade é um fator de risco para ambos (PARKER et al., 2014).

#### 3.4.3.2 *Infecções microbianas*

A colonização microbiana e a inflamação do trato gênito-urinário materno são igualmente consideradas fatores de risco consolidados para o parto prematuro. Uma grande variedade de infecções, incluindo sífilis, gonorreia, clamídia, vaginose

bacteriana e infecções urinárias, está associada a maior incidência de condições perinatais adversas (GILBERT et al. 2013).

A maior suscetibilidade das gestantes às infecções gênito-urinárias se deve, principalmente, à dilatação da pelve renal e dos ureteres a partir da oitava semana de gestação e à alteração do sistema imunológico materno, que passa a suprimir em parte a ação do sistema imune adquirido a fim de promover tolerância ao feto (MAZOR-DRAY et al., 2009; GILBERT et al. 2013).

As infecções do trato urinário e as vaginoses bacterianas estão dentre as mais frequentes durante a gestação. Essas últimas já apresentam dados consistentes acerca de sua associação com o parto prematuro. Segundo revisão da literatura realizada sobre o tema, prevê-se que 10 a 15% das mulheres com vaginose bacteriana apresentarão caso de prematuridade. A maioria dos estudos, ainda, indica que gestantes com tal infecção detém um OR de 2,0 a 6,0 em relação ao parto prematuro, se comparadas a gestantes sem episódio infeccioso. Adicionalmente, percebe-se que essa relação independe da vaginose ser sintomática ou assintomática (MANNS-JAMES, 2011).

Em estudo israelense com 199.093 gestantes verificou-se que 2,3% desenvolveram infecções do trato urinário. Nessa parcela, percebeu-se maior ocorrência de índices de parto prematuro (15,1%) do que entre as gestantes sem episódios infecciosos durante a gestação (7,8%) ($p<0,001$). Ao se analisar a associação entre a infecção do trato urinário e os partos prematuros inferiores a 37 e a 34 semanas, manteve-se a significância em ambos, com OR de 2,0 (IC 95%: 1,9-2,3) e 2,2 (IC 95%: 1,9-2,6), respectivamente (MAZOR-DRAY et al., 2009). De maneira mais contundente, infecções do trato urinário em população africana foram responsáveis por um OR de 39,0 (IC 95%: 17,1-88,6, $p<0,001$) em relação à prematuridade (CHIABI et al., 2013).

Estudo realizado em Taiwan, no leste asiático, envolvendo mais de 40.000 gestantes com infecções do trato urinário, mostrou resultado contrário. Não houve associação com a prematuridade limítrofe e moderada (quando considerada <37 e <34 semanas), mesmo em casos com pielonefrite associada (CHENG et al., 2010).

Destaca-se, também, dentre as possibilidades infecciosas, a corioamnionite, uma inflamação do âmnion, córion e placenta, geralmente de origem bacteriana. A ocorrência da corioamnionite está inversamente ligada à idade gestacional, sendo,

portanto, associada à maioria dos casos de prematuridade extrema e a 16% dos casos moderados (<34 semanas). Tal infecção é capaz de gerar uma cadeia de respostas imunológicas que culmina na produção de prostaglandinas e de MP. As primeiras são responsáveis pelo aumento das contrações uterinas e as segundas pela degradação das membranas ovulares, predispondo à RPM e, dessa forma, ao parto prematuro, mesmo em estágios iniciais (GALINSKY et al., 2013).

Em relação à forma crônica da corioamnionite, já se verificou que sua frequência em pacientes com parto por RPM corresponde a 39% e, em pacientes com parto prematuro e manutenção da integridade das membranas, a 34% ($p<0,05$). Ambas as medidas são significativamente maiores do que a encontrada nos partos a termo (KIM et al., 2010). Em relação à corioamnionite aguda, identificou-se que dentre um grupo de pacientes com parto prematuro por RPM, 24% apresentaram esse tipo de infecção. Nessa parcela, a ruptura das membranas, assim como o trabalho de parto em si, ocorreu ainda mais precocemente do que nas gestantes que não apresentaram corioamnionite aguda ($p= 0,06$) (LEE et al., 2013).

Outros casos de infecções maternas sistêmicas, ainda que em sítios distantes anatomicamente do útero e do feto, têm sido estudados acerca de sua relação com a prematuridade. Estudo realizado em coorte dinamarquesa encontrou associação entre a ocorrência de infecções do ouvido, nariz e garganta ocorridas antes da 17ª semana gestacional e o parto prematuro espontâneo (OR 1,23 [IC 95%: 1,04-1,52]). Não foram encontradas associações positivas quando consideradas pneumonia, resfriado comum e infecção pelo vírus Influenza (MORKEN et al., 2011).

Estudo mais recente, entretanto, demonstra a relação entre o nascimento prematuro e o resfriado comum, determinado por infecções virais do trato respiratório superior. A frequência de partos anteriores à 37ª semana em gestantes apresentando tal infecção se mostrou superior à de gestantes sem a manifestação da condição médica. No primeiro grupo, percebeu-se frequência da prematuridade de 15,9%, enquanto no segundo, observou-se uma frequência de 7,9% ($p<0,001$) (HARRIS; SHEINER, 2013).

#### 3.4.3.3 *Diabetes mellitus*

Outra condição médica reconhecidamente capaz de desencadear o parto prematuro consiste no *Diabetes mellitus* (DM), nas formas pré-gestacionais e

gestacionais. Segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, edição 2013/2014, o diagnóstico do DM pode se dar através de três critérios aceitos atualmente: a) presença de sintomas clássicos da doença acrescidos de glicemia casual superior a 200 mg/dL; b) glicemia de jejum superior a 126 mg/dL, ensejando repetição se necessário; c) glicemia de 2 horas após sobrecarga de 75 g de glicose superior a 200 mg/dL (Quadro 1). Em relação ao diabetes gestacional, sua investigação já inicia na primeira consulta pré-natal e deve ser repetida no segundo trimestre, com a realização de teste oral de tolerância à glicose com ingestão de 75 g de glicose. As coletas em jejum e em uma e duas horas após a sobrecarga não devem ultrapassar 92 mg/dL, 180 mg/dL e 153 mg/dL, respectivamente (SBD, 2014).

Quadro 1 - Valores de glicose plasmática em mg/dL para diagnóstico do *Diabetes Mellitus*.

| CATEGORIA | JEJUM* | 2H APOS 75G DE GLICOSE | CASUAL** |
|---|---|---|---|
| Glicemia normal | <100 | <140 | |
| Tolerância diminuída à glicose | >100 e <126 | ≥140 e <200 | |
| Diabetes *mellitus* | ≥ 126 | ≥200 | ≥200 (com sintomas clássicos)*** |

*O jejum recomendado por no mínimo 8 horas. **Glicemia casual é aquela realizada a qualquer hora do dia, sem se observar o tempo de jejum recomendado. ***Os sintomas clássicos incluem poliúria, polidipsia e perda não explicada de peso.
Fonte: Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2014, p.9.

A relação de diabetes pré-existente com a prematuridade foi verificada em coorte na Arábia Saudita com 3.157 gestantes, das quais 116 (3,7%) eram diabéticas. Tais pacientes, quando comparadas com normoglicêmicas, estavam mais propensas a desenvolver parto prematuro (OR 2,24 [IC 95%: 1,37-3,67]) (WAHABI et al., 2012).

Outro estudo corrobora com a asserção anterior. Segundo Gui et al. (2014), a presença de diabetes anterior à gestação e de DG severa foi capaz de aumentar a ocorrência de parto prematuro. A prevalência de prematuridade no primeiro grupo foi de 36,5% e de 31,7% no segundo. Tais dados foram significativamente superiores ao se comparar com a taxa de prematuridade de 12,8% encontrada em pacientes com DG leve a moderado ($p<0,017$) (GUI et al., 2014). Uma coorte estadunidense encontrou associação da diabetes pré-existente com a prematuridade, evidenciando

OR 2,2 (IC 95%: 2,1-2,4). No entanto, percebeu-se maior relação entre o desfecho quando o DM pré-existente se encontrava em combinação com hipertensão crônica (OR 4,9 [IC 95%: 4,0-6,0]) (YANIT et al., 2012).

Em coorte prospectiva com 2.056 gestantes verificou-se uma associação positiva entre o diagnóstico de diabetes gestacional e prematuridade. A prevalência de nascimento prematuro entre gestantes com DG foi de 12,6%, enquanto o encontrado em pacientes sem DG se mostrou em 8,3% (p=0,03) (BENER; SALEH; AL-HAMAQ, 2011).

3.4.3.4 *Síndromes hipertensivas*

Outra condição médica com participação relevante nos desfechos perinatais envolve as síndromes hipertensivas. Estas incluem: 1) a hipertensão crônica (pressão arterial > 140/90 mmHg) observada antes da gravidez ou até a 20ª semana de gestação, ou diagnosticada pela primeira vez durante a gestação, mas sem resolução até doze semanas após o parto; 2) a hipertensão gestacional, observada após a 20ª semana gestacional, com níveis pressóricos retornando ao normal em até 12 semanas após o parto; e 3) a pré-eclâmpsia, uma combinação da hipertensão induzida pela gestação e a ocorrência de proteinúria (>0,3 g/24h). Esta última pode evoluir para a eclâmpsia, caracterizada pela presença, na gestante, de convulsões tônico-clônicas generalizadas ou do estabelecimento de estado de coma (BRASIL, 2010).

Diversos estudos comprovam a relação entre a presença de uma das síndromes hipertensivas na gestante e a maior chance de desenvolver parto prematuro. Pesquisa realizada na Austrália com 70.386 gestantes analisou a associação entre a presença dos três subtipos de síndromes hipertensivas com a ocorrência de prematuridade. Em pacientes com hipertensão crônica pré-existente, hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia, verificou-se um OR crescente de 2,01 (IC 95%: 1,56-2,58), 2,62 (IC 95%: 2,40-2,86) e 5,13 (IC 95%: 4,11-6,42), respectivamente (VREEBURG et al., 2004).

Percebeu-se também, em estudo seguinte realizado no Japão, que a hipertensão gestacional, ainda que não configure o quadro clínico mais severo dentre as síndromes hipertensivas, apresentou prevalência de prematuridade similar à da pré-eclâmpsia, quando se encontrava descontrolada, mesmo com o uso de

medicação intravenosa ou oral. Nessa pesquisa, as prevalências de parto prematuro foram de 56,8% no grupo de pacientes com hipertensão gestacional descontrolada e de 53,6% no grupo com quadro de pré-eclâmpsia, comparadas com taxa de 20,8% nas gestantes com hipertensão gestacional sob controle ($p<0,05$ para ambas as análises). Mesmo com taxa de prevalência menor, este último grupo ainda apresentou valores superiores as das gestantes normotensas (ONO et al., 2013).

Um estudo multicêntrico organizado pela OMS investigou a relação entre a pré-eclâmpsia e a prematuridade. Após análise de dados de 24 países, determinou-se que tal condição médica constitui um fator de risco significativo para o nascimento prematuro, apresentando um OR de 2,86 (IC 95%: 2,68-3,06). O Brasil, ainda nessa pesquisa, apresentou a maior taxa de ocorrência de pré-eclâmpsia dentre todos os países participantes. Em 8,23% de todas as gestações incluídas no estudo, houve a manifestação da pré-eclâmpsia pela gestante (BILANO et al., 2014).

### 3.4.4 Fatores genéticos

Além dos fatores ambientais, os aspectos genéticos contribuem para o nascimento prematuro. Em revisão bibliográfica sobre as evidências de tais fatores, percebeu-se uma influência majoritária das características maternas sobre esse desfecho. No caso de fatores genéticos encontrados nos fetos capazes de induzir ao parto prematuro, identificou-se que estes correspondiam justamente aos alelos herdados da mãe (WEINBERG; SHI, 2009).

Diversos estudos permitem inferir que os genes paternos apresentam pouco ou nenhum efeito sobre o risco de prematuridade. Pesquisa norueguesa, por exemplo, utilizando registros médicos de 191.282 mães e 127.830 pais, encontrou um aumento nas chances de parto prematuro na primeira gestação de mulheres que nasceram sob essa mesma condição (OR 1,54 [IC 95%: 1,42-1,67]). Porém, não se encontrou a mesma associação em pais nascidos prematuros (WILCOX et al., 2007).

Da mesma forma, outro estudo de coorte dinamarquês detectou que mulheres com parto prematuro anterior possuíam maior risco de recorrência (OR 5,6 [IC 95%: 5,5-5,8]), enquanto homens com histórico de filho prematuro não apresentavam maior risco de novo desfecho quando em relacionamento com outra parceira. Ainda se verificou que meias-irmãs apenas detinham maior risco de parto prematuro

quando a relação de parentesco era mantida por laços maternos (OR 1,6 [IC 95%: 1,5-1,6]). Meias-irmãs de um mesmo pai não apresentavam esse aumento de risco conjunto de prematuridade (BOYD et al., 2009).

Algumas condições relacionadas à prematuridade são determinadas por alterações em um único gene, determinando doenças tipicamente mendelianas. Destacam-se defeitos do tecido conectivo, do colágeno e algumas dermopatias capazes de induzir à RPM. No entanto, na maioria dos casos, a prematuridade é multifatorial e, muito provavelmente, envolve alterações em mais de um gene, seguindo um padrão não-mendeliano. Nesse caso, são utilizados estudos de genes candidatos. Ou seja, selecionam-se, para investigação, os genes que estão potencialmente envolvidos com o parto pré-termo. As hipóteses são geradas, entretanto, baseadas apenas nas evidências já estabelecidas até o momento acerca da condição médica. Em relação à prematuridade, isso constitui um fator limitante, pois vários dos seus mecanismos fisiopatológicos permanecem ainda obscuros (ALLEN; FOUNDS, 2013).

De qualquer forma, até o momento foram estabelecidas três categorias básicas de genes candidatos relacionados à prematuridade. Tais são responsáveis pela expressão das citocinas envolvidas na regulação de processo inflamatório; dos componentes das cascatas bioquímica e hormonal que levam ao trabalho de parto; e de fatores implicados em processos vasculopáticos (GIARRATANO, 2006, *apud* ALLEN; FOUNDS, 2013).

A classe mais extensivamente estudada consiste nas citocinas e proteínas envolvidas na resposta à inflamação/infecção da gestante e na síntese e degradação da matriz de colágeno das membranas ovulares. Polimorfismos nos genes responsáveis pela expressão da Interleucina 6 (*IL-6),* Interleucina 10 (IL-10)*,* Interleucina-1 beta (*IL-1*$\beta$) e Fator de Necrose Tumoral Alfa ($TNF\alpha$) já foram estudados com maior frequência. Em relação a *IL-6*, por exemplo, verificou-se em uma metanálise que o polimorfismo rs1800795 apresenta associação positiva com a prematuridade em população branca homogênea europeia (OR 0,68, $p<0,05$). Analisando-se populações heterogêneas não se verificou significância estatística (WU et al., 2013). Estudos relacionados aos polimorfismos da *IL-10 (-1084, -819 e -592)* demonstraram ausência de associação com o parto prematuro (STONEK et al., 2008; MOURA et al., 2009). Em outro estudo dos mesmos polimorfismos verificou-se

relação quando se considerava apenas partos ocorridos em gestações com menos de 29 semanas (ANNELLS et al., 2004). Em relação a *IL-1β,* observa-se a publicação de estudos conflitantes. Em alguns, verifica-se a associação entre o polimorfismo genético e a prematuridade; em outros, tal associação não se evidencia (ANNELLS et al., 2004; HOLLEGAARD et al., 2008; MOURA et al., 2009; YILMAZ et al., 2012).

Além de tais genes, detectam-se estudos mais escassos de SNPs nos genes codificantes da metaloproteinase-8 (MMP-8), de receptores *Toll-like*, da proteína D surfactante (TLR4), do inibidor tecidual da metaloproteinase de matriz 2 (TIMP-2), do canal de potássio ativado pelo cálcio da subfamília N, membro 3 (KCNN3), entre outros. De maneira geral, quase todos os estudos estão relacionados aos fatores de risco clássicos da prematuridade, já citados anteriormente. Os estudos de polimorfismos das citocinas inflamatórias, por exemplo, tentam estabelecer relação com as infecções microbianas agudas, uma condição médica associada ao parto prematuro (BERHMAN; BUTLER, 2007).

Os resultados obtidos, até o momento, têm sido pouco conclusivos. Estudos com pequena amostra populacional, resultados com significância estatística limítrofe e populações heterogêneas com vários fatores de confundimento dificultam a determinação da real contribuição genética para o parto prematuro (ANUM et al. 2009).

A determinação da prematuridade como resultado do processo evolutivo traz uma nova visão sobre o tema. Ao se comparar a própria linhagem humana com primatas semelhantes, identificou-se que houve ao longo do tempo, na nossa espécie, um aumento substancial do crânio (capaz de acomodar um cérebro maior e mais evoluído) e um estreitamento da bacia pélvica (apto a promover o bipedalismo), dificultando o trabalho de parto. Dessa maneira, já se estudaram alguns genes envolvidos na redução do período gestacional que evoluíram mais rapidamente na nossa espécie quando comparados a outras (PLUNKETT et al, 2011).

A detecção dos genes com evolução acelerada foi determinada pela razão entre mutações não-sinônimas e sinônimas. A partir da análise de diversas sequências genéticas em regiões codificantes e não codificantes, identificaram-se 150 genes candidatos possivelmente relacionados ao nascimento prematuro, somando mais de 8.400 SNPs, cuja razão entre mutações não-sinônimas e sinônimas indicavam ser genes acelerados quando comparados com primatas

semelhantes. Dentre os polimorfismos em genes candidatos, alguns se mostraram mais prevalentes em gestantes com parto prematuro em estudos observacionais do tipo caso-controle. Polimorfismos no gene *FSHR* demonstraram forte correlação estatística com a prematuridade (PLUNKETT et al., 2011). Polimorfismos no gene *PGR*, com evidente característica de evolução acelerada, já haviam demonstrado relação com o nascimento prematuro em estudos anteriores (EHN et al., 2007; MANN et al., 2013).

