

Vilosidades e outras estruturas coriônicas encontradas no sangue periférico de gestantes: número, tamanho e uma técnica para sua recuperação

Villus and other chorionic structures found at the peripheral blood of pregnant women: number, size, and a technique for their recovery

NILO PEREIRA LUZ¹
CAIO COELHO MARQUES¹

RESUMO

Objetivos: desenvolver uma técnica para recuperar, identificar, contar e medir as vilosidades e outras estruturas coriônicas presentes no sangue periférico de gestantes.

Métodos: foram selecionadas para o estudo 10 gestantes normais, com idade gestacional igual ou superior a 37 semanas, internadas no Hospital São Lucas da PUCRS para o parto. Foram colhidos 3 ml de sangue em EDTA e 5.000 UI de aprotinina (Trasylol® Bayer) de uma veia cubital de cada paciente. As amostras foram imediatamente fixadas em Bouin, embebidas em parafina, cortadas a 3µm, coradas por hematoxilina/eosina, tricrômico de Masson e por anticorpos monoclonais específicos para tecidos trofoblásticos. Cada lâmina foi escrutinada de forma linear em toda a sua superfície, a um aumento de 250 vezes, e as estruturas coriônicas reconhecidas foram medidas com uma ocular micrométrica calibrada. Os resultados foram apresentados por média ± erro padrão.

ABSTRACT

Aims: To develop a technique to recover, count, identify, and measure chorionic villi and other chorionic structures present in the peripheral blood of pregnant women.

Methods: Ten normal pregnant women with gestational age equal or over 37 weeks, admitted to the Hospital São Lucas da PUCRS for delivery, were selected for the study. Three milliliters of blood samples in EDTA and 5,000IU of aprotinase (Trasylol® Bayer) were obtained at a cubital vein from each patient. Samples were immediately fixed in Bouin, embedded in paraffin, sectioned at 3µm, stained by hematoxylin/eosin, Masson's trichrome, and with monoclonal antibodies specific to trophoblastic tissues. Each slide was scrutinized over all its surface at 250x magnification, by a linear scrutiny with conventional microscopy and every chorionic structure recognized was counted and measured with a calibrated micrometric ocular. The measures have been presented by mean ± standard error.

Results: For each milliliter of maternal blood, 15.4 ± 3.1 syncytiotrophoblastic plaques equal or larger than

¹ Professores Titulares de Obstetrícia. Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Resultados: foram recuperadas $15,4 \pm 3,1$ placas de sinciotrofoblasto maiores de 100 e $5,8 \pm 0,9$ vilosidades coriônicas por ml de sangue materno. O comprimento médio das vilosidades foi $289,3 \pm 13,6 \mu\text{m}$, a largura média foi de $116,3 \pm 5,3 \mu\text{m}$ e a espessura média do sinciotrofoblasto foi de $33,4 \pm 1,7 \mu\text{m}$. O descolamento dos cortes impediu os estudos imunológicos em 4 dos 10 casos. Em duas das seis amostras estudadas com anticorpos monoclonais específicos para trofoblasto as estruturas recuperadas foram reativas.

Conclusões: a fixação imediata das amostras foi apresentada como um novo método para recuperar as estruturas coriônicas presentes no sangue periférico de gestantes. Elas foram identificadas, contadas e medidas. Sua quantidade e dimensões foram grandes. Os mecanismos que podem explicar seu surgimento e seu destino, bem como o significado de sua presença e quantidade no sangue periférico das gestantes foram discutidos.

DESCRIPTORIOS: GRAVIDEZ/ sangue; GRAVIDEZ/ imunologia; VILOSIDADES CORIÔNICAS; TROFOBLASTOS; HUMANOS.

100 μm and 5.8 ± 0.9 chorionic villi have been recovered. The mean longitudinal diameter of villi was $289.3 \pm 13.6 \mu\text{m}$, their mean transverse diameter was $116.3 \pm 5.3 \mu\text{m}$ and their syncytiotrophoblast thickness was $33.4 \pm 1.7 \mu\text{m}$. In two of the six samples subjected to immunologic studies, a reactivity to monoclonal antibodies specific to trophoblast was obtained on the recovered structures.

Conclusions: Immediate fixation of blood samples was presented as a new method to recover chorionic structures from peripheral blood of pregnant women. They have been identified, counted and measured. Their quantity and size were large. The mechanisms that could explain their presence and fate in maternal blood and the significance of their presence, quantity and fate have been discussed.