Os 8.490 SNPs identificados no estudo de Plunkett et al. (2011) foram analisados em gestantes finlandesas (165 com partos prematuros e 163 controles), derivadas de população geneticamente homogênea e sob ínfima influência de fatores de risco ambientais. Polimorfismos do gene *FHSR* foram os que mostraram resultados mais significativos, denotando elevada aceleração. Onze deles foram analisados em três populações norte-americanas com diferentes ascendências acerca de sua associação com a prematuridade: a) ascendência europeia (147 casos e 157 controles); b) ascendência africana (79 casos e 171 controles); c) ascendência hispânica (73 casos e 92 controles). Na população afroamericana, mesmo após correção estatística para múltiplos testes, verificou-se significância representativa quando estudados os polimorfismos rs11686474, rs11680730 e rs12473815 (OR 1,63–1,82: IC 95%, $p<0,005$). Em relação ao último, determinou-se que se encontrava em desequilíbrio de ligação com o restante, justificando o seu estudo isoladamente. O rs12473815, nesse mesmo estudo, também demonstrou associação significativa com a prematuridade quando estudado na população finlandesa, de etnia bastante distinta. A presença do alelo de risco se mostrou mais frequente na população de gestantes com parto prematuro ($p<0,01$). Nesse polimorfismo, o alelo de risco é representado pela substituição de uma citosina por uma timina (PLUNKETT et al., 2011).

Em relação ao gene *PGR,* em estudo realizado considerando análises maternas e fetais, verificou-se a ocorrência de alguns polimorfismos relacionados à prematuridade. Destaca-se o rs1942836, cujo alelo de risco corresponde à substituição de uma timina por uma citosina. Quando considerada a análise de amostras maternas, verificou-se significância mesmo na prematuridade limítrofe ($p=0,04$). Em relação à análise do material fetal, verificou-se associação da variável de risco do polimorfismo com a ocorrência de parto prematuro em todos os estágios

de prematuridade (da limítrofe até a extrema), mesmo quando excluídas as gestações múltiplas (p<0,01) (EHN et al., 2007).

Estudo publicado em 2013 corroborou com dados anteriores. O alelo de risco da variante rs1942836 do gene *PGR* mostrou forte associação com a prematuridade ao se analisar material fetal (p=0,004). Ao se empregar amostras maternas, percebeu-se relação com o parto prematuro ocorrido entre a 33ª e 36ª semana (p=0,0004) (MANN et al., 2013).

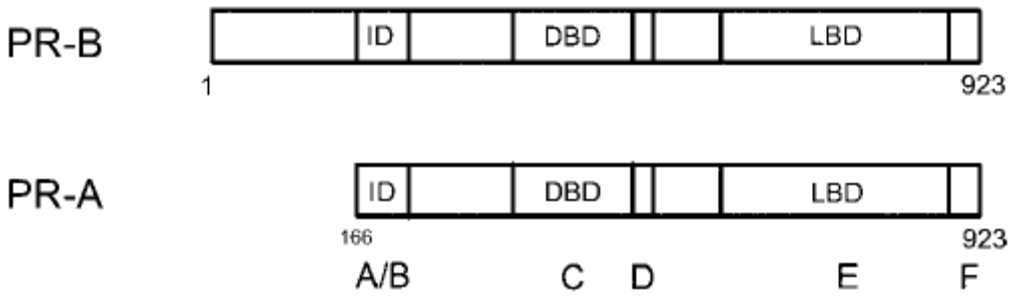
#### 3.4.4.1 *Receptores da progesterona e do hormônio folículo estimulante no trabalho de parto*

A progesterona (PG) representa um dos componentes relacionados à regulação das funções reprodutivas femininas. Para isso, esse hormônio atua em diversos locais do organismo, tais como ovários, útero, glândulas mamárias, cérebro e ossos. Nos ovários e útero, a PG é responsável pela liberação de oócitos maduros passíveis de se fundirem com espermatozoides, pela implantação do embrião no útero, pelo crescimento do revestimento uterino e pela supressão da contração do miométrio. Nas glândulas mamárias, contribui para o desenvolvimento das glândulas túbulo-alveolares, cujas funções são secretar o leite e suprimir a produção das proteínas do leite até que ocorra o parto. No cérebro, é responsável pela regulação da resposta a estímulos sexuais e, nos ossos, pela prevenção de perda óssea (GRAHAM; CLARKE, 1997).

O principal interesse dos receptores da progesterona em relação ao nascimento prematuro fundamenta-se em seu papel na contratilidade do miométrio. Existem duas isoformas de receptores da PG, oriundos de um único gene: PR-A e PR-B. Ambos atuam como receptores nucleares, regulando a transcrição gênica de outras proteínas. O complexo progesterona-receptor se liga a sequencias regulatórias específicas do DNA através de interações específicas com proteínas co-ativadoras capazes de regular a atividade da RNA-polimerase (CONNEELY; LYDON, 2000). PR-B apresenta em sua porção amino-terminal uma sequencia adicional de aminoácidos, conferindo-lhe a capacidade de se ligar a certas proteínas co-fatores de maneira mais eficiente e de desencadear uma maior diversidade de respostas intracelulares (Figura 5). PR-A, além de apresentar tamanho reduzido e

ligações menos eficientes com seus agonistas, também é capaz de exercer função antagonista sobre PR-B (CONNEELY et al., 2002).

Figura 5 - Organização estrutural das isoformas A e B do receptor da progesterona, evidenciando a sequencia adicional de aminoácidos da isoforma B.




Os números 1 e 923 na PR-B e 166 e 923 na PR-A denotam a posição de cada aminoácido na proteína. DBD – Domínio de ligação ao DNA (*DNA binding domain);* LBD – Domínio de ligação ao ligante (*Ligand binding domain*); ID – Domínio inibitório (*Inhibitory domain).*
Fonte: MULAC-JERICEVIC; CONNEELY, 2004, p.140.

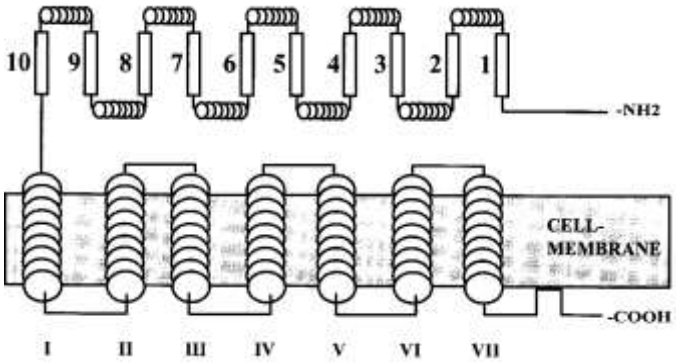
Considerando, dessa forma, que a supressão da contratilidade uterina corresponde à função fisiologicamente exercida majoritariamente pelo isoforma B, para que se inicie o trabalho de parto é necessário que ocorra um aumento na relação entre PR-A e PR-B. Dessa forma, PR-A será capaz de realizar sua função antagonista sobre PR-B, permitindo um aumento na sensibilidade aos estímulos de contração do miométrio (DODD; CROWTHER, 2010).

Em relação ao receptor do hormônio FSH, algumas informações já publicadas também indicam sua importância no trabalho de parto. O FSH é secretado pela glândula hipófise e, em mulheres, age primariamente sobre os ovários para o desenvolvimento do folículo e síntese de estrogênios. No entanto, ele também apresenta funções em tecidos não-gonadais, como endométrio, miométrio, cérvix e vasos uterinos (HASCALIK et al., 2010).

O FSHR, esquematizado na figura 6, corresponde a um receptor acoplado à proteína G, formando um complexo transmembrana com sete hélices hidrofóbicas com sítios de ligação intra e extracelulares. Na porção extracelular, o FSHR apresenta dez regiões em repetição ricas em leucina (LRR). Através delas ocorre a ligação com o hormônio FSH, capaz de induzir uma mudança conformacional na porção transmembrana. A partir daí, ativa-se a proteína G acoplada e se inicia a ativação do AMP cíclico. Este induz a fosforilação de diversas proteínas

subsequentes que, ao final, serão capazes de ativar a transcrição de certas porções do DNA (SIMONI et al., 1997).

Figura 6 - Modelo esquemático do receptor do FSH.




As sete estruturas em anéis representam as hélices hidrofóbicas e as dez estruturas retangulares condizem às regiões de repetição ricas em leucina, localizadas na porção extracelular.
Fonte: SIMONI et al., 1997, p.741.

A presença de FSHR no miométrio representa sua contribuição mais direta em relação ao parto prematuro. Análise através de imunohistoquímica evidenciou a presença do receptor de FSH na musculatura lisa do miométrio. Em gestantes, os níveis de FSHR em tal tecido mostraram-se até dez vezes maiores quando comparados com mulheres não-grávidas ($p<0,05$). Percebeu-se ainda, a presença de mRNA no local, sinalizando a produção autócrina ou parácrina do FSH. Isso corrobora com a informação de que a secreção do FSH pela hipófise é inibida durante a gestação (STILLEY et al., 2014).

Estudos com modelos animais apontam para uma função do FSH bastante semelhante à encontrada para a PG. Nesses animais, a aplicação do hormônio no miométrio provocou a supressão dos sinais elétricos, indicando sua ação na inibição da contração uterina (HASCALIK et al., 2010).

Após revisão da bibliografia disponível, não foi possível constatar o efeito proporcionado pelos polimorfismos estudados (rs12473815 e rs1942836) sobre a expressão dos seus receptores. Ainda se desconhece se o comprometimento é quantitativo (diminuição do número de receptores expressos), qualitativos (expressão de receptores com funcionalidade reduzida) ou se envolvem outros mecanismos de ação.

# 4. METODOLOGIA

## 4.1 TIPO DE ESTUDO

Para identificação dos fatores de risco associados à prematuridade, optou-se pela realização de estudo epidemiológico observacional retrospectivo do tipo caso-controle.

## 4.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado com participação de gestantes da Maternidade Darcy Vargas, durante período de internação pós-parto. A MDV, localizada na cidade de Joinville/SC, referência no cuidado pré-natal e puerpério, está afiliada à Rede Cegonha desde 2012, representando o primeiro estabelecimento do setor a pactuar com o programa em Santa Catarina. Apresenta estrutura com aproximadamente 75 leitos obstétricos, 10 leitos em UTI neonatal e 26 em berçário, para atendimento de pacientes de toda a região norte do estado oriundos do Sistema Único de Saúde (SUS). Realiza cerca de 500 partos e 3.000 atendimentos de emergência por mês. Dada a sua abrangência, a MDV constitui local apropriado para a implementação de iniciativas que visem a identificar os fatores etiológicos mais relevantes associados ao nascimento prematuro.

## 4.3 PERÍODO DE ESTUDO

A inclusão de pacientes e a coleta de dados ocorreram entre os meses de outubro de 2013 e outubro de 2014.

## 4.4 POPULAÇÃO ALVO E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram inclusas, consecutivamente, gestantes primíparas, entre 18 e 35 anos, atendidas na MDV com trabalho de parto espontâneo, resultando em RN único, vivo e sem malformações evidentes. Através da confirmação da idade gestacional por ultrassonografia, consideraram-se casos prematuros os partos ocorridos anteriormente à 37ª semana. Para o grupo de controles, incluíram-se partos ocorridos entre a 37ª e a 42ª semana de gestação.

Ao longo do estudo, excluíram-se as gestantes transferidas de outras unidades hospitalares, cujo exame obrigatório de admissão para o parto, o VDRL (*Veneral Disease Research Laboratory*), já tivesse sido realizado. Nesse caso, por não haver nova coleta de sangue, inviabilizava-se a investigação dos polimorfismos genéticos propostos.

Todas as gestantes participantes concordaram com os termos da pesquisa mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) específico, sendo assegurado o direito de recusa e desistência à participação em qualquer momento da pesquisa, sem penalidades ou prejuízos de qualquer natureza, garantindo-se sempre a privacidade de todas as informações obtidas (Apêndice A).

Para o cálculo de tamanho amostral, foi utilizada ferramenta disponível na internet (http://www.vsai.pt/amostragem.php). Levou-se em consideração intervalo de confiança de 95%, erro tipo I máximo admitido de 5%, poder de estudo de 80% e população estimada de 6.000 gestantes ao ano em Joinville. Utilizou-se como parâmetro uma frequência aproximada de 42% encontrada em estudo de Plunkett e cols. (2011) em relação ao alelo de risco do polimorfismo rs12473815. O tamanho amostral mínimo recomendado foi de 356 gestantes.

## 4.5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Para identificação das gestantes que se adequavam aos critérios de elegibilidade, estipularam-se visitas em dias alternados à MDV, considerando que tal periodicidade respeitaria o tempo mínimo de internação pós-parto correspondente a 48 horas.

Inicialmente, eram realizadas consultas ao prontuário eletrônico Micromed® empregando, como critério de seleção, os nascimentos ocorridos desde a última visita à maternidade. Adicionalmente, acrescentava-se um filtro de busca que discriminava apenas a faixa etária de interesse para o estudo.

Após delimitação da população pesquisada, os prontuários eletrônicos eram analisados individualmente, buscando identificar todos os critérios de inclusão pré-estabelecidos. Para as pacientes de ambos os grupos (caso e controle), identificavam-se possíveis circunstâncias de parto prematuro por indicação médica

ou por RPM que, devido a condições maternas, excluiriam a possibilidade de um parto prematuro espontâneo.

A cada gestante que manifestou anuência foi atribuído um número único sequencial de três algarismos. A correspondência entre a sequência numérica e a identificação das participantes restringiu-se à pesquisadora responsável. Dessa forma, preservou-se a identidade de cada gestante.

Para a realização da pesquisa, solicitou-se a autorização do diretor técnico da MDV, através da assinatura de termo de anuência. Este garantia, durante a execução do projeto, a aplicação das diretrizes contidas na Resolução CNS 466/2012 e a não interferência na rotina assistencial da instituição.

### 4.5.1 Dados comportamentais, sociodemográficos, condições médicas prévias e complicações da gravidez

Após anuência da gestante, realizou-se entrevista individualizada conduzida por equipe de bolsistas de iniciação científica do curso de Medicina da UNIVILLE, sob orientação da pesquisadora responsável e do Dr. Jean Carl Silva, coordenador do Serviço de Atendimento à Gestante de Alto Risco na MDV.

As entrevistas consistiam na aplicação de um questionário elaborado após revisão bibliográfica, que permitia avaliar os seguintes fatores de risco relacionados à prematuridade: escolaridade, condições socioeconômicas, tabagismo, ingestão de álcool, IMC pré-gestacional, DG e a ocorrência de infecções microbianas (Apêndice B). Para a avaliação da ingestão de álcool e das condições socioeconômicas, empregaram-se questionários já padronizados que foram inseridos ao questionário da pesquisa, que também envolvia os outros fatores de risco mencionados acima.

Para avaliar a ingestão de álcool foi utilizado o instrumento validado AUDIT-C (*Alcohol Use Disorders Identification Test C*; Anexo A), que fornece uma medida contínua do padrão de consumo de álcool da gestante, aferida pela quantidade e frequência de uso. As qualidades psicométricas do questionário AUDIT-C já foram anteriormente testadas para gestantes. Quando seus resultados são maiores ou iguais a três, identifica-se como elevado o consumo de álcool, com sensibilidade de 94,6% (DAWSON et al., 2005).

O questionário para obtenção dos dados socioeconômicos foi definido pelo Critério de Classificação Econômica Brasil (CCEB) da Associação Brasileira das Empresas de Pesquisa (Abep) (ABEP, 2013). Através do CCEB, o entrevistado é questionado sobre a presença e a quantidade de certos itens em sua residência e sobre a escolaridade do chefe de família. A partir desses dados, atribui-se ao participante uma pontuação, que o classifica em estratos econômicos A1, A2, B1, B2, C1, C2, D ou E (Anexo B).

Para as demais variáveis (escolaridade da gestante, tabagismo, infecções microbianas) contidas no questionário proposto, utilizaram-se perguntas estruturadas especificamente para o presente estudo a partir de revisão bibliográfica pertinente, contendo questões fechadas dicotômicas ou de múltipla escolha. Para a definição da escolaridade da gestante, empregaram-se as mesmas categorias contidas no CCEB. Em relação ao tabagismo, não se encontrou um questionário padronizado e específico para população de gestantes. Portanto, foram investigados aspectos do tabagismo materno descritos em estudo realizado no extremo sul do Brasil (ZHANG et al., 2011).

Em relação ao IMC, o questionário estipulava perguntas abertas em relação às variáveis peso e altura. Devido às condições de recuperação pós-parto das gestantes, optou-se pela não realização de manobras extras, desnecessárias e possivelmente dolorosas ou incômodas para a medição de altura. Nesse caso, tais variáveis foram autorreferidas, ainda que haja discordância sobre a confiabilidade de tais informações (OLIVEIRA et al., 2004; PEIXOTO et al, 2008).

Para a captação dos dados relacionados às condições médicas ou complicações da gravidez (ocorrência de infecções microbianas e DG) também foram utilizadas as informações contidas nos prontuários médicos, acessadas somente após a obtenção da anuência da participante.

As informações obtidas por meio dos questionários foram digitadas em banco de dados, utilizando-se o programa *Epidata 3.1*. Erros de consistência e de omissão cometidos durante a digitação foram detectados via conferência subsequente. Quando divergências foram encontradas, os instrumentos foram consultados e as respostas foram reconsideradas. Ao final, tais dados foram exportados para planilha do *Excel*® para análise estatística.

Os dados primários, captados nas entrevistas e nas consultas aos prontuários médicos, assim como as informações compiladas em arquivo digital foram utilizados exclusivamente para a elaboração de produção científica e serão mantidos em sigilo por cinco anos após o término da pesquisa. Ao final deste período, os impressos e arquivos digitais serão destruídos.

### 4.5.2 Dados genéticos

Após a realização da entrevista, buscou-se, em uma unidade laboratorial situada dentro da MDV, a amostra de sangue da gestante, proveniente da própria rotina hospitalar.

Para as análises genéticas, foram utilizadas alíquotas residuais de 1,5 mL da fase sólida (coágulo) de amostra de sangue total sem aditivo. Portanto, não houve necessidade de uma nova coleta específica para o estudo, não se impondo, desta forma, riscos físicos às participantes. As amostras de sangue foram enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, onde foram estocadas sob refrigeração (4°C) até a realização da extração e purificação de DNA genômico.

#### *4.5.2.1 Extração, purificação e quantificação do DNA*

Executou-se esta etapa com a utilização do kit “BIOPUR Kit de Extração Mini SPIN PLUS” (BIOPUR, Reinach, Suíça), conforme recomendações do fabricante (Anexo C). Inicialmente, cada amostra sanguínea sofreu agitação via vórtex por aproximadamente 1 minuto, até se obter a dissolução parcial do coágulo. Em seguida, acrescentaram-se 200 µL de Tampão de Lise A e 20 µL de Proteinase K, a fim de se dissolver as membranas celulares e nucleares e de se hidrolisar as histonas, respectivamente. A solução foi incubada em termobloco a 56°C, por 15 minutos. Acrescentaram-se, então, 400 µL de Tampão de Lise B6, homogeneizando-se a mistura. Em seguida, transferiu-se todo o volume de cada tubo para colunas contendo membrana de sílica. Incubou-se por 1 minuto em temperatura ambiente e, em seguida, centrifugou-se por 2 minutos a 13.200 rpm em centrífuga Modelo Eppendorf 541512. Nesse momento, o Tampão de Lise B6 propicia condições ótimas de ligação do DNA genômico à membrana, permitindo que todos os outros

constituintes da amostra sejam desprezados. Para remoção de contaminantes adicionais, 500 µL de Tampão I de Lavagem foram adicionados à coluna contendo a membrana com o DNA aderido e, em seguida, o conjunto foi centrifugado por 1 minuto a 13.200 rpm. Com a mesma finalidade, o procedimento foi repetido com 800 µL de Tampão II de Lavagem. Após descarte do filtrado, uma centrifugação adicional por 4 minutos foi realizada para remoção completa de todos os contaminantes e reagentes utilizados. Por fim, adicionaram-se 200 µL de Tampão de Eluição pré-aquecido a 56°C para que ocorresse a liberação dos ácidos nucléicos da membrana de sílica. Em uma última centrifugação a 8.000 rpm, por 1 minuto, separou-se o filtrado contendo o DNA extraído, mantendo-o em *freezer a* -20°C até análises posteriores.

Para sua quantificação, empregou-se espectrofotômetro Spectrum SP 2000-UV. Inicialmente, mediu-se a absorbância de cada amostra a 260 nm, comprimento de onda correspondente ao pico de absorção máxima do DNA. A partir desse dado, obteve-se a concentração de DNA em cada amostra através da seguinte fórmula: "Concentração de DNA = leitura da absorbância a 260nm x 50 x 500 (fator de diluição usado na leitura)". Tem-se como referência que uma unidade de densidade ótica a 260 nm corresponde aproximadamente a 50 µg/mL de DNA de cadeia dupla.

Logo após, realizou-se medição a 280nm, região de absorbância de proteínas. A razão entre as absorbâncias obtidas a 260 nm/280 nm estima a pureza da amostra. Extrações de DNA com razão 260 nm/280 nm ≥ 1,8 foram consideradas suficientemente puras.

Ao final, realizou-se procedimento, através de cálculos de diluição, para que cada amostra permanecesse estocada em concentração final de 100 ng/µL.

*4.5.2.2 Sequenciamento*

Para a validação da metodologia de genotipagem dos polimorfismos de interesse, submeteram-se, inicialmente, 14 amostras escolhidas aleatoriamente dentre os grupos "caso" e "controle" à técnica de sequenciamento de DNA.

Nesta técnica, um *primer,* definido como uma sequência específica de nucleotídeos, é capaz de reconhecer as extremidades da sequência de interesse do DNA em estudo. A partir daí, desencadeia-se a síntese de uma fita complementar ao DNA molde, através da inserção de desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) e

didesoxinucleotídeos trifosfatos (ddNTPs). Estes últimos, diferentemente dos dNTPs, não apresentam em sua estrutura um grupamento hidroxila, indispensável para que ocorra a ligação do dNTP seguinte a ele. Dessa forma, a cada vez que um ddNTP é acrescido à cadeia, interrompe-se sua extensão, gerando ao final da reação de sequenciamento fragmentos de DNA de diferentes tamanhos e terminados com diferentes ddNTPs. Cada ddNTP utilizado é marcado por um fluoróforo diferente. Quando os fragmentos de DNA são submetidos a um feixe de *laser*, cada fluoróforo emite luz em comprimento de onda distinto que será traduzido na forma de sequência nucleotídica (FERREIRA; ROCHA, 2014; LIMA, 2008).

Foi necessário inicialmente, portanto, desenvolver um par de *primers* capaz de reconhecer as duas extremidades da região do gene *FSHR* que contêm o polimorfismo rs12473815 e um segundo par de *primers* capaz de identificar a região do gene *PGR* que contém o polimorfismo rs1942836, utilizando ferramentas de bioinformática. Para o planejamento, análise e definição de *primers* foi empregada a ferramenta *online Primer 3* (ROZEN; SKALETSKY, 2000), através da qual buscou-se a obtenção de sequências com comprimento variável entre 18 e 25 nucleotídeos, com guaninas e citosinas correspondendo a 40-60% de sua composição, não complementares entre si e com semelhante temperatura de fusão (não diferindo em mais de 5°C) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Ao final, definiram-se, para o polimorfismo rs12473815, os *primer*s A *(forward) 5'-CCACCTGGTGAGAGTGTAAGG-3'* e B (*reverse) 5'-CAGCTCCAATCTTCCTGCCA-3'*, capazes de propiciar um produto de amplificação com 134 pares de base. Para o polimorfismo rs1942836, desenvolveram-se os *primers* A (*forward) 5'-TGTGTGACTCTGGGCCTGTA-3'* e B *(reverse) 5'- CATCCTGTTCCCTTTGCCCTA-3'*, resultando em produto de amplificação com 241 pares de base.

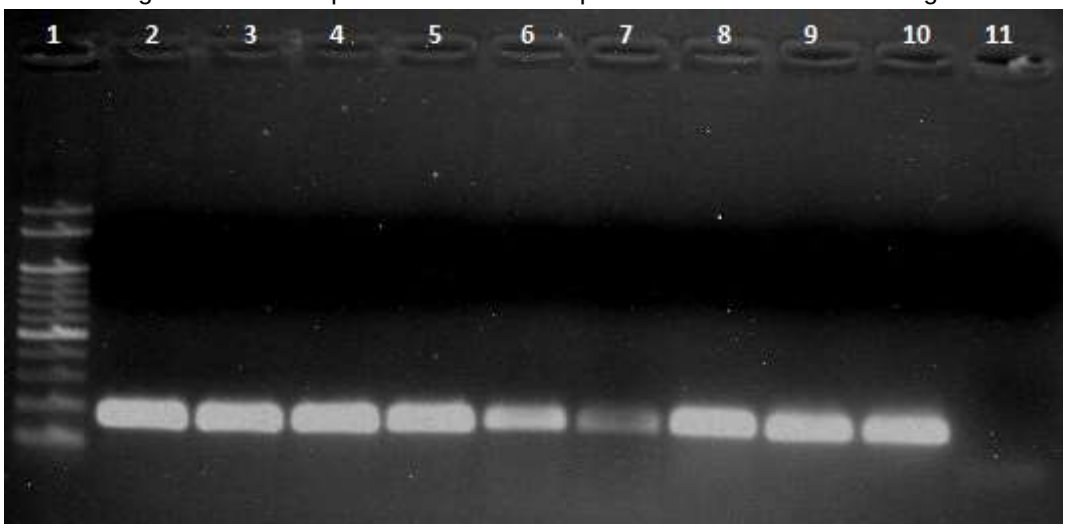
Em seguida, foi testada a especificidade dos *primers* através do *software* BLAST® (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), a fim de verificar se tais eram capazes de reconhecer de maneira não intencional sequências genéticas homólogas disponíveis no banco de dados *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

Uma vez definidos os *primers*, executou-se reação de PCR convencional a fim de verificar se os amplicons gerados correspondiam aos planejados (de 134 e 241 pares de bases). A reação de PCR foi definida após testes de concentração dos *primers* e de temperatura de anelamento em aparelho XP Thermal Cycler (BIOER

Technology Co, Toquio, Japão). Por fim, para ambos os amplicons, determinou-se reação otimizada com a realização de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos constituídos pelas seguintes etapas: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C. Uma etapa de extensão final foi executada por 7 minutos a 72°C.

Para confirmar a amplificação, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% com 0,5 µg/mL de brometo de etídio e, em seguida, visualizados em transluminador após exposição à luz ultravioleta. O gel foi registrado em sistema de fotodocumentação (MiniBis-Pro Photodocumentation System – DNR Bio-Image Systems Ltd., Jerusalém, Israel). A figura 7 exemplifica os resultados obtidos com a amplificação destinada ao polimorfismo rs12473815 do gene *FSHR*.

Figura 7 – Gel de agarose 1% com produtos da PCR do polimorfismo rs12473815 do gene *FSHR.*

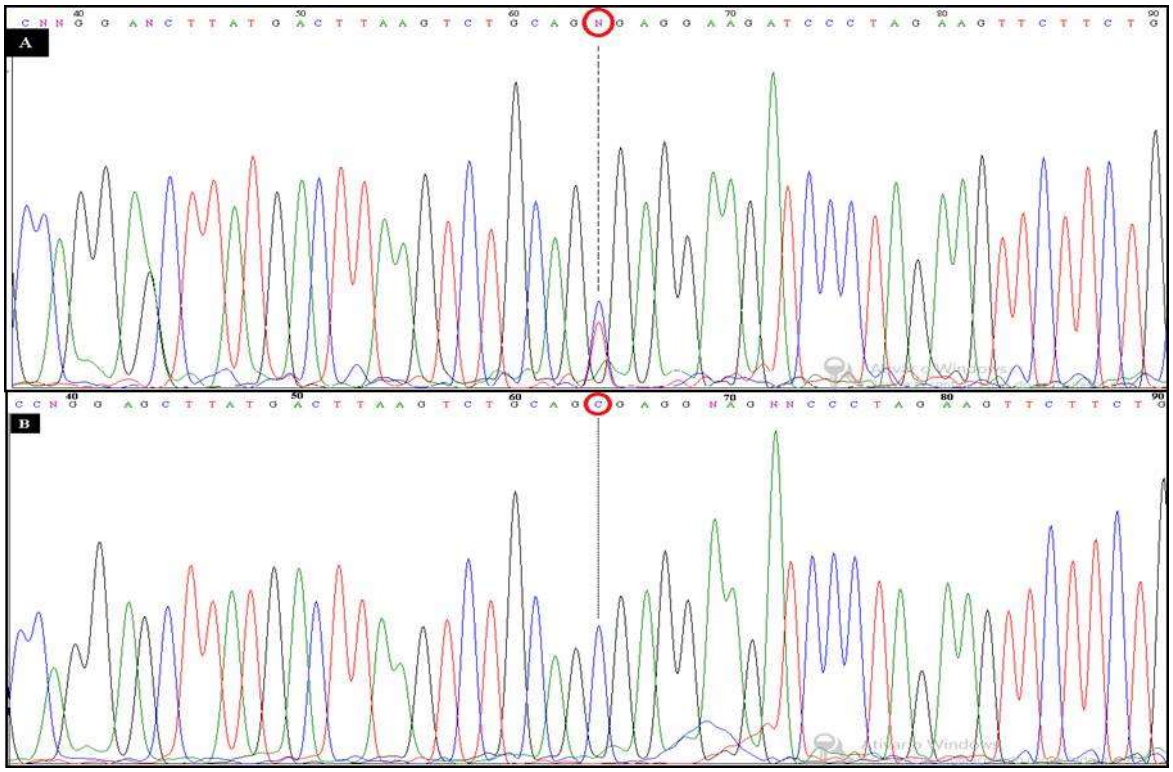



(1) Marcador de tamanho molecular (*Gene* Ruler® 100-bp Ladder, Fermentas, Ontario, Canada); (2-10) Participantes do estudo escolhidos aleatoriamente, demonstrando amplificação correta de segmento do gene *FSHR* na região do polimorfismo rs12473815; (11) Controle negativo da reação.
Fonte: Autoria própria.

Ao final, os amplicons selecionados foram submetidos ao sequenciamento bidirecional direto, com emprego do kit Big Dye® Terminator v3.1 em instrumento ABI Prism™ 377 DNA *Sequencer* (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA), no laboratório Genomic Engenharia Molecular Ltda. A figura 8 mostra dois exemplos de cromatogramas resultantes do sequenciamento de duas amostras de DNA após análise referente ao polimorfismo rs12473815. No primeiro cromatograma (A), identifica-se um paciente com uma mutação na região que identifica o polimorfismo

em estudo (linha tracejada). A presença de dois picos com cores distintas corresponde à presença de indivíduo heterozigoto C/T. O segundo cromatograma (B), por sua vez, reconhece-se um indivíduo homozigoto para o alelo selvagem C/C, por apresentar apenas um pico de coloração azul, que identifica a base citosina.

Figura 8 - Exemplos de cromatogramas obtidos por meio de sequenciamento de amostras de DNA após reação convencional de PCR para o polimorfismo rs12473815 do gene *FSHR*.




Fonte: Autoria própria.

### *4.5.2.3 Genotipagem*

O sistema *Taqman*® para PCR em Tempo Real (qPCR) foi empregado para a discriminação alélica das variantes genéticas em estudo. Nessa metodologia, aplicam-se conceitos básicos da PCR convencional.

A PCR ocorre, geralmente, em três etapas principais. Na primeira, chamada de desnaturação, a fita dupla de DNA é separada através do aquecimento da amostra a 94-95°C. Em seguida, na etapa chamada de anelamento, os iniciadores (*primers*) ligam-se à fita de DNA especificamente na região de interesse que define o polimorfismo. Na terceira e última etapa, denominada de extensão, a DNA

polimerase termoestável atua recrutando os deoxinucleotídeos e sintetizando uma nova fita de DNA complementar (EVANS, 2009).

Na tecnologia *TaqMan*®, além dos *primers senso* (*forward*) e antissenso (*reverse*), são adicionadas duas sondas, cada uma com especificidade para um dos alelos do SNP. Essas sondas apresentam, em sua estrutura, um fluoróforo emissor (*reporter*) na extremidade 5' e, na extremidade 3', um fluoróforo silenciador (*quencher*). Quando a sonda está intacta, a proximidade dos dois fluoróforos resulta na supressão da fluorescência do emissor. Na fase de anelamento da PCR, as sondas se ligam à sequência alvo com a qual apresentam total complementaridade. Posteriormente, durante a extensão, uma DNA polimerase com atividade 5´- 3´-exonucleásica hidrolisa as sondas, conduzindo à separação do *quencher* da molécula *repórter*, resultando num aumento proporcional da intensidade de fluorescência até sua detecção. A emissão dos fluoróforos fornece o genótipo do paciente. A emissão de apenas um tipo de fluorescência denota a ocorrência de homozigose, enquanto a emissão de ambas fluorescências ocorre em amostras de pacientes heterozigotos.

No presente estudo foram utilizados conjuntos de *primers* e sondas específicas para os SNPs de interesse, em condições universais de amplificação. Para o polimorfismo rs12473815 do gene *FSHR* foi utilizado o kit de identificação "C____228133_20" (Life Technologies, Carlsbad, EUA) e para o polimorfismo rs1942386 do gene *PGR,* o kit de identificação "C___3233794_10" (Life Technologies). A amplificação foi realizada em equipamento de qPCR modelo CFX-96 Touch (Bio-Rad, Hercules, EUA), também localizado no Laboratório de Biologia Molecular da UNIVILLE.

Na reação destinada à detecção das variantes de ambos os polimorfismos em estudo, empregaram-se sondas com dois tipos de fluoróforos *reporter*: VIC® e FAM®. No polimorfismo rs12473815, a sonda marcada com fluoróforo VIC® se hibridiza com o alelo selvagem C. Já o fluoróforo FAM® corresponde à sonda que se liga ao alelo de risco T. Para o polimorfismo rs1942836, a sonda VIC® se hibridiza com o alelo de risco C, enquanto a sonda FAM® se liga ao alelo selvagem T.

A preparação de cada reação foi realizada estimando volume total de 25 µL. De maneira geral, seguiu-se a seguinte proporção (Quadro 2):

Quadro 2 - Proporção dos reagentes para cada reação de qPCR para discriminação alélica dos polimorfismos rs12473815 do gene FSHR e rs1942836 do gene PGR.

| CONCENTRAÇÃO | REAGENTE | VOLUME |
|---|---|---|
| 2X | Taqman® Genotyping Master Mix | 12,5µL |
| 20X | TaqMan® SNP Genotyping Assays 4351379 (rs12473815) | 1,25 µL |
| ----- | $H_20$ DEPC (água tratada com Dietilpirocarbonato) | 11,25 µL |

A cada reação, empregaram-se como controles, amostras com genótipos conhecidos por sequenciamento. Dessa forma, pode-se certificar que o sistema qPCR para análise dos polimorfismos propostos era capaz de discriminar ambos os alelos. Como controle positivo, para cada polimorfismo estudado, selecionava-se amostra homozigota para o alelo selvagem. O controle negativo era composto por amostra homozigota para o alelo de risco. Em relação ao polimorfismo rs12473815 do gene *FSHR*, devido à falta de homozigotos T/T, empregou-se amostra heterozigota como controle negativo. Adicionalmente, de maneira a excluir a possibilidade de falsos resultados decorrentes de contaminação na qPCR, em uma reação substituiu-se a amostra de DNA por água. Em tais casos, denominados *non-template controls*, não se podia observar qualquer amplificação.

Após definição e preparo das reações, estas foram submetidas à programação de ciclagem descrita no quadro 3.