KEY WORDS: PREGNANCY/blood; PREGNANCY/immunology; CHORIONIC VILLI; TROPHOBLASTS; HUMANS.

INTRODUÇÃO

A deportação de vilosidades coriônicas para o sangue materno tem sido um tema controverso desde o trabalho inicial de Schmorl,¹ que descreveu a presença de embolias pulmonares causadas por células trofoblásticas em 14 de 17 pacientes falecidas por eclâmpsia. Em uma série de 158 autópsias de gestantes falecidas durante a gestação ou no pós-parto imediato, Veit² verificou que a incidência dessas embolias era maior nos casos de pré-eclâmpsia e eclâmpsia do que nas pacientes falecidas por outras causas. Depois dessas publicações, passou a ser admitido que a deportação de vilosidades coriônicas para o sangue materno era um fenômeno normal na gestação.³ Entretanto, as embolias pulmonares descritas por esses autores eram causadas por células trofoblásticas, e não por vilosidades, sendo estas últimas encontradas só raramente. Além disso, sua presença era sempre associada a um trauma obstétrico severo, e nunca descrita por eles como um evento normal da gravidez. Bardawil et al.,⁴ em um estudo de embolias por líquido amniótico, analisaram as necropsias de 109 pacientes falecidas durante a gestação ou no pós-parto. Detectaram vilosidades completas nos vasos pulmonares apenas em duas dentre as 57 embolias pulmonares causadas por líquido amniótico. Mesmo com base em tão poucas evi-

dências, foi admitido que a deportação de vilosidades coriônicas para o sangue materno ocorreria em todas as gestações.

Luz et al.⁵ publicaram uma técnica para recuperar vilosidades coriônicas do sangue periférico de gestantes. Em outro estudo, Luz,⁶ analisando amostras de sangue não fixadas, através de um microscópio de contraste de fase, encontrou vilosidades no sangue de todas as 30 gestantes estudadas ao termo da gestação. Nessa publicação, foi demonstrado que a presença das vilosidades coriônicas no sangue das gestantes deveria ser um evento normal da gestação humana. Foi a primeira evidência publicada comprovando ser essa migração uma condição fisiológica, que ocorre em todas as gestações.

Hawes et al.⁷ encontraram e identificaram células trofoblásticas no sangue materno e as usaram para estudos genéticos não invasivos do feto. Durrant et al.⁸ encontraram 20 células trofoblásticas por mililitro de sangue materno. Bulmer et al.⁹ as recuperaram desde a décima semana da gestação. Chua et al.¹⁰, Johansen et al.¹¹ e Redman et al.¹² assinalaram que o seu número está aumentado nos casos de pré-eclâmpsia e sugeriram que esse aumento poderia ser um dos fatores influenciando as reações maternas ao enxerto que é o seu feto.

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de melhor avaliar o número, a morfo-

logia, o tamanho, o destino e as possíveis repercussões da presença e da quantidade das vilosidades e outras estruturas coriônicas encontradas no sangue materno.

MÉTODOS

Foi estudada uma amostra de conveniência de 10 gestantes normais, com idade gestacional igual ou superior a 37 semanas, admitidas para o parto ou para uma cesárea eletiva no Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

De cada paciente foram obtidos 3 ml de sangue de uma veia cubital, com uma seringa contendo EDTA e 5.000 UI de aprotinina (Trasylol® Bayer). Retirada a agulha, a amostra era imediatamente vertida em um tubo de centrifuga contendo 7 ml de uma solução recente do fixador de Bouin. A seguir, a amostra era centrifugada a 2.000 rpm por 10 minutos. O plasma sobrenadante era cuidadosamente retirado e colocado em outro tubo, para inclusão em parafina. O sedimento da amostra era desidratado com concentrações ascendentes de álcool, clarificado com xilol ainda dentro do tubo de centrifuga e embebido em parafina. Foram obtidos cortes a 3 µm dos blocos de ambas as partes de cada amostra (sedimento e sobrenadante) que foram corados com hematoxilina/ eosina, tricrômico de Masson e com anticorpos monoclonais específicos para tecidos coriônicos.

Cada lâmina foi escrutinada em toda sua superfície por um dos autores (NPL) a um aumento de 250 vezes. Foram recuperadas estruturas coriônicas de ambas as partes de cada amostra, as quais foram estudadas na

sua morfologia e no seu tamanho. Seu número foi contado nos cortes obtidos do sedimento das amostras. As medidas foram feitas no comprimento, largura e espessura do sinciotrofoblasto, usando uma ocular micrométrica calibrada.