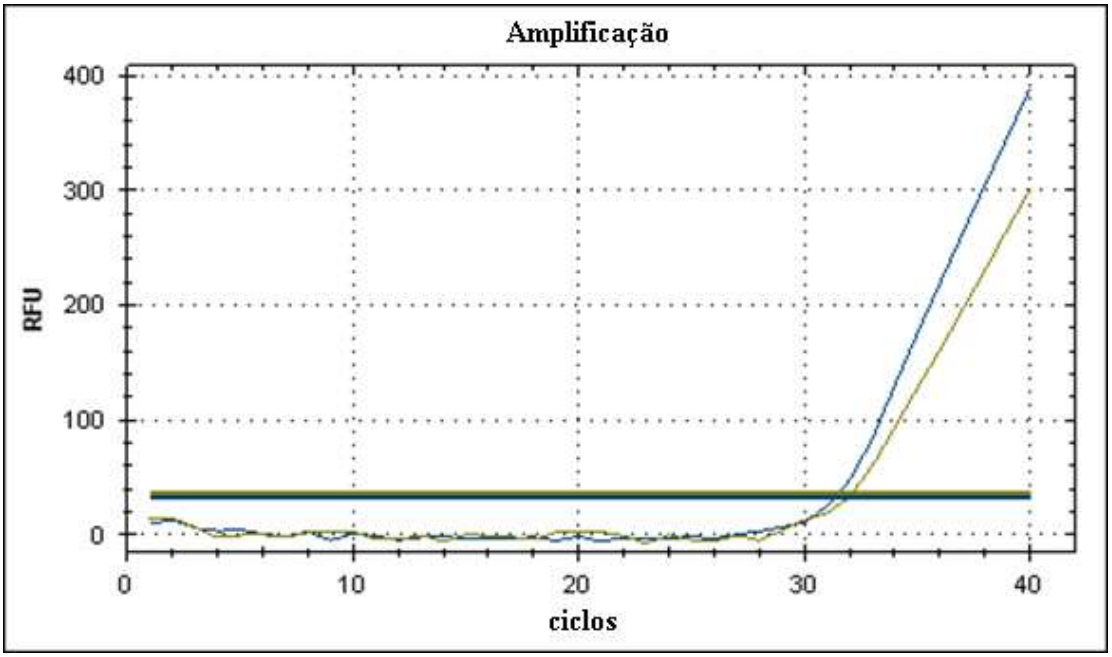
Quadro 3 - Tempos, temperaturas e ciclos da qPCR para discriminação alélica do polimorfismo rs12473815 do gene *FSHR* e rs1942836 do gene *PGR*.

| TEMPO | TEMPERATURA (°C) | NÚMERO DE CICLOS |
|---|---|---|
| 10 minutos | 95 | 1 |
| 15 segundos | 95 | Repetem-se por 39 ciclos |
| 1 minuto | 60 | |

O resultado das análises foi avaliado através de gráficos de discriminação alélica, construídos pelo próprio *software* do equipamento, que relacionavam as Unidades Relativas de Fluorescência (RFU) com o número de ciclos da reação. À

medida que ocorria a amplificação da sequência de interesse, gerava-se um sinal de fluorescência específico, permitindo identificar quais os alelos presentes em cada amostra. A figura 9 representa o gráfico de amplificação de uma paciente com genótipo heterozigoto submetida ao sistema *Taqman*® qPCR para o polimorfismo rs12473815 do gene *FSHR*. Observa-se a presença de um alelo C, amplificado e reconhecido por uma linha verde (resultado da ativação do fluoróforo VIC® de coloração verde), e de um alelo T (fluoróforo FAM® de coloração azul).

Figura 9 - Gráfico de amplificação por qPCR para o polimorfismo rs12473815 do gene FSHR, denotando paciente com genótipo heterozigoto.




Fonte: Autoria própria.

## 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados oriundos da aplicação dos questionários e das análises genéticas foram analisados descritivamente. A análise das variáveis quantitativas se deu através do cálculo de médias e desvios-padrão, enquanto das variáveis qualitativas, por meio de cálculo de frequências absolutas e relativas.

Inicialmente, foi avaliada a normalidade da distribuição dos dados utilizando-se o teste de Komolgorov-Smirnov. Ao se identificar a normalidade dos dados, aplicou-se o Teste T para a análise da hipótese de igualdade entre as médias geradas a partir da variável idade materna.

Para a comparação das proporções entre os dois grupos, realizou-se o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher quando necessário. Baseado nos resultados da análise univariada, foram construídos modelos de regressão logística para avaliar a sua associação com a prematuridade e ajustar as variáveis de confundimento. O intervalo de confiança (IC) estabelecido foi de 95%.

As frequências alélicas e genotípicas foram calculadas a partir de contagem direta e comparadas entre os grupos caso e controle através do teste exato de Fisher. A partir daí, testou-se a aderência dos dados ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A análise estatística proposta foi realizada empregando-se o Software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 21.0.

## 4.7 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE, conforme parecer 392.814.

As amostras de DNA foram utilizadas exclusivamente para os fins previstos no estudo e, portanto, não foram usadas para a investigação de doenças genéticas ou outras condições hereditárias. Foi solicitada no TCLE a autorização para armazenamento da amostra de DNA por até cinco anos com vistas à possível utilização em futuras pesquisas no mesmo campo do conhecimento.

À medida que as técnicas analíticas evoluem e outros segmentos gênicos são apontados como possíveis candidatos a novos marcadores moleculares associados à prematuridade, a disponibilidade de um banco de amostras e dados associados pode facilitar a implementação de novas pesquisas e obtenção de resultados em menor espaço de tempo. Portanto, ao término da pesquisa, as alíquotas residuais de DNA (se houver) serão mantidas por até cinco anos a -80°C no Biorrepositório respectivo e somente poderão ser usadas para fins diversos se associadas a novo projeto de pesquisa aprovado pelo Sistema CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) / CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) e após obtenção de anuência (reconsentimento) da gestante. O descarte da amostra, quando houver, será realizado em conformidade com as normas vigentes dos órgãos técnicos competentes e respeitando-se a confidencialidade e a autonomia dos participantes da pesquisa.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme as normas do Programa de Pós Graduação em Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE, este capítulo será apresentado na forma de artigo científico, encaminhado para publicação ao periódico “Cadernos de Saúde Pública”. O comprovante de submissão encontra-se no Anexo D.

**Fatores de risco associados à prematuridade**

***Risk factors associated with preterm birth***

***Factores de riesgo asociados con la prematuridad***


**Resumo**

Estudo retrospectivo caso-controle para investigar a associação entre fatores de risco sociodemográficos, comportamentais, biológicos, médicos e genéticos e a ocorrência da prematuridade. A avaliação dos fatores de risco se deu através da aplicação de questionários validados ou especificamente desenvolvidos e análise de dados em prontuário eletrônico. A técnica de PCR em Tempo Real foi utilizada para analisar a influência dos polimorfismos rs12473815 do gene *FSHR* e rs1942836 do gene *PGR*. Foram inclusas 157 gestantes (45 casos com gestação < 37 semanas e 112 controles com gestação >37 e ≤ 42 semanas). Observou-se associação entre o nascimento prematuro e ingestão alcoólica (p=0,01) quando o consumo ocorreu em duas ou mais ocasiões mensais (OR 1,7 [IC 95%: 1,1-4,6]). O baixo IMC pré-gestacional se mostrou preditor do nascimento prematuro espontâneo (OR 3,8 [IC 95%: 1,3-11,6]), enquanto o elevado IMC reduziu a sua probabilidade (OR 0,6 [IC 95%: 0,3-0,9]). Os genótipos CT (rs12473815) e TC e CC (rs1942836) mostraram-se associados a uma maior chance de desenvolver parto prematuro.



PALAVRAS CHAVE: nascimento prematuro; fatores de risco; polimorfismo de nucleotídeo único; receptores de progesterona; receptores do FSH.

**Abstract**

Case-control retrospective study to investigate the association between sociodemographic, behavioral, biological, medical, and genetic risk factors and the occurrence of prematurity. The evaluation of risk factors was performed through validated or specifically developed questionnaires and analysis of electronically recorded medical data. The Real Time PCR was employed to analyze the influence of polymorphisms rs12473815 at gene *FSHR* and rs1942836 at gene *PGR* on prematurity. One hundred and fifty-seven pregnant women were included (45 cases of women with <37 weeks of gestation and 112 controls with > 37 and ≤ 42 weeks of gestation). There was an association between preterm birth and alcohol intake (p = 0.01), when consumption occurred in two or more times per month (OR 1.7 [CI 95%: 1,1-4,6]). Low pre-pregnancy BMI was a predictor of spontaneous preterm birth (OR 3.8 [CI 95%: 1,3-11,6]), while high BMI reduced this likelihood (OR 0.6 [CI 95%: 0,3-0,9]). The genotypes CT (rs12473815) and TC and CC (rs1942836) were associated with a higher chance of developing premature birth.

**Key-words:** preterm birth; risk factors; single nucleotide polymorphism; progesterone receptors; follicle-stimulating hormone receptor.

**Resumen**

Estudio de casos y controles retrospectivo para investigar la asociación entre factores de riesgo sociodemográficos, comportamentales, biológicos, médicos y genéticos y la ocurrencia de la prematuridad. La evaluación de los factores de riesgo se hizo mediante la aplicación de cuestionarios validados o específicamente desarrollado y análisis de registros médicos. Se utilizó la PCR en tiempo real para analizar la influencia de los polimorfismos rs12473815 (*FSHR*) y rs1942836 (*PGR*). Se incluyeron 157 pacientes (45 casos de gestación <37 semanas y 112 controles com gestación > 37 y ≤ 42 semanas). Se observó una asociación entre el nacimiento prematuro y la ingesta de alcohol (p = 0,01) cuando el consumo se produjo en dos o más ocasiones al mes (OR 1,7 [IC 95%: 1,1-4,6]). El pre-embarazo IMC bajo mostró predictor de parto prematuro espontáneo (OR 3,8 [IC 95%: 1,3-11,6]), mientras que el pre-embarazo IMC alto reduce la probabilidad (OR 0,6 [IC 95%: 0,3-0,9]). Los genotipos CT (rs12473815) y TC y CC (rs1942836) se asociaron con una mayor probabilidad de desarrollar un parto prematuro.

**Palabras clave:** nacimiento prematuro; factores de riesgo; polimorfismo de nucleótido simple; receptores de progesterona; receptores de HFE.

## Introdução

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define como prematuro todo recém-nascido (RN) vivo oriundo de gestação inferior a 37 semanas [1]. De acordo com a semana gestacional em que ocorre o nascimento, os casos de prematuridade podem ser classificados em limítrofes (35ª-<37ª semana), moderados (32ª-<35ª semana), muito prematuros (28ª-<32ª semana) e extremos (<28ª semana) [2]. Além das possíveis complicações neurológicas, auditivas, respiratórias e infecciosas que acometem o RN, a prematuridade é também motivo de preocupação pelo seu alto impacto econômico [3].

De modo agravante, na maior parte dos países com dados confiáveis sobre a matéria, vem se percebendo um aumento nas taxas de ocorrência da prematuridade. Em 2010, 15 milhões de bebês nasceram prematuramente, sugerindo uma prevalência mundial de 11,1% [4]. Em 2005, esta prevalência era de 9,6% [1].

No Brasil, o cenário é semelhante. Estudos epidemiológicos mostram que a prevalência do nascimento prematuro vem aumentando desde 1990, alcançando taxas de até 15% em algumas cidades do sul e sudeste do país em 2004 [5]. Atualmente, o Brasil ocupa a décima posição no *ranking* dos países com maior número de casos estimados de prematuridade [4]. Em estudo nacional realizado por Lansky et al., observou-se que 81,7% dos óbitos neonatais entre 2011 e 2012 ocorreram com bebês nascidos prematuros [6]. A prematuridade em si correspondeu à principal causa de morte neonatal, aproximadamente em um terço dos casos [6]. Prevê-se que, até 2025, as taxas de prematuridade devam manter a mesma tendência de crescimento em alguns países da América Latina, Caribe e em outros já desenvolvidos [4].

Na tentativa de compreender e procurar reverter esse quadro, diversos pesquisadores se voltaram à identificação das causas do nascimento prematuro. Até o momento, mesmo com alguns resultados conflitantes, os fatores mais comumente estudados envolvem os aspectos comportamentais e sociodemográficos, as condições médicas prévias ou complicações da gravidez e, mais recentemente, certos fatores genéticos [3].

A determinação da prematuridade como resultado do processo evolutivo traz uma nova visão sobre o tema. Ao se comparar humanos com primatas semelhantes, identificou-se que houve ao longo do tempo, na nossa espécie, um aumento substancial do crânio (capaz de acomodar um cérebro maior e mais evoluído) e um estreitamento da bacia pélvica (apto a promover o bipedalismo), dificultando o trabalho de parto [7]. Tais constatações têm

impulsionado a investigação de possíveis associações entre variantes de genes acelerados e a ocorrência de prematuridade. Através da razão entre mutações sinônimas e não sinônimas, Plunkett et al. sugeriram que os genes *FSHR* e *PGR*, codificantes para os receptores do hormônio folículo estimulante e da progesterona, respectivamente, evoluíram de maneira acelerada na espécie humana, impactando sobre o encurtamento da gestação e a facilitação do processo do nascimento [7]. Até o momento, já se identificou associação significativa entre a prematuridade e os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs; *Single Nucleotide Polymorphism*) rs12473815 do gene *FSHR*, após estudos em populações maternas finlandesas e afro-americanas, e rs1942836 do gene *PGR* em populações norte-americana e argentina [7,8,9].

O objetivo do estudo foi investigar a associação de certas características maternas, tais como consumo de álcool, uso de tabaco, escolaridade, condição socioeconômica, índice de massa corporal (IMC) pré-gestacional, diabetes gestacional (DG), ocorrência de infecções durante a gestação e a presença das variantes de risco relativas aos SNPs rs12473815 e rs1942836, com o nascimento prematuro.

## Métodos

### Local e período do estudo

O estudo foi realizado na Maternidade Darcy Vargas (MDV), localizada na cidade de Joinville/SC. A instituição, referência no cuidado pré-natal e puerpério de pacientes de toda a região norte do estado oriundos do Sistema Único de Saúde (SUS), está afiliada à Rede Cegonha desde 2012, representando o primeiro estabelecimento do setor a pactuar com o programa em Santa Catarina.

A inclusão de pacientes e a coleta de dados ocorreram entre os meses de outubro de 2013 a outubro de 2014.

### Caracterização da população

Durante o período estipulado, 157 gestantes foram inclusas no estudo, sendo 45 (28,6%) com trabalho de parto prematuro (grupo “caso”) e 112 (71,4%) com trabalho de parto a termo (“controle”). Ambos os grupos apresentavam idade média equivalente, sendo 23,3 ± 4,0 anos para os casos e 23,3 ± 3,9 anos para os controles.

Foram inclusas, consecutivamente, gestantes primíparas entre 18 e 35 anos, atendidas na MDV com trabalho de parto espontâneo, resultando em RN único, vivo e sem malformações evidentes. Através da confirmação da idade gestacional por ultrassonografia, consideraram-se casos prematuros os partos ocorridos anteriormente à 37ª semana. Para o grupo de controles, incluíram-se partos ocorridos entre a 37ª e a 42ª semana de gestação.

Dados comportamentais, sociodemográficos, condições médicas prévias e complicações da gravidez

Após anuência da gestante, realizou-se entrevista individualizada durante o período de internação pós-parto, empregando questionário de pesquisa composto por instrumentos já validados e por perguntas especialmente elaboradas para o presente estudo, além de consulta ao prontuário médico respectivo. Todas as informações coletadas foram digitadas em banco de dados utilizando-se o programa *Epidata 3.1*®.

Para avaliar o consumo de álcool foi utilizado o instrumento AUDIT-C (*Alcohol Use Disorders Identification Test C*), que fornece uma medida contínua do padrão de ingestão alcoólica da gestante, aferida pela quantidade e frequência de uso. As qualidades psicométricas do questionário AUDIT-C já foram testadas para gestantes. Quando seus resultados são maiores ou iguais a três, identifica-se o consumo elevado de álcool com uma sensibilidade de 94,6% [10].

A obtenção dos dados socioeconômicos foi definida pelo Critério de Classificação Econômica Brasil (CCEB) da Associação Brasileira das Empresas de Pesquisa. Através do CCEB, atribui-se ao participante uma pontuação que o classifica em estratos econômicos A1, A2, B1, B2, C1, C2, D ou E [11]. Para a definição da escolaridade da gestante, empregaram-se as mesmas categorias contidas no CCEB.

Para as variáveis relacionadas ao tabagismo e à ocorrência de infecções durante a gestação elaboraram-se perguntas estruturadas, contendo questões fechadas dicotômicas ou de múltipla escolha, a partir de revisão bibliográfica pertinente. Em relação ao uso do tabaco, por não se dispor de um questionário padronizado e específico para população de gestantes, foram investigados os aspectos do tabagismo materno descritos em estudo realizado no extremo sul do Brasil [12].

Em relação ao IMC, optou-se pela coleta de informações autorreferidas, a fim de se evitar a realização de manobras extras para a medição da altura da gestante no pós-parto

possivelmente dolorosas ou incômodas. Para a captação dos dados relacionados ao DG foram utilizadas as informações contidas nos prontuários médicos.

Dados genéticos

Para as análises genéticas foram utilizadas alíquotas residuais de sangue total sem aditivo, coletado para realização do teste VDRL (*Veneral Disease Research Laboratory*) na admissão hospitalar. A extração do DNA seguiu as recomendações do kit "BIOPUR Kit de Extração Mini SPIN PLUS" (BIOPUR, Reinach, Suíça). Em seguida, realizou-se a discriminação alélica dos polimorfismos rs12473815 e rs1942836 através do sistema *Taqman*® para PCR em Tempo Real (qPCR) (Life Technologies, Carlsbad, EUA). Na reação empregaram-se sondas com dois tipos de fluoróforos *reporter*: VIC® e FAM®. A preparação de ambas as reações foi realizada estimando volume total de 25 µL, conforme a seguinte proporção: 100 ng de amostra de DNA, 12,5 µL de Taqman® Genotyping Master Mix (2X), 1,25 µL de TaqMan® SNP Genotyping Assay 4351379 (20X) e q.s.p. $dH_20$ DEPC (*Diethylpyrocarbonate*). As reações foram distribuídas em placa apropriada para leitura óptica (MicroAmp® Optical 96-well reaction plate) e levadas ao termociclador modelo CFX-96 Touch (Bio-Rad, Hercules, EUA). Utilizou-se a seguinte condição de termociclagem: 10 minutos a 95°C, seguido de 39 ciclos alternados de 15 segundos a 95°C e um minuto a 60°C. O resultado das análises foi avaliado através de gráficos de discriminação alélica, construídos pelo próprio *software* do equipamento, que relacionavam as Unidades Relativas de Fluorescência (RFU) com o número de ciclos da reação.

Análise estatística

Para a análise descritiva, foram realizadas as medidas de média, desvio-padrão e frequências absoluta e relativa. Inicialmente, foi avaliada a normalidade da distribuição dos dados utilizando-se o teste de Komolgorov-Smirnov. Ao identificá-la, aplicou-se o Teste T para a análise da hipótese de igualdade entre as médias geradas a partir da variável idade materna. As frequências alélicas e genotípicas foram calculadas a partir de contagem direta e comparadas entre os grupos caso e controle. A partir daí, testou-se a aderência dos dados ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para a comparação das proporções entre os dois grupos, realizou-se o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher quando necessário. Foram

construídos modelos de regressão logística para avaliar a associação dos fatores de risco estudados com a prematuridade e ajustar as variáveis de confundimento, entre elas tabagismo (ativo e passivo), etilismo, escolaridade, condição socioeconômica e IMC pré-gestacional. O intervalo de confiança (IC) estabelecido foi de 95% e significância quando $p<0,05$. A análise estatística foi realizada empregando-se o Software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 21.0.

Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade da Região de Joinville (parecer 392.814) e respeitou as normas contidas na Resolução CNS 466/2012 e complementares. A participação das gestantes se deu mediante assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido específico.

**Resultados**

Considerando-se a classificação da OMS, dentre os nascimentos do grupo "caso" foi possível observar uma maior prevalência de prematuridade limítrofe (35 casos; 77,8%), seguida de 4 casos de prematuros moderados (8,9%), 3 de muito prematuros (6,7%) e 1 de prematuridade extrema (2,2%). Em dois eventos de nascimento prematuro (4,4%), a idade gestacional não foi informada no prontuário eletrônico. No entanto, diante da importância das informações fornecidas pelas pacientes através da aplicação do questionário e do teste genético, optou-se por mantê-las no estudo.

Em relação à ocorrência de infecção microbiana durante a gestação, não se observou diferença significativa entre gestantes com parto prematuro (n=21; 46,7%) e a termo (n=49; 43,7%) ($p>0,05$). Dentre as participantes da pesquisa, cinco (3,2%) apresentavam DG. Destas, quatro pertenciam ao grupo controle e uma ao grupo caso ($p>0,05$). A escolaridade, os estratos de condição socioeconômica e o comportamento tabagista também não apresentaram influência sobre o desfecho na população estudada ($p>0,05$). Os resultados referentes à ingestão alcoólica e ao IMC pré-gestacional, entretanto, mostraram associação positiva com o nascimento prematuro (tabela 1).

Tabela 1 - Influência do tabagismo, da ingestão alcoólica e do IMC pré-gestacional sobre o nascimento prematuro.

| | Grupo | n (%) | OR (IC 95%) |
|---|---|---|---|
| **Tabagismo ativo** | Controle | 8 (7,1) | - |
| | Caso | 6 (13,3) | 2,7 (0,6-9,8) |
| **Tabagismo passivo** | Controle | 64 (57,1) | - |
| | Caso | 26 (57,7) | 1,0 (0,5-1,9) |
| **Consumo alcoólico mensal ≥ 2 vezes** | Controle | 40 (35,7) | - |
| | Caso | 21 (46,6) | 1,7 (1,1-4,6)[S] |
| **IMC Baixo peso (<18,5 kg/m²)** | Controle | 8 (7,1) | - |
| | Caso | 9 (20,0) | 3,8 (1,3-11,6)[S] |
| **IMC Excesso de peso (≥25,0 kg/m²)** | Controle | 34 (30,3) | - |
| | Caso | 11 (24,4) | 0,6 (0,3-0,9)[S] |

OR:*Odds ratio*. IC: Intervalo de Confiança. IMC: Índice de Massa Corporal. [S] Significância estatística.

O consumo de álcool se tornou relevante para o nascimento prematuro somente com a ingestão frequente de bebidas alcoólicas. Nos casos em que tal ingestão foi inferior a duas doses mensais, não se verificou resultado significativo. Adicionalmente, o teste AUDIT-C foi capaz de identificar a ingestão alcoólica excessiva como possível fator de risco para o nascimento prematuro. No grupo caso, a ocorrência de gestantes com pontuação ≥ 3 (17,8%) foi substancialmente superior à encontrada no grupo controle (6,3%) (p=0,03). Da mesma forma, o baixo IMC pré-gestacional (<18,5kg/m²) aumentou, nesse estudo, em 3,8 vezes a chance de se desenvolver um parto prematuro (IC 95%: 1,3-11,6). Em oposição, o excesso de peso pré-gestacional (IMC>25,0kg/m²) não apresentou associação positiva com a prematuridade.

Para a interpretação dos dados genéticos, três amostras foram excluídas da análise por apresentarem falha não identificável durante processo de extração de DNA ou resultados inconclusivos após qPCR. Dessa maneira, 154 amostras foram analisadas em relação aos polimorfismos genéticos rs12473815 (45 controles e 109 casos) e rs1942836 (44 casos e 110 controles). Ambos os grupos se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Quando comparadas as frequências genotípicas e alélicas de ambos os polimorfismos entre os dois grupos, não se evidenciaram diferenças significativas em relação a sua distribuição (tabela 2).

Tabela 2 - Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos rs12473815 do gene FSHR e rs1942836 do gene PGR.

| | Casos | Controles | P |
|---|---|---|---|
| ***FSHR*** | **45** | **109** | |
| **Genótipo** | | | |
| CC | 21 (46,7) | 43 (39,5) | - |
| CT | 24 (53,3) | 66 (60,5) | 0,41* |
| **Alelo** | | | |
| **C** | 66 (73,3) | 152 (69,7) | - |
| **T** | 24 (26,7) | 66 (30,3) | 0,46* |
| ***PGR*** | **44** | **110** | |
| **Genótipo** | | | |
| TT | 24 (54,5) | 73 (66,3) | - |
| TC | 16 (36,4) | 32 (29,1) | - |
| CC | 4 (9,1) | 5 (4,6) | 0,27** |
| **Alelo** | | | |
| **T** | 64 (72,7) | 178 (80,9) | - |
| **C** | 24 (27,3) | 42 (19,1) | 0,11* |

*FSHR*: Receptor do Hormônio Folículo Estimulante; *PGR*: Receptor de Progesterona; *Teste qui-quadrado; **Teste exato de Fisher.

Após análise multivariada para possíveis fatores confundidores, identificou-se que os genótipos TC e CC do SNP rs1942836 do gene *PGR* aumentaram em 1,4 (IC 95%: 1,1-1,9) e em 4,4 (IC 95%: 1,3-17,8) vezes as chances de se desenvolver parto prematuro, respectivamente. Em relação ao gene *FSHR*, não foram detectadas gestantes homozigotas para a variável de risco do SNP rs12473815. No entanto, observou-se que gestantes com o genótipo CT apresentaram chances 1,6 (IC 95%: 1,2-3,3) vezes maiores de apresentarem nascimento prematuro. Quando analisados os efeitos combinados de ambos os polimorfismos (rs12473815 e rs1942836) sobre o desfecho, foi observada uma maior ocorrência de prematuridade nas gestantes portadoras dos genótipos CT/TC (OR 2,0 [IC 95%: 1,1-3,2]) e CT/CC (OR 1,4 [IC 95%: 1,1-2,5]) (tabela 3).

Tabela 3 - Análise multivariada da ocorrência de prematuridade de acordo com a apresentação das variantes dos polimorfismos dos genes FSHR (rs12473815) e PGR (rs1942836).

| | Casos | OR Bruto (IC 95%) | OR Ajustado (IC 95%) |
|---|---|---|---|
| ***FSHR*** | | | |
| CC | 21 | 0,7 (0,4-1,2) | 0,6 (0,2-1,1) |
| CT | 24 | 0,8 (0,4-2,3) | 1,6 (1,2-3,3)[$] |
| ***PGR*** | | | |
| TT | 24 | 0,6 (0,3-1,3) | 0,7 (0,3-1,4) |
| TC | 16 | 1,1 (0,5-2,2) | 1,4 (1,1-1,9)[$] |
| CC | 4 | 3,8 (1,1-15,1) | 4,4 (1,3-17,8)[$] |
| ***FSHR e PGR*** | | | |
| CT x TC | 11 | 1,6 (0,7-3,8) | 2,0 (1,1-3,2)[$] |
| CT x CC | 1 | -* | -* |

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança; *FSHR*: Receptor do Hormônio Folículo Estimulante; *PGR*: Receptor de Progesterona. [$]Significância estatística. *Análise excluída devido ao baixo número amostral.

## Discussão

Diversos são os fatores de risco estudados em relação à prematuridade atualmente. Ainda que se observem discordâncias, há certo consenso sobre o papel de determinadas características maternas. Aspectos comportamentais, como o tabagismo e o etilismo, mostram-se extremamente importantes por serem passíveis de modificação [3]. Condições biológicas e médicas, tais como extremos do IMC pré-gestacional, ocorrência de infecções durante a gestação e presença de DG, são frequentemente associadas com o nascimento prematuro [13,14,15]. Por fim, a baixa escolaridade e o nível socioeconômico inferior maternos também parecem predispor a esse desfecho. Observa-se, geralmente, a coexistência de tais fatores sociodemográficos com os demais fatores de risco citados [16].

No estudo realizado, a ingestão alcoólica se mostrou um fator de risco com influência significativa sobre o desfecho analisado. Corroborando com estudos anteriores, percebeu-se que a baixa ou moderada ingestão de álcool pouco interfere no nascimento prematuro, uma vez que as frequências das pacientes abstêmias e com consumo mensal ocasional não apresentaram diferença significativa entre os grupos analisados. No entanto, quando a ingestão se tornou mais frequente, alcançando 2 ou mais ocasiões em um mês, foi possível perceber uma associação com a ocorrência de parto prematuro (OR 1,7 [IC 95%: 1,1-4,6]). Até o momento, a grande parte das publicações identificou a necessidade de ingestão de doses ainda maiores do que a relatada no presente estudo para aumentar o risco de ocorrência da prematuridade. Uma revisão sistemática com metanálise realizada em 2011, envolvendo 36

estudos, identificou que apenas o consumo a partir de três doses diárias (ou 36 g/dia) seria capaz de aumentar as chances de um parto prematuro (OR 1,23 [IC 95%: 1,05-1,44]) [17].

A influência do IMC pré-gestacional sobre a prematuridade foi encontrada em ambos os extremos. Ao se considerar o baixo peso (<18,5 kg/m²), percebeu-se um risco 3,8 vezes maior (IC 95%: 1,3-11,6) de se desenvolver parto prematuro do que em gestantes com valores superiores de IMC. Isso pode se dever a um estado de nutrição inadequado da gestante, com prováveis baixas concentrações de macro e micronutrientes na dieta, predispondo crescimento restrito do feto e maior ocorrência de infecções e inflamações por debilidades do sistema imunológico [13]. Enquanto 7,1% das gestantes do grupo controle pertenciam a essa faixa de IMC pré-gestacional, 22,2% detinham tal característica no grupo caso (p=0,01). Concomitantemente, o excesso de peso (>25kg/m²) apresentou efeito protetor em relação a esse mesmo desfecho (OR 0,6 [IC 95%: 0,3-0,9]). Isso se deve a um provável viés de seleção, relacionado aos próprios critérios de inclusão do estudo, que permitiam apenas a inserção de partos prematuros espontâneos. Sabe-se que os extremos inferiores do IMC estão geralmente associados a essa possibilidade clínica de nascimento prematuro. Os extremos superiores do IMC pré-gestacional (sobrepeso e obesidade) estão relacionados com o parto prematuro por RPM ou por indicação médica, ambas modalidades não admitidas no estudo [18]. Tal associação já foi verificada em coorte estadunidense ao se verificar associação entre IMC >30kg/m² e os nascimentos prematuros por indicação médica, com OR de 1,49 (IC 95%: 1,09-2,04) nas gestações entre a 34ª e 36ª semana e de 1,78 (IC 95%: 1,19-2,66), nas anteriores à 34ª semana gestacional [18].

Os outros fatores de risco comportamentais, sociodemográficos e médicos considerados inicialmente no estudo não apresentaram associação positiva com o nascimento prematuro, muito embora dados anteriores da literatura mostrem resultados contrários. Isso pode ter ocorrido pelo tamanho amostral inferior ao recomendado, diminuindo o poder do estudo e elevando a probabilidade de ocorrência de um erro tipo II.

Em relação ao tabagismo, no estudo proposto, mesmo não se encontrando associação significativa com a prematuridade, é possível observar dados interessantes. Analisando separadamente o grupo caso, encontrou-se uma prevalência de tabagistas de 15%. Dados de 2008 evidenciam que a prevalência de gestantes fumantes no Brasil correspondia a 7,7% das mulheres entre 15 a 49 anos [19]. Dessa forma, é possível perceber que há uma elevação considerável na taxa de gestantes tabagistas no local de estudo quando comparada com a média nacional. No Brasil, ainda se estima que 3,4% dos partos prematuros se devam ao

tabagismo[19]. Ainda, é importante salientar a elevada taxa de gestantes consideradas fumantes passivas. Embora não se tenha verificado associação com a prematuridade, em ambos os grupos a prevalência foi de aproximadamente 57%. Recentemente, Qiu et al. demonstraram associação positiva entre a inalação passiva do fumo e o nascimento prematuro, principalmente ao considerar os partos ocorridos com idade gestacional inferior a 32 semanas [20].

A prevalência de DG encontrada no estudo (3,3%) mostrou comportamento inverso ao apresentado pelo tabagismo. Segundos dados do Ministério da Saúde publicados em 2010, a taxa de prevalência de DG em mulheres com mais de 20 anos atendidas no Sistema Único de Saúde é de 7,6% [21]. Os dados locais, considerando pacientes atendidas na MDV durante o período de estudo não correspondem à metade do valor encontrado nacionalmente. É importante salientar que em estudo realizado por Gui et al. a associação entre o DG e a prematuridade somente ocorreu em casos severos [22]. A MDV, por contar com ambulatório especializado em diabetes e com programa específico para prevenção de prematuridade atribuída ao DG, pode ter apresentado número reduzido de casos de DG severo ou descompensado, impossibilitando a verificação de sua associação com o desfecho por um viés de seleção.

A falta de associação entre escolaridade e condição socioeconômica e a prematuridade pode se dar pela sua difícil mensuração [23]. Dolatian et al., em consonância com modelo exposto pela OMS, identificaram os fatores socioeconômicos como determinantes estruturais do parto prematuro, a partir dos quais emanam determinantes intermediários [16]. Segundo tal concepção, os determinantes estruturais pouco influenciam a condição de saúde da gestante, justificando a ausência de relação estatística desse fator de risco com o nascimento prematuro no presente estudo. No entanto, são capazes de influenciar outros aspectos comportamentais e psicossociais da gestante, os chamados determinantes intermediários. No estudo realizado, elevados níveis de consumo alcoólico e o baixo IMC pré-gestacional podem ser considerados determinantes intermediários dos fatores sociodemográficos, capazes de aumentar as chances de um parto prematuro.

Os resultados encontrados sobre o polimorfismo do gene *PGR* corroboram com dados de estudos anteriores. Em pesquisa realizada nos EUA, em 2007, também se identificou a associação da variante de risco do SNP rs1942836 com a prematuridade limítrofe (p=0,04) [8]. A frequência do alelo de risco C encontrada na população norte-americana (20%) [8] foi discretamente inferior à encontrada neste estudo (27,3%). De forma semelhante, estudo

argentino, publicado em 2013, também encontrou resultados significativos quando considerados nascimentos prematuros entre a 32ª e 36ª semana (p=0,0004) [9]. A influência dos genótipos TC e CC encontrada no presente estudo, entretanto, não se restringiu apenas aos casos limítrofes. A associação foi identificada ao se considerar todos os tipos prematuridade, envolvendo casos limítrofes a extremos [8].

Em relação ao SNP rs12473815 do gene *FSHR*, após análise multivariada, a presença do alelo de risco T em gestantes heterozigotas aumentou as chances de ocorrência de parto prematuro. Curiosamente, ao analisar dados da tabela 2, é possível observar que o genótipo CT foi mais frequente no grupo controle (60,5%) do que no grupo caso (53,3%). Isso se deve, possivelmente, à característica multifatorial da prematuridade. Hábitos comportamentais e condições sociodemográficas, biológicas e médicas favoráveis permitiram que gestantes, mesmo dispondo o genótipo de risco, apresentassem trabalho de parto a termo.

A influência do SNP rs12473815 já foi observado em população finlandesa e afro-americana. Em finlandesas, analisando um grupo de 165 casos e 163 controles, observou-se diferença entre as frequências genotípicas (p=0,002) e alélicas (p= 6,81 x $10^{-4}$) dos dois grupos [7]. Na população afro-americana, com 79 casos e 171 controles, também se observaram diferenças entre tais frequências (p=0,02 e p=0,003, respectivamente) [7].

A frequência do alelo de risco T reportada em gestantes finlandesas com parto prematuro foi de 41,7%, enquanto as pacientes com a mesma condição neste estudo alcançaram frequência de 26,7% [24]. Deve-se considerar que estas populações apresentam ancestralidade e características genéticas distintas. Enquanto a primeira apresenta marcada homogeneidade, a população brasileira detém, reconhecidamente, elevada miscigenação [25]. Tais distinções podem ser responsáveis pela ausência de genótipos homozigotos TT na população desta pesquisa.

Replicar estudos em diferentes centros populacionais constitui um grande desafio devido às disparidades raciais. Sabe-se que o tempo de duração de uma gestação e as taxas de prematuridade naturalmente podem variar de modo expressivo entre diferentes raças [26]. Estudo publicado em 2003, por exemplo, demonstra maior chance de ocorrência de parto prematuro em negras (OR=1,33 [IC 95%: 1,15-1,56]) e asiáticas (OR=1,45 [IC 95%: 1,33-1,56]), quando comparadas às gestantes brancas europeias, sugerindo que a maturação fetal em tais casos ocorre mais precocemente [26]. No Brasil, país de elevada miscigenação racial, é difícil estimar até que ponto tais características naturais interferem no desfecho da prematuridade.

Em relação à análise dos SNPs rs12473815 do gene *FHSR* e rs1942836 do gene *PGR*, é importante também considerar que suas indicações como fator relacionado com a prematuridade são recentes e que, portanto, poucos estudos foram realizados até o momento. Sabe-se, fisiologicamente, que a presença de FSHR e PGR na musculatura lisa do miométrio representa sua contribuição mais direta para o parto prematuro [27,28]. Ainda não se conhece o real efeito da variante de risco de ambos os polimorfismos em estudo sobre a expressão do *FSHR* e *PGR*, se o comprometimento é quantitativo (diminuição do número de receptores expressos), qualitativo (expressão de receptores com funcionalidade reduzida) ou se envolvem outros mecanismos de ação.

Considerando os aspectos multifatoriais que envolvem o nascimento prematuro, é possível reconhecer algumas limitações do estudo que possam ter inviabilizado a determinação de associação positiva entre alguns fatores de risco estudados e a prematuridade. Inicialmente, a entrevista das gestantes ocorreu após o parto, permitindo, através de um viés de memória, que algumas informações já não pudessem ser recordadas devidamente. Adicionalmente, existe a possibilidade de dados, principalmente de natureza comportamental, terem sido deliberadamente fornecidos de maneira errônea, configurando um possível viés devido a respostas falseadas. Admite-se, ainda, que os resultados alcançados estejam sob a influência de um número reduzido de gestantes provenientes de um único centro. O tamanho amostral obtido, inferior ao recomendado, leva à interpretação dos resultados com um intervalo de confiança equivalente de aproximadamente 80% ou com erro do tipo I máximo admitido de 7,7%. Tais parâmetros não configuram condições ideais para análise estatística dos dados.

Em conclusão, os resultados do estudo permitiram verificar a associação entre a ingestão frequente (2 ou mais doses por mês) de álcool com o nascimento prematuro. Gestantes com tal tipo de trabalho de parto apresentam comportamento de risco identificado pelo teste AUDIT-C. Ainda, mostrou-se relevante a associação do baixo IMC pré-gestacional (<18,5kg/m²). Inversamente, IMC >30kg/m² apresentou efeito protetor em relação ao parto prematuro espontâneo. A presença do genótipo CT do SNP rs12473815 do gene *FSHR* e dos genótipos TC e CC do SNP rs1942836 também aumentou o risco de ocorrência de parto prematuro. É importante considerar, entretanto, que a prematuridade apresenta reconhecidamente um caráter complexo e multifatorial, envolvendo diversos aspectos sociais, comportamentais e biológicos que, em estudos posteriores e complementares, poderão apresentar correlação com a prematuridade. Ao se conhecer a influência de certas

características maternas, auxilia-se no planejamento e na gestão da assistência à saúde integral da gestante e do RN.

**Colaboradores**

B.B. Hackbarth foi responsável pelo planejamento do estudo, coleta e construção do banco de dados, análise e interpretação de resultados e redação do manuscrito. P.H.C. França foi responsável pelo planejamento do estudo, construção do banco de dados, análise e interpretação dos resultados e revisão crítica do manuscrito. J.C. Silva contribuiu para o planejamento do estudo e revisão crítica do manuscrito. L.E. Ferreira foi responsável pela análise genética, interpretação dos resultados e revisão crítica do manuscrito. J.A. Ferreira e H.P. Carstens foram responsáveis pela construção de banco de dados e análise genética. A.R. Amaral foi responsável pela coleta e análise estatística de dados. M.R. Silva e B.S. Ferreira foram responsáveis pela coleta de dados.

**Financiamento.**
O estudo foi realizado com recursos do Fundo de Apoio à Pesquisa da Universidade da Região de Joinville (FAP/UNIVILLE) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**Conflito de interesses**.
Todos os autores declaram ausência de conflito de interesses em relação ao estudo.

## Referências


1.BECK S., WOJDYLA D, SAY L, BETRAN AP, MERIALDI M, REQUEJO, JH, et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. Bull World Health Organ 2010;88(1):31–8.

2.BLENCOWE H, COUSENS S, OESTERGAARD MZ, CHOU D, MOLLER AB, NARWAL R, et al. 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;379:2162-72.

3.BEHRMAN RE, BUTLER AS. Preterm Birth: Causes, Consequences and Prevention. Washington (DC): National Academies Press; 2007.

4.ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth. Geneva: (WHO); 2012.

5.SILVEIRA MF, SANTOS IS, BARROS AJD, MATIJASEVICH A, BARROS FC, VICTORA CG. Aumento da prematuridade no Brasil : revisão de estudos de base populacional. Revi Saúde Pública 2008;42(5):957–64.

6. LANSKY S, FRICHE AAL, SILVA AAM, CAMPOS D, BITTENCOURT SDA, CARVALHO ML, FRIAS PG, et al. Pesquisa Nascer no Brasil: perfil da mortalidade neonatal e avaliação da assistência à gestante e ao recém-nascido. Cad Saúde Pública 2014;30:192-207.

7.PLUNKETT J, DONIGER S, ORABONA G, MORGAN T, HAATAJA R, HALLMAN, et al. An evolutionary genomic approach to identify genes involved in human birth timing. PLoS Genet 2011;7(4):1–10.

8.EHN NL, COOPER ME, ORR K, SHI M, JOHNSON MK, CAPRAU D, et al. Evaluation of fetal and maternal genetic variation in the progesterone receptor gene for contributions to preterm birth. Pediatr Res 2007;62(5):630–5.

9.MANN PC, COOPER ME, RYCKMAN KK, COMAS B, GILI J, CRUMLEY S, et al. Genetic influences on preterm birth in Argentina. J Perinatol 2013;33(5):336-40.

10.DAWSON DA, GRANT BF, STINSON FS, ZHOU Y. Effectiveness of the Derived Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT-C) in Screening for alcohol use disorders and risk drinking in the US general population. Alcohol Clin Exp Res 2005;29(5):844-54.

11.ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE PESQUISA. Adoção do CCEB 2008: Critério de Classificação Econômica Brasil. São Paulo: (ABEP); 2008.

12.ZHANG L, GONZÁLEZ-CHICA DA, CESAR JA, MENDOZA-SASSI RA, BESKOW B, LARENTIS N, et al. Tabagismo materno durante a gestação e medidas antropométricas do recém-nascido: um estudo de base populacional no extremo sul do Brasil. Cad Saúde Pública 2011;27(9):1768–76.

13.LYNCH AM, HART JE, AGWU OC, FISHER BM, WEST NA, GIBBS RA. Association of extremes of prepregnancy BMI with the clinical presentations of preterm birth. Am J Obstet Gynecol 2014;210(5):1-9.

14.GILBERT NM, O'BRIEN VP, HULTGREN S, MACONES G, LEWIS WG, LEWIS AL. Urinary tract infection as a preventable cause of pregnancy complications: opportunities, challenges, and a global call to action. Glob Adv Health Med 2013;2(5):59-69.

15.BENER A, SALEH NM, AL-HAMAQ A. Prevalence of gestational diabetes and associated maternal and neonatal complications in a fast-developing community: global comparisons. Int J Womens Health 2011;3:367-73. 2011.

16.DOLATIAN M, MIRABZADEH A, FOROUZAN AS, SAJJADI H, MAJD HA, MOAFI F. Preterm delivery and psycho-social determinants of health based on World Health Organization model in Iran: a narrative review. Glob J Health Sci 2013;5(1):52-64.

17.PATRA J, BAKKER R, IRVING H, JADDOE VWV, MALINI S, REHM J. Dose-response relationship between alcohol consumption before and during pregnancy and the risks of low birthweight, preterm birth and small for gestational age (SGA) – a systematic review and meta-analyses. BJOG 2011;118(12):1411-1421.

18.PARKER MG, OUYANG F, PEARSON C, GILMAN MW, BELFORT MB, HONG X, et al. Prepregnancy body mass index and risk of preterm birth: association heterogeneity by preterm subgroups. BMC Pregnancy Childbirth 2014;153(14):1-10.

19. LEVY D, JIANG M, SZKLO A, ALMEIDA LM, AUTRAN M, BLOCH M. Smoking and adverse maternal and child health outcomes in Brazil. Nicotine Tob Res 2013;15(11):1797-1804.

20.QIU J, HE X, CUI H, ZHANG C, ZHANG H, DANG Y, et al. Passive smoking and preterm birth in urban China. Am J Epidemiol 2014;180(1):94-102.

21.BRASIL. Gestação de Alto Risco: Manual Técnico. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas; 2010. 5 ed.

22.GUI J, LI A, SU X, FENG L. Association between hyperglycemia in middle and late pregnancy and maternal-fetal outcomes: a retrospective study. BMC Pregnancy Childbirth 2014;14(34):1-7.

23.NIEDHAMMER I, MURRIN C, O'MAHONY D, DALY S, MORRISON JJ, KELLEHER CC, et al. Explanations for social inequalities in preterm delivery in the prospective Lifeways Cohort in the Republic of Ireland. Eur J Public Health 2011;22(4):533-38.

24.CHUN S, PLUNKETT J, TERAMO K, MUGLIA LJ, FAY JC. Fine-mapping association of *FSHR* with preterm birth in a finnish population. PLoS One 2013;8(10):1-10.

25.PENA SDJ, BASTOS-RODRIGUES L, PIMENTA JR, BYDLOWSKI SP. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. Braz J Med Biol Res 2009;42(10):870-6.

26.PATEL RR, STEER P, DOYLE P, LITTLE MP, ELLIOTT P. Does gestation vary by ethnic group? A London-based study over 122.000 pregnancies with spontaneous onset of labor. Int J Epidemiol 2003;33:107-13.

27.STILLEY JAW, CHRISTENSEN DE, DAHLEM KB, GUAN R, SANTILLAN DA, ENGLAND SK, et al. FSH receptor (FSHR) expression in human extra-gonadal reproductive tissues and the developing placenta, and the impact of its deletion on pregnancy in mice. Biol Reprod 2014; 91(3):1-15.

28.DODD JM, CROWTHER CA. The role of progesterone in prevention of preterm birth. Int J Womens Health 2010;1:73–84.

# 6 CONCLUSÃO

No presente estudo investigou-se a associação entre fatores de risco genéticos, sociodemográficos, comportamentais, biológicos e médicos e a ocorrência da prematuridade em gestantes atendidas na MDV em Joinville/SC, observando-se os seguintes tópicos após conclusão desta análise:

- Encontrou-se associação entre a presença do genótipo CT do polimorfismo rs12473815 do gene *FSHR* e dos genótipos TC e CC do polimorfismo rs1942836 do gene *PGR* e a ocorrência de prematuridade. Quando analisados os efeitos combinados de ambos os polimorfismos (rs12473815 e rs1942836) sobre o desfecho, foi observada uma maior ocorrência de prematuridade nas gestantes portadoras dos genótipos CT/TC.
- Em relação ao polimorfismo rs12473815, no grupo caso, verificou-se frequência dos alelos C e T de 73,3% e 26,7%, respectivamente. No grupo controle, a frequência do alelo C foi de 69,7% e a do alelo T de 30,3%. Os genótipos CC e CT no grupo caso corresponderam a 46,7% e 53,3% das gestantes, enquanto no grupo controle foram observados em 39,5% e 60,5%, respectivamente. Em ambos os grupos não se observou paciente homozigoto TT. Em relação ao polimorfismo rs1942836, a frequência dos alelos T e C foram de 72,7% e 27,3% no grupo caso e de 80,9% e 19,1% nos controles, respectivamente. Em relação aos genótipos TT, TC e CC, identificaram-se frequências de 54,5%, 36,4% e 9,1% nas gestantes com parto prematuro e de 66,3%, 29,1% e 4,6% no grupo de gestantes com parto a termo.
- Dentre os outros fatores de risco analisados no estudo, a ingestão de álcool e o baixo IMC pré-gestacional apresentaram efeito sobre o nascimento prematuro. Inversamente, elevado IMC demonstrou efeito protetor sobre o desfecho.
- Devido ao limitado tamanho amostral alcançado, não foi possível a estratificação dos casos de prematuridade em limítrofes, moderados, muito prematuros e extremos e sua análise isolada com os fatores de risco estudados.

## REFERÊNCIAS


ADAMS, E.K.; MILLER, V.P.; ERNST, C. et al. Neonatal health care costs related to smoking during pregnancy. **Health Economics**, v. 11, p. 193-206, 2002.

ALIYU, M.H.; LYNCH, O.; BELOGOLOVKIN, V. et al. Maternal alcohol use and medically indicated vs. spontaneous preterm birth outcomes: a population-based study. **European Journal of Public Health**, v.20, n.5, p.582-7, 2010.

ALLEN, C.M. FOUNDS, S.A. Genetics and preterm birth. **Journal of Obstetric, Gynecologic and Neonatal Nursing**, v.42, p.730-6, 2013.

ANNELLS, M.F.; HART, P.H.; MULLIGHAN, C.G. et al. Interleukins-1, -4, -6, -10, tumor necrosis factor, transforming growth factor-beta, FAS, and mannose-binding protein C gene polymorphisms in Australian women: Risk of preterm birth. **American** J**ournal of Obstetrics and Gynecology**, v. 191, n. 6, p. 2056–67, 2004.

ANTUNES, J.L.F. Condições socioeconômicas em saúde: discussão de dois paradigmas. **Revista de Saúde Pública**,n. 42, n.3, p.1-6, 2008.

ANUM, E.A.; SPRINGEL, E.H.; SHRIVER, M.D. et al. Genetic contributions to disparity in preterm birth. **Pediatric Research**, v.65, n.1, p.1-9, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE PESQUISA (ABEP). Adoção do CCEB 2008: Critério de Classificação Econômica Brasil. São Paulo: ABEP; 2008.

BARROS, D.C. **O consumo alimentar de gestantes adolescentes no Município do Rio de Janeiro.** 2002. Dissertação de mestrado, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2002.

BECK, S.; WOJDYLA, D.; SAY, L. et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 88, n. 1, p. 31–8, 2010.

BEEN, J.V.; NURMATOV, U.B.; COX, B. et al. Effect of smoke-free legislation on perinatal and child health: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v.383, n.9928, p.1549-60, 2014.

BEHRMAN, R.E.; BUTLER, A.S. **Preterm Birth: Causes, Consequences and Prevention.** Washington (DC): National Academies Press; 2007.

BENER, A.; SALEH, N.M.; AL-HAMAQ, A. Prevalence of gestational diabetes and associated maternal and neonatal complications in a fast-developing community: global comparisons. **International Journal of Women's Health**, v.3, p.367-73. 2011.

BETTIOL, H.; BARBIERI, M.A.; SILVA, A.A.M. Epidemiologia do nascimento pré-termo: tendências atuais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 2, p. 57–60, 2010.

BILANO, V.L.; OTA, E.; GANCHIMEG, T et al. Risk factors of pre-eclampsia/eclampsia and its adverse outcomes in low- and middle-income countries: a WHO secondary analysis. **Plos One**, v.9, n.3, p.1-9, 2014.

BLENCOWE, H.; COUSENS, S.; OESTERGAARD, M.Z. et al. 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. **The Lancet,** v.379, p.2162-72, 2012.

BOYD, H.A.; POULSEN, G.; WOHLFAHRT, J. et al. Maternal contributions to preterm delivery. **American Journal of Epidemiology**, v.170, n.11, p. 1358-64, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Gestação de Alto Risco: Manual Técnico.** 5 ed. Brasilia: Ministério da Saúde, 2010.

CARTER-POKRAS, O.; BAQUET, C. What is a “health disparity”? **Public Health Reports**, v.117, p.426-434, 2002.

CASCAES, A. M.; GAUCHE, H.; BARAMARCHI, F. M. et al. Prematuridade e fatores associados no Estado de Santa Catarina , Brasil , no ano de 2005 : análise dos dados do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 5, p. 1024–1032, 2008.

CASTELL, E.C.; RIZO-BAEZA, M.M.; CORDERO, M.J.A. et al. Maternal age risk factor of prematurity in Spain; Mediterranean area. **Nutrición Hospitalaria**, v.28, n.5, p.1536-40, 2013.

CASTRO, G.G. Caracterização das crianças prematuras nascidas na cidade de Patrocínio/MG, no ano de 2004: uma contribuição da fisioterapia para o Programa Saúde da Criança. 2005. Dissertação de mestrado, Universidade de Franca, São Paulo, 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. CDC Health Disparities and Inequalities Report - United States, 2013. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.62, n.3, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Smoking during pregnancy - United States 1990-2002. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.53, n.39, 2004.

CHALLIS, J. R. G.; SLOBODA, D. M.; ALFAIDY, N. et al. Prostaglandins and mechanisms of preterm birth. **Reproduction**, v. 124, p. 1–17, 2002.

CHENG, Y.K.; CHENG, S.F.; LI, H.C. et al. No increased risk of adverse pregnancy outcomes in woman with urinary tract infections: a nationwide population-based study. **Acta Obstetricia et Gynecologica**, v.89, n.7, 882-8, 2010.

CHIABI, A.; MAH, E.M.; MVONDO, N. et al. Risk factor for premature births: a cross-sectional analysis of hospital records in a Cameroonian health facility. **African Journal of Reproductive Health**, v. 14, n.4, p.77-83, 2013.

COHEN, W.R. Does maternal age affect pregnancy outcome? **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v.121, p.252-254, 2014.

CONNEELY, O.M.; LYDON, J.P. Progesterone recpetors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. **Steroids**, v.65, p.571-7, 2000.

CONNEELY, O.M.; MULAC-JERICEVIC, B.; DEMAYO, F. Reproductive functions of progesterone receptors. **Recent Progress in Hormone Research**, v.57, p.339-55, 2002.

COOPER, D.L.; PETHERICK, E.S.; WRIGHT, J. The association between binge drinking and birth outcomes: results from the Born in Bradford cohort study. **Journal of Epidemiology and Community Health**, n.10, p.821-8, 2013.

DAWSON, D.A.; GRANT, B.F.; STINSON, F.S.; ZHOU, Y. Effectiveness of the Derived Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT-C) in Screening for alcohol use disorders and risk drinking in the US general population. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.29, n.5, p.844-854, 2005.

DIETZ, P.M.; ENGLAND, L.J.; SHAPIRO-MENDOZA, C.K. et al. Infant morbidity and mortality attributable to prenatal smoking in the U.S. **American Journal of Preventive Medicine**. v.39, n.1, p.45-52, 2010.

DOLATIAN, M.; MIRABZADEH, A.; FOROUZAN, A.S. et al. Preterm delivery and psycho-social determinants of health based on World Health Organization model in Iran: a narrative review. **Global Journal of Health Science**, v.5, n.1, p.52-64, 2013.

DODD, J.; CROWTHER, C. The role of progesterone in prevention of preterm birth. **International Journal of Women's Health**, v. 1, p. 73–84, 2010.

EHN, N. L.; COOPER, M. E.; ORR, K. et al. Evaluation of fetal and maternal genetic variation in the progesterone receptor gene for contributions to preterm birth. **Pediatric Research**, v. 62, n. 5, p. 630–5, 2007.

EVANS, M.F. The polymerase chain reaction and pathology practice. Diagnostic Histopathology. v. 15, n. 7, p. 344-356, 2009.

FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **Oncologia Molecular.** São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

GALINSKY, R.; POLGLASE, G.R.; HOOPER, S.B. et al. The Consequences of chorioamnionitis: preterm birth and effects on development. **Journal of Pregnancy**, p.1-11, 2013.

GILBERT, N.M.; O'BRIEN, V.P.; HULTGREN, S. et al. Urinary tract infection as a preventable cause of pregnancy complications: opportunities, challenges, and a

global call to action. **Global Advances in Health and Medicine Journal**, v.2, n.5, p.59-69, 2013.

GIRI, A.; SRIVASTAV, V.R.; SUWAL, A. et al. Advanced maternal age and obstetric outcome. **Nepal Medical College Journal**, v.15, n.2, p.87-90, 2012.

GOLINO, P. S.; BETHÂNIA, M.; BRITO, L. M. O. Ruptura Prematura de Membranas: Fisiopatologia , Diagnóstico e Conduta. **Femina**, v. 34, n. 10, p. 711–717, 2006.

GRAHAM, J.D.; CLARKE, C.L. Physiolocial action of progesterone in target tissues. **Endocrine Reviews**, v.18, n.4, p.1-18, 1997.

GREEN, N. S.; DAMUS, K.; SIMPSON, J. L. et al. Research agenda for preterm birth: recommendations from the March of Dimes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 193, n. 3 Pt 1, p. 626–35, 2005.

GUI, J.; LI, A.; SU, X. Association between hyperglycemia in middle and late pregnancy and maternal-fetal outcomes: a retrospective study. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v.14, n.34, p. 1-7, 2014.

GWIN, K.M.; SCHRADER, R.; PETERS, K. et al. An exploratory studyof the variables impacting preterm birth. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v.12, n.53, p.1-8, 2012.

HARRIS, J.; SHEINER, E. Does an upper respiratory tract infection during pregnancy affect perinatal outcomes? A literature review. **Current Infectious Disease Report**, v.15, p.143-7, 2013.

HASCALIK, S.; CELIK, O.; TAGLUK, M. E. et al. Effects of highly purified urinary FSH and human menopausal FSH on uterine myoelectrical dynamics. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 200–6, 2010.

HOLLEGAARD, M. V.; GROVE, J.; THORSEN, P. et al. Polymorphisms in the tumor necrosis factor alpha and interleukin 1-beta promoters with possible gene regulatory functions increase the risk of preterm birth. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 87, n. 12, p. 1285–90, 2008.

HSIEH, T.T.; LIOU, J.D.; HSU, J.J. et al. Advanced maternal age and adverse perinatal outcomes in an Asian population. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.148, p.21-26, 2010.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. Objetivos de Desenvolvimento do Milênio: Relatório Nacional de Acompanhamento. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada e Secretaria de Planejamento e Investimentos Estratégicos; supervisão: Grupo Técnico para o acompanhamento dos ODM. - Brasília : Ipea : MP, SPI, 2014.

KIM, C.J.; ROMERO, R.; KUSANOVIC, J.P. et al. The frequency, clinical significance, and pathological features of chronic chorioamnionitis: a lesion associated with spontaneous preterm birth. **Modern Pathology**, v.23, n.7, p.1000-11, 2010.

KO, T.J.; TSAI, L.Y.; CHI, L.C. et al. Parental smoking during pregnancy and its association with low birth weight, small for gestational age, and preterm birth offspring: a birth cohort study. **Pediatrics and Neonatology**, v.55, n.1, p.20-7, 2014.

KOSA, J.L.; GUENDELMAN, S.; PEARL, M. et al. The association between pre-pregnancy BMI in a diverse southern California population of working woman. **Maternal and Child Health Journal**, v.15, p.772-81, 2011.

LAOPAIBOON, M.; LUMBIGANON, P.; INTARUT, N. Advanced maternal age and pregnancy outcomes: a multicountry assesment. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v.121, supl.1, p.49-59, 2014.

LEAL, M.C.; GAMA, S.G.N. Nascer no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.30, supl.1, 2014.

LEE, S.M.; PARK, J.W.; KIM, B.J. Acute histologic chorioamnionitis is a risk factor ofr adverse neonatal outcome in late preterm birth after preterm premature rupture of membranes. **Plos One**, v.8, n.12, p.1-6, 2013.

LEVY, D.; JIANG, M.; SZKLO, A. et al. Smoking and adverse maternal and child health outcomes in Brazil. **Nicotine & Tobacco Research**, v.15, n.11, p.1797-1804, 2013.

LIMA, L.M. **EMBRAPA Algodão.** Documentos, 191. Conceitos básicos de técnicas em biologia molecular. Campina Grande, 2008.

LUNDSBERG, L.S.; ILLUZZI, J.L.; BELANGER, K. et al. Low-to-moderate prenatal alcohol consumption and the risk of selected birth outcomes: a prospective cohort study. **Annals Of Epidemiology**, v. 25, p. 46-54, 2015 [*epub ahead of print]*.

LYNCH, A.M.; HART, J.E.; AGWU, O.C. et al. Association of extremes of prepregnancy BMI with the clinical presentations of preterm birth. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v.210, n.5, p. 1-9, 2014.

MANN, P.C.; COOPER, M.E.; RYCKMAN, K.K. et al. Genetic influences on preterm birth in Argentina. **Journal of Perinatology**, v.33, n.5, p.336-40, 2013.

MANNS-JAMES, L. Bacterial vaginosis and preterm birth. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v.56, n.6, p.575-583, 2011.

MARTIN, J.A.; KIRMEYER, S.; OSTERMAN, M. et al. Born a bit too early: recent trends in late preterm births. **NCHS Data Brief**, n.24, p.1-8, 2009.

MATIJASEVICH, A.; SILVEIRA, M.F.; MATOS, A.C.G et al. Estimativas corrigidas da prevalência de nascimentos pré-termo no Brasil, 2000 a 2011. **Epidemiologia e Serviços da Saúde**, v.22, n.4, p.557-64, 2013.

MAZOR-DRAY, E.; LEVY, A.; SCHLAEFFER, F. et al. Maternal urinary tract infection: is it independently associated with adverse pregnancy outcome? **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v.22, n.2, p.124-8, 2009.

McCARTHY, F.P.; O'KEEFFE, L.M.; KASHAN, A.S. et al. Association between maternal alcohol consumption in early pregnancy and pregnancy outcomes. **Obstetrics and Ginecology**, v.122, n.4, p.830-7, 2013.

MIRABZADEH, A.; DOLATIAN, M.; FOROUZAN, A.S. et al. Path analysis association between perceived social support, stressful life events and other psychosocial risk factors during pregnancy and preterm delivery. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v.15, n.6, p.507-14, 2013.

MENDES, I.; CARVALHO, M. DE; ALMEIDA, R. T.; MOREIRA, M. E. Use of technology as an evaluation tool of clinical care in preterm newborns. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. 371–6, 2006.

MORKEN, N.H.; GUNNES, N.; MAGNUS, P. et al. Risk of spontaneous preterm delivery in a low-risk population: the impact of maternal febrile episodes, urinary tract infection, pneumonia and ear-nose-throat infections. **European Journal of Obstetrcis & Gynecology and Reproductive Biology**, v.159, p.310-4, 2011.

MOURA, E.; MATTAR, R.; SOUZA, E. et al. Inflammatory cytokine gene polymorphisms and spontaneous preterm birth. **Journal of reproductive immunology**, v. 80, n. 1-2, p. 115–21, 2009.

MOUTQUIN, J. Classification and heterogeneity of preterm birth. **BJOG: Na International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 110, p. 30–33, 2003.

MULAC-JERICEVIC, B.; CONNEELY, O.M. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. **Reproduction**, v.128, p.139-146,2004.

NIEDHAMMER, I.; MURRIN, C.; O'MAHONY, D. et al. Explanations for social inequalities in preterm delivery in the prospective Lifeways Cohort in the Republic of Ireland. **European Journal of Public Health**, v.22, n.4, p.533-538, 2011.

NUNES, M.F.P.; PINHEIRO, S.M.C.; MEDRADO, F.E.R. et al. Estimating gestational age and its relation to the anthropometric status of newborns: a sutdy comparing the Capurro and ultrasound methods with last menstrual period. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v.11, n.1, p.51-60, 2011.

NYARKO, K.A.; LÓPEZ-CAMELO, J.; CASTILLA, E.E. Explicación de las disparidades raciales en la salud neonatal en Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.35, n.4, p.305-16, 2014.

OLIVEIRA, A.F.; GADELHA, A.M.J.; LEAL, M.C. et al. Estudo da validação das informações de peso e altura em gestantes atendidas em maternidades municipais no Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, supl.1, p.92-100, 2004.

OLSON, D.M.; MIJOVIC, J.E.; SADOWSKY, D.W. Control of human parturition. **Seminars in Perinatology,** v.19, n.1, p.52-63, 1995.

ONO, Y.; TAKAGI, K.; SEKI, H. et al. Neonatal outcome in infants of chronically hypertensive mothers. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 39, n.6, p.1142-6, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth**. 2012.

PARKER, M.G.; OUYANG, F.; PEARSON, C. et al. Prepregnancy body mass index and risk of preterm birth: association heterogeneity by preterm subgroups. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v.153, n.14, p.1-10, 2014.

PATRA, J.; BAKKER, R.; IRVING, H. et al. Dose-response relationship between alcohol consumption before and during pregnancy and the risks of low birthweight, preterm birth and small for gestational age (SGA) – a systematic review and meta-analyses. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology,** v.118, n.12, p.1411-1421, 2011.

PEIXOTO, M.R.G.; BENICIO, M.H.D.; JARDIM, P.C.B.V. Validade do peso e da altura auto-referidos: o estudo de Goiânia. **Revista de Saúde Pública**, v.40, n.6, p.1065-72, 2006.

PFINDER, M.; KUNST, A.E.; FELDMANN, R.; EIJSDEN, M.; VRIJKOTTE, T.G.M. Preterm birth and small for gestational age in relation to alcohol consumption during pregnancy: stronger associations among vulnerable women? Results from two large Western-European studies. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v.49, n.13, p.1-10, 2013.

PLUNKETT, J.; DONIGER, S.; ORABONA, G. et al. An evolutionary genomic approach to identify genes involved in human birth timing. **PLoS genetics**, v. 7, n. 4, p. 1–10, 2011.

QIU,J.; HE, X.; CUI, H. et al. Passive smoking and preterm birth in urban China. **American Journal of Epidemiology**, v.180, n.1, p.94-102, 2014.

RENZO, G.C. et al. Guidelines for the management of spontaneous preterm labor. **Journal of Perinatal Medicine**, v.34, n.5, p.359-66, 2006.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the www for the general users and for biologist programmers. In: KRAVETZ, S.; MISENER, S. (eds.) **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.** Humana Press, Totowa, NJ, p. 365-386, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. ***Molecular Cloning:*** *a laboratory manual.* New York: CHS Press, 2001.

SCHAAF, J.M.; MOL, B.W.L.; ABU-HANNA, A. et al. Ethnic disparities in the risk of adverse neonatal outcome after spontaneous preterm birth. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v.91, n.12, p.1402-8, 2012.

SCHAAF, J.M.; LIEM, S.M.; MOL, B.W. et al. Ethnic and racial disparities in the risk of preterm birth: a systematic review and meta-analysis. **American Journal of Perinatology**, v.30, n.6, p.433-50, 2013.

SILVA, A.A.M.; RIBEIRO, V.S.; BORBA, A.F. et al. Avaliação da qualidade dos dados do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos em 1997-1998. **Revista de Saúde Pública**, v.35, n.6, p.508-14, 2001.

SILVA, A.M.R.; ALMEIDA, M.F.; MATSUO, T. et al. Fatores de risco para nascimentos pré-termo em Londrina, Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.25, n.10, p.2125-2138, 2009.

SILVEIRA, M.F.; SANTOS, I.S.; BARROS, A.J.D. et al. Aumento da prematuridade no Brasil : revisão de estudos de base populacional Increase in preterm births in Brazil : review of population-based studies. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, n. 5, p. 957–964, 2008.

SIMONI, M.; GROMOLL, J.; NIESCHLAG, E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. **Endocrine Reviews**, v.18, n.6, p.739-773.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014**/Sociedade Brasileira de Diabetes ; [organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio]. – São Paulo: AC Farmacêutica, 2014.

STILLEY, J.A.W.; CHRISTENSEN, D.E.; DAHLEM, K.B. et al. FSH receptor (FSHR) expression in human extra-gonadal reproductive tissues and the developing placenta, and the impact of its deletion on pregnancy in mice. **Biology of Reproduction**, 2014. Disponível em< http://www.biolreprod.org/content/early/2014/08/04/biolreprod.114.118562.long> Acesso em: 07 set. 2014.

STONEK, F.; METZENBAUER, M.; HAFNER, E. et al. Interleukin-10 1082 G / A promoter polymorphism and pregnancy complications : results of a prospective cohort study in 1 , 616 pregnant women. **Acta Obstetricia et Gynecologica**, v. 87, p. 430–433, 2008.

VAN DEN BROEK, N.R.; JEAN-BAPTISTE, R.; NEILSON, J.P. Factors associated with preterm, early preterm and late preterm in Malawi. **Plos One**, v.9, n.3, p.1-8, 2014.

VREEBURG, S.A.; JACOBS, D.J.; DEKKER, G.A. et al. Hypertension during pregnancy in South Australia, part 2: risk factors for adverse maternal and/or perinatal outcome – results of multivariable analysis. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v.44, p. 410-418, 2004.

YANIT, K.E.; SNOWDEN, J.M.; CHENG, Y.W. et al. The impact of chronic hypertension and pregestational diabetes on pregnancy outcomes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.207, n.4, p.1-11, 2012.

YILMAZ, Y.; VERDI, H.; TANERI, A. et al. Maternal-fetal proinflammatory cytokine gene polymorphism and preterm birth. **DNA and cell biology**, v. 31, n. 1, p. 92–7, 2012.

WAHABI, H.A.; ESMAEIL,S.A.; FAYED, A. et al. Pre-existing diabetes mellitus and adverse pregnancy outcomes. **BMC Research Notes**, v.5., n.496, p.1-5, 2012.

WANG, H.L.; ZHOU, C.; ZHANG, Y.Z. Role of matrix metalloproteinase-2,9 and their inhibitors in premature rupture of membranes. **Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology**, n.40, v.1, p.29-33, 2005.

WANG, Y. TANBO, T.; ABYHOLM, T. et al. The impact of advanced maternal age and parity on obstetric and perinatal outcomes in singleton gestations. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 248, p.31-7, 2011.

WEINBERG, C.R.; SHI, M. The genetics of preterm birth: using what we know to design a better association studies. **American Journal of Epidemiology**, v.170, n.11, p. 1373-81, 2009.

WILCOX, A.J.; SKJAERVEN, R.; LIE, R.T. Familial patterns of preterm delivery: maternal and fetal contributions. **American Journal of Epidemiology**, v.167, n.4, p.474-9, 2007.

WONG, A.E.; GROBMAN, W.A. Medically Indicated – Iatrogenic prematurity. **Clinics in Perinatology**, v.38, n.3, p.423-39, 2011.

WU, W.; CLARK, E. A S.; STODDARD, G. J. et al. Effect of interleukin-6 polymorphism on risk of preterm birth within population strata: a meta-analysis. **BMC genetics**, v. 14, p. 30, 2013.

XIAOLI, L.; WEIYUAN, Z. Effect of maternal age on pregnancy: a retrospective cohort study. **Chinese Medical Journal**, v. 127, n.12, p.2241-6, 2014.

ZHANG, L.; GONZÁLEZ-CHICA, D. A.; CESAR, J. A. et al. Tabagismo materno durante a gestação e medidas antropométricas do recém-nascido : um estudo de base populacional no extremo sul do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 9, p. 1768–1776, 2011.

# APÊNDICES

## APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### *TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO*

A ocorrência de partos prematuros vem aumentando em várias partes do mundo, inclusive no Brasil. Geralmente, bebês prematuros precisam de cuidados médicos especiais, o que provoca custos elevados durante sua permanência sob tratamento. Alguns fatores envolvidos na prematuridade já são conhecidos, como: gestação acima dos 35 anos de idade, uso de fumo durante a gestação, infecções, aparecimento de diabetes durante a gestação, entre outros. Outros possíveis fatores, como a genética da gestante (ou seja, a composição do DNA da mãe), ainda são pouco conhecidos.

Por meio deste documento, você esta sendo convidada a participar de uma pesquisa que será realizada na Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) e na Maternidade Darcy Vargas (MDV) intitulada "**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES *FSHR* E *PGR* E PREMATURIDADE**". Antes de decidir se deseja ou não participar da pesquisa, é preciso que você conheça e entenda os objetivos, riscos e possíveis desconfortos. Use o tempo que achar necessário para ler este documento. Caso tenha qualquer dúvida, por favor, pergunte. Você também pode pedir ajuda para pessoas de sua confiança.

Esta pesquisa objetiva verificar a possível relação de pequenas diferenças (chamadas "polimorfismos") na composição do material genético (DNA), especificamente nos genes chamados *FSHR* (Receptor do Hormônio Foliculo Estimulante) e *PGR* (Receptor da Progesterona), com a ocorrência de prematuridade. Também desejamos conhecer a relação com outros fatores como idade, renda familiar, uso de álcool e fumo durante a gestação, Índice de Massa Corporal (relação entre altura e peso corporal), hipertensão, diabetes e infecções durante a gestação. Para tanto, compararemos mães de bebês prematuros e não prematuros.

Portanto, será necessária sua autorização para:

- consulta ao seu prontuário para coleta de dados médicos;
- entrevista contendo questões pré-formuladas;
- uso de amostra de sangue.

Seu prontuário somente será consultado pelos integrantes da equipe de pesquisadores e exclusivamente para os fins apontados neste documento. A entrevista será realizada durante seu período de internação na maternidade, não necessitando que você se desloque, e durará aproximadamente 15 minutos. Para a análise genética, usaremos uma pequena parte do seu sangue já coletado quando você entrou na maternidade. Ou seja, não será necessário coletar uma nova amostra de sangue, pois aproveitaremos uma fração residual que seria descartada após as análises de rotina pelo laboratório da MDV. A amostra será encaminhada ao Laboratório de Biologia Molecular da UNIVILLE onde será arquivada e analisada.

Os riscos envolvidos na pesquisa são mínimos. Mas se houver danos decorrentes da pesquisa, você será indenizada. Garantimos o sigilo completo das suas informações pessoais, tanto as obtidas no prontuário como as coletadas via

entrevista. Também garantimos o anonimato em quaisquer divulgações desta pesquisa, ou seja, sua identidade jamais será revelada. Se uma ou mais perguntas você considerar constrangedoras, por qualquer motivo, você não precisa responder.

Na pesquisa atual somente serão investigados os polimorfismos dos genes *FSHR* e *PGR*. Adicionalmente, pedimos autorização para armazenamento de seus dados e amostra de DNA, por 5 anos, para a possível investigação no futuro de outras regiões do seu genoma (conjunto de informações genéticas individuais) também relacionadas à gestação. Nenhuma outra pesquisa será realizada sem que você seja contatada, informada e dê seu novo consentimento por escrito. Além disso, este material somente será utilizado se o novo projeto for aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). As informações e resultados serão utilizados somente para fins de produção científica e serão mantidos sob responsabilidade dos pesquisadores. O banco de dados genéticos permanecerá sob responsabilidade da UNIVILLE.

É garantido seu direito de ser informada quanto ao resultado do exame, se assim desejar. Em caso de quaisquer dúvidas relativas à pesquisa, durante ou após a conclusão da sua participação ou se quiser saber o resultado, você poderá contatar a pesquisadora responsável (vide nome e formas de contato ao final deste documento).

Não haverá compensação (pagamento) financeira ou vantagens pela participação e não haverá ressarcimento de despesas, uma vez que sua participação acontecerá durante sua estada na maternidade. Nenhum procedimento da pesquisa trará custos a você ou ao sistema de saúde. Você não será beneficiada diretamente se decidir participar, mas estará contribuindo com a evolução do conhecimento científico. No futuro, espera-se conhecer o suficiente para se conseguir prever a possibilidade de ocorrência de prematuridade e preveni-la.

**A participação em qualquer pesquisa é voluntária**. Você não será prejudicada, de forma alguma, caso decida pela não participação ou se desistir futuramente. Você também manterá o direito de pedir que seus dados genéticos ou sua amostra sejam destruídos a qualquer momento. Se houver concordância, as duas vias (cópias) deste documento serão assinadas por você e pela pesquisadora responsável, sendo que uma via ficará com você e a outra com a pesquisadora. Todas as páginas deverão ser rubricadas.

**Atenção:** em caso de dúvidas relativas aos seus direitos como participante da pesquisa ou se quiser apresentar denúncia, contate diretamente o Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE através do telefone 47-34619235, endereço eletrônico comitetica@univille.br ou no endereço Rua Paulo Malschitzki, 10, bloco B, sala B-31, Zona Industrial, Campus Universitário Bom Retiro - Joinville/SC, CEP: 89.219-710.

**TERMO DE ASSINATURAS**

*Eu, _____ (nome da gestante), declaro estar ciente das informações recebidas, tendo lido (ou leram para mim) e compreendido o conteúdo deste documento. Tenho consciência de que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento. Autorizo o armazenamento de minha amostra de DNA para pesquisas futuras e serei informada sobre os objetivos, riscos e benefícios destas novas pesquisas. Uma vez que meus questionamentos foram satisfeitos, autorizo voluntariamente minha participação nesta pesquisa.*

Data:___ / ___ / _____

_____
Assinatura (ou impressão datiloscópica) da Gestante

_____
Assinatura da Pesquisadora Responsável
Bruna Barbosa Hackbarth
Fone: 47-99219686; e-mail: brunahackbarth@gmail.com

## APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO DE PESQUISA

**QUESTIONÁRIO PREMATURIDADE**

DADOS GERAIS:

NOME:

1. Número sequencial: __ ____ _____
2. Data da entrevista:
3. Data de nascimento:

4. Escolaridade:

( 0 ) "Analfabeto / Fundamental I Incompleto"
( 1 ) "Fundamental I completo / Fundamental II Incompleto"
( 2 ) "Fundamental II completo / Médio incompleto"
( 3 ) "Médio completo / Superior incompleto"
( 4 ) "Superior completo"

INFECÇÕES MICROBIANAS

**5.** Apresentou durante a gestação alguma das infecções abaixo?
**Obs.: pode-se anotar mais de uma opção.**

( 0 ) Infecção intra-uterina (corioamnionite);
( 1 ) Infecção do trato gênito-urinário (cistite, uretrite, vulvo-vaginites, pielonefrites);
( 2 ) Infecções em sítios distantes (ex.: faringite, pneumonia).
( 3 ) Não apresentou.
( 4 ) Não sabe / Não lembra.

Caso a paciente responda o subitem 3 ou 4, vá direto à questão 8.

6. Em que momento da gestação ocorreu(ram) essa(s) infecção(ões)?
**Obs.: pode-se anotar mais de uma opção.**

( 0 ) Vigente;
( 1 ) No último mês;
( 2 ) Em outro período da gestação.

7. Necessitou tomar antibiótico?

( 0 ) Sim.
( 1 ) Não.
( 2 ) Não lembra / Não sabe.

CONDIÇOES SOCIOECONÔMICAS

8. Escolaridade da pessoa responsável pelo domicílio.

( 0 ) "Analfabeto / Fundamental I Incompleto"
( 1 ) "Fundamental I completo / Fundamental II Incompleto"
( 2 ) "Fundamental II completo / Médio incompleto"
( 3 ) "Médio completo / Superior incompleto"
( 4 ) "Superior completo"

9. Quantos empregados domésticos (mensalistas)?

( 0 ) ( 1 ) ( 2 ) ( 3 ) ( 4ou+ )

10. Número total de banheiros.
( 0 ) ( 1 ) ( 2 ) ( 3 ) ( 4ou+ )
11. Número de microcomputadores.
( 0 ) ( 1 ) ( 2 ) ( 3 ) ( 4ou+ )
12. Número de carros.
( 0 ) ( 1 ) ( 2 ) ( 3 ) ( 4ou+ )
13. Número de motocicletas.
( 0 ) ( 1 ) ( 2 ) ( 3 ) ( 4ou+ )
14. Número de lava-louças.
( 0 ) ( 1 ) ( 2 ) ( 3 ) ( 4ou+ )
15. Número de geladeiras.
( 0 ) ( 1 ) ( 2 ) ( 3 ) ( 4ou+ )
16. Número de *freezer* (aparelho independente ou parte da geladeira duplex).
( 0 ) ( 1 ) ( 2 ) ( 3 ) ( 4ou+ )
17. Número de lava-roupa.
( 0 ) ( 1 ) ( 2 ) ( 3 ) ( 4ou+ )
18. Número de DVD.
( 0 ) ( 1 ) ( 2 ) ( 3 ) ( 4ou+ )
19. Número de microondas.
( 0 ) ( 1 ) ( 2 ) ( 3 ) ( 4ou+ )
20. Número de secadora de roupa.
( 0 ) ( 1 ) ( 2 ) ( 3 ) ( 4ou+ )
21. Apresenta água encanada?
( 0 ) Sim ( 1 ) Não
22. Apresenta rua pavimentada?
( 0 ) Sim ( 1 ) Não

TABAGISMO

23. Costumava fumar nos 6 meses que antecederam a gravidez? (Sim) (Não).

Caso a paciente responda NÃO, vá direto à questão 25.

24. Se sim, quantos cigarros por dia?

25. Fumou durante a gravidez? (Sim) (Não).

Caso a paciente responda NÃO, vá direto à questão 28.

26. Se sim, em que trimestre?
**Obs.: pode-se anotar mais de uma opção.**
( 0 ) 1º trimestre;
( 1 ) 2º trimestre;
( 2 ) 3º trimestre;

27. Quantos cigarros por dia? _____

28. Durante a gravidez, seu marido ou outro familiar fumou na mesma peça do domicilio onde você se encontrava? (Sim) (Não).

ALCOOL

29. Com que frequência você toma bebida alcoólica?

( 0 ) Nunca;
( 1 ) Mensalmente ou menos;
( 2 ) De 2 a 4 vezes por mês;
( 3 ) De 2 a 3 vezes por semana;
( 4 ) 4 ou mais vezes por semana.

Caso a paciente responda o subitem 0, pular para a questão 32.

30. Nas ocasiões em que bebe, quantas doses você consome tipicamente ao beber?

( 0 ) 1 ou 2;
( 1 ) 3 ou 4;
( 2 ) 5 ou 6;
( 3 ) 7, 8 ou 9;
( 4 ) 10 ou mais.

31. Com que frequência você toma "cinco ou mais doses" de uma vez?

( 0 ) Nunca;
( 1 ) Menos do que uma vez por mês;
( 2 ) Mensalmente;
( 3 ) Semanalmente;
( 4 ) Todos ou quase todos os dias.

IMC

32. PESO (antes da gestação): _____ kg.
33. ALTURA: _____cm.

DADOS MATERNOS DO PRONTUÁRIO

34. **Diabetes gestacional**: ( Não ) ( Sim ).

Caso a resposta seja não, pular para a questão 37.

35. Dados laboratoriais: Glicemia de jejum: _____ mg/dL.
Glicemia de 1 hora: _____mg/dL.
Glicemia de 2 horas: _____mg/dL.
36. Tratamento: ( ) Controle da dieta ( ) Insulina.

37. **Síndromes hipertensivas:**

( ) HAS Crônica ( ) Hipertensão Gestacional ( ) Pré-eclâmpsia ( ) Eclâmpsia.

38. **Infecções microbianas:**

( 0 ) Infecção intra-uterina (corioamnionite);
( 1 ) Infecção do trato gênito-urinário (cistite, uretrite, vulvo-vaginites, pielonefrites);
( 2 ) Infecções em sítios distantes (ex.: faringite, pneumonia).

DADOS DO RN DO PRONTUÁRIO

39. Idade Gestacional: _____semanas e _____dias.
40. Peso:
41. Via de parto: ( ) parto normal ( ) cesárea.
42. Apgar de 1º minuto: ( 0 ) ( 1 ) ( 2 ) ( 3 ) ( 4 ) ( 5 ) ( 6 ) ( 7 ) ( 8 ) ( 9 ) ( 10 ).
43. Apgar de 5º minuto: ( 0 ) ( 1 ) ( 2 ) ( 3 ) ( 4 ) ( 5 ) ( 6 ) ( 7 ) ( 8 ) ( 9 ) ( 10 ).
44. Ingresso em UTI: ( Não ) ( Sim ).

Caso a resposta seja “não”, pular para a questão 46.

45. Quantos dias? _____
46. Necessidade de suporte respiratório? ( Não ) ( Sim ).

Caso a resposta seja “não”, pular para a questão 48.

47. Quanto tempo?_____
48. Hemorragia Cerebral: ( Não ) ( Sim ).

Caso a resposta seja “não”, pular para a questão 50.

49. Grau: ( 1 ) ( 2 ) ( 3 ) ( 4 ).
50. Enterocolite necrosante: ( Não ) ( Sim ).
51. Diagnóstico de Sepse: ( Não ) ( Sim ).
52. Uso de antibiótico: ( Não ) ( Sim ).

Caso a resposta seja “não”, encerrar a coleta de dados.

53. Qual(is):
_____
54. Duração do tratamento: _____dias.

## ANEXOS

### ANEXO A – AUDIT-C (*Alcohol Use Disorder Identification Test C)*

| Perguntas | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** – Com que freqüência você toma bebida alcoólica? | Nunca | Mensal-mente ou menos | De 2 a 4 vezes por mês | De 2 a 3 vezes por semana | 4 ou mais vezes por semana |
| **2** – Nas ocasiões em que bebe, quantas doses você consome tipicamente ao beber? | 1 ou 2 | 3 ou 4 | 5 ou 6 | 7, 8 ou 9 | 10 ou mais |
| **3** – Com que freqüência você toma "cinco ou mais doses" de uma vez? | Nunca | Menos do que uma vez por mês | Mensal-mente | Semanal-mente | Todos ou quase todos os dias |
| | | | | **Total** | |

## ANEXO B – Critério de Classificação Econômica Brasil

**SISTEMA DE PONTOS**

**Posse de itens**

| | Quantidade de Itens | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 ou + |
| Televisão em cores | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Rádio | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Banheiro | 0 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Automóvel | 0 | 4 | 7 | 9 | 9 |
| Empregada mensalista | 0 | 3 | 4 | 4 | 4 |
| Máquina de lavar | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Videocassete e/ou DVD | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Geladeira | 0 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Freezer (aparelho independente ou parte da geladeira duplex) | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |

**Grau de Instrução do chefe de família**

| Nomenclatura Antiga | Nomenclatura Atual | |
|---|---|---|
| Analfabeto/ Primário incompleto | Analfabeto/ Fundamental 1 Incompleto | 0 |
| Primário completo/ Ginasial incompleto | Fundamental 1 Completo / Fundamental 2 Incompleto | 1 |
| Ginasial completo/ Colegial incompleto | Fundamental 2 Completo/ Médio Incompleto | 2 |
| Colegial completo/ Superior incompleto | Médio Completo/ Superior Incompleto | 4 |
| Superior completo | Superior Completo | 8 |

**CORTES DO CRITÉRIO BRASIL**

| Classe | Pontos |
|---|---|
| A1 | 42 - 46 |
| A2 | 35 - 41 |
| B1 | 29 - 34 |
| B2 | 23 - 28 |
| C1 | 18 - 22 |
| C2 | 14 - 17 |
| D | 8 - 13 |
| E | 0 - 7 |

**ANEXO C – Procedimento Operacional Padrão para Extração de DNA**

# Extração/Purificação de DNA Genômico Humano (Sangue Total)

*"BIOPUR Kit de Extração Mini SPIN PLUS"*

*Laboratório de Biologia Molecular da UNIVILLE*

**Responsável**: _____

**Data**: _____

**Projeto** (SIGLA): _____

**Amostras**:

_____

**Codificação:** 0-a termo; 1-pré-termo.

**Nome do arquivo da foto da eletroforese**: _____

Amb = temperatura ambiente

| ***Ação*** | ***V (µL)*** | ***T(°C)*** | ***t*** | ***Rot(rpm)*** | ***Visto*** |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. Separar 2 tubos Eppendorf (1,5 mL) para cada amostra. | | | | | |
| 2. Separar 1 coluna e 1 tubo de coleta ("tubo de reação") para cada amostra. | | | | | |
| 3. Separar os componentes do kit que serão empregados, (*Tampão A de Lise, Proteinase K, Tampão B6 de Ligação, Tampão I de Lavagem, Tampão II de Lavagem*, Tampão de Eluição) e dispor sobre a bancada de extração, segundo a ordem em que serão utilizados. A solução de Proteinase K é estocada no freezer. Equilibrar todos os componentes à temperatura ambiente para a subsequente utilização. | | | | | |
| 4. Pré-aquecer o termobloco a 56ºC. | | | | | |
| 5. Aliquotar o volume necessário de Tampão de Eluição (200 µL por amostra). | | | | | |
| 6. Separar as amostras (sangue total) a serem processadas. | | | | | |
| 7. Marcar as tampas dos tubos Eppendorf e colunas com as identificações das amostras. | | | | | |
| 8. Homogeneizar via vortex a amostra de sangue coagulado até completa dissolução. | | Amb | ± 1 min | | |
| 9. Transferir a amostra para tubo Eppendorf (1,5 mL). | 200 | | | | |
| 10. Adicionar Tampão A de lise. | 200 | | | | |
| 11. Adicionar Proteinase K. | 20 | | | | |
| 12. Homogeneizar via vortex. | | | 5 seg | | |
| 13. Incubar as amostras em termobloco, sob agitação contínua. | | 56 | 15 min | | |
| 14. Aquecer o Tampão de Eluição em termobloco.. | | 56 | | | |
| 15. Adicionar Tampão B6 de Ligação. | 400 | | | | |
| 16. Homogeneizar via vortex. | | | 5 seg | | |
| 17.Centrifugar (spin) | | | | máxima | |
| 18. Transferir todo o volume de cada tubo para as respectivas colunas (Tubo Spin Plus) contidas em tubos de coleta. | | | | | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 19. Incubar. | | Amb | 1 min | | |
| 20. Centrifugar. | | | 2 min | máxima | |
| 21. Descartar os tubos de coleta contendo o filtrado e transferir as colunas para novos tubos de coleta (2 mL). | | | | | |
| 22. Adicionar Tampão I de Lavagem à coluna. | 500 | | | | |
| 23. Centrifugar | | | 1 min | máxima | |
| 24. Descartar o filtrado e transferir as colunas para os mesmos respectivos tubos de coleta. | | | | | |
| 25. Adicionar Tampão II de Lavagem à coluna. | 800 | | | | |
| 26. Centrifugar. | | | 1 min | máxima | |
| 27. Descartar o filtrado e transferir as colunas para os mesmos respectivos tubos de coleta. | | | | | |
| 28. Centrifugar para a remoção completa do etanol. | | | 4 min | máxima | |
| 29. Descartar os tubos de coleta contendo o filtrado e transferir as colunas para tubos Eppendorf (1,5 mL) previamente identificados. | | | | | |
| 30. Adicionar Tampão de Eluição pré-aquecido a 56ºC. | 200 | | | | |
| 31. Incubar. | | Amb | 1 min | | |
| 32. Destacar a tampa da coluna. | | | | | |
| 33. Centrifugar. | | | 1 min | 8.000 | |
| 34. Descartar as colunas. | | | | | |
| 35. Utilizar o material extraído contido no Eppendorf logo em seguida ou manter os tubos a -20°C. | | | | | |

## ANEXO D – Comprovante de submissão do artigo

Prezado(a) Dr(a). Bruna Barbosa Hackbarth:

Confirmamos a submissão do seu artigo "Fatores de risco associados à prematuridade" (CSP_0026/15) para Cadernos de Saúde Pública. Agora será possível acompanhar o progresso de seu manuscrito dentro do processo editorial, bastando clicar no *link* "Sistema de Avaliação e Gerenciamento de Artigos", localizado em nossa página http://www.ensp.fiocruz.br/csp.

Em caso de dúvidas, envie suas questões através do nosso sistema, utilizando sempre o ID do manuscrito informado acima. Agradecemos por considerar nossa revista para a submissão de seu trabalho.

Atenciosamente,

Profª. Marilia Sá Carvalho
Profª. Claudia Travassos
Profª. Claudia Medina Coeli
Editoras

**Cadernos de Saúde Pública / *Reports in Public Health***
Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca
Fundação Oswaldo Cruz
Rua Leopoldo Bulhões 1480
Rio de Janeiro, RJ 21041-210, Brasil
Tel.: +55 (21) 2598-2511, 2508 / Fax: +55 (21) 2598-2737
cadernos@ensp.fiocruz.br
http://www.ensp.fiocruz.br/csp