Em 6 das 10 amostras foi tentada a identificação imunológica com anticorpos monoclonais específicos para tecidos trofoblásticos. Em 4 amostras, o desprendimento dos cortes das lâminas microscópicas impediu a realização dos testes de imunohistoquímica (Tabela 1). Foram usados os anticorpos monoclonais para citoqueratinas 8 e 18, HCG, X63 e o coquetel Q, B, N, L 185 (Flinders Technology, Flinders University of South Australia, Bedford Park, Austrália) (Tabela 1). O coquetel Q, B, N, L 185 é uma mistura dos anticorpos FDO66Q, FDO46B, FDO202N e FDO185L da Flinders Technology. Todos haviam sido testados antes em cortes de congelamento de placentas não fixadas, produzindo os resultados esperados. Sua seletividade para tecidos trofoblásticos já fora demonstrada.¹³⁻¹⁶ Cada lâmina foi dividida em duas partes por grades aderidas, com uma divisão para receber os anticorpos de controle e outra para o anticorpo selecionado. As lâminas foram colocadas em estufa a 65°C por 60 minutos, levadas ao xilol por 15 minutos, e passadas por 2 minutos em cada concentração de álcool a 95, 70 e 50%. Foram depois tratadas em peróxido de hidrogênio/ PBS por 30 minutos. O bloqueio dos receptores não específicos foi feito em estufa a 37°. Os anticorpos primários foram colocados na lâmina e mantidos a 4°C durante uma noite. O anticorpo secundário foi a biotina antimundongo. A detecção da reação foi com streptavidin-HRP e substrato AEC por 10 min (Tabela 1).

TABELA 1 – Imunohistoquímica: anticorpos monoclonais usados e seus resultados.

| Bloco | Lâmina | Anticorpo de controle | Resultado | Anticorpo testado | Resultado |
|-------|--------|-----------------------|-----------|---------------------|-----------|
| 3013 | 1 | X63 | Negativo | QBNL 185 cocktail | Positivo |
| 3023 | 2 | X63 | Negativo | Citoqueratina 8, 18 | Negativo |
| 3123 | 3 | Nenhum | Negativo | HCG dil.1:1000 | Negativo |
| 3113 | 4 | X63 | Negativo | QBNL 185 cocktail | Positivo |
| 3313 | 5 | Nenhum | Negativo | HCG dil. 1:1000 | Negativo |
| 3323 | 6 | X63 | Negativo | Citoqueratina 8, 18 | Negativo |

RESULTADOS

Dois tipos de estruturas foram recuperadas: placas destacadas de sinciotrofoblasto (Figura 1) e vilosidades coriônicas (inteiras ou fragmentos delas) (Figuras 2, 3 e 4). O número médio de placas recuperadas com tamanho superior a 100 μ m foi de 15,4 \pm 3,1 por ml de sangue (limites de variação 11 a 87/ ml por caso) (Tabela 2). As maiores placas, ocasionalmente, formavam colunas, contendo ou não fileiras de núcleos. Fragmentos com menos de 100 μ m eram freqüentes. Nessas placas, em dois dos seis casos estudados com imunohistoquímica (33,33%) foi obtida uma reatividade aos anticorpos monoclonais específicos para tecidos coriônicos (Figura 1 e Tabela 1).

TABELA 2 – Número total e tipo das estruturas recuperadas do sangue periférico de 10 gestantes normais no final da gestação.

| Nº do caso | Total de estruturas | Placas | Vilosidades |
|-------------------------|---------------------|----------------|---------------|
| 1 | 78 | 71 | 7 |
| 2 | 114 | 87 | 27 |
| 3 | 36 | 11 | 25 |
| 4 | 82 | 64 | 18 |
| 5 | 22 | 15 | 7 |
| 6 | 65 | 50 | 16 |
| 7 | 37 | 13 | 24 |
| 8 | 97 | 83 | 14 |
| 9 | 71 | 43 | 27 |
| 10 | 38 | 21 | 17 |
| Variação | 22 até 114 | 11 até 87 | 7 até 28 |
| Número total | 640 | 458 | 182 |
| Média \pm erro padrão | 21,3 \pm 3,2 | 15,4 \pm 3,1 | 5,8 \pm 0,9 |

O número médio das vilosidades recuperadas por ml de sangue materno foi de 5,8 \pm 0,9 com limites de variação entre 7 e 27 (Tabela 2). Seu aspecto era similar ao dos cortes longitudinais ou transversos das vilosidades de uma placenta (Figuras 2 e 3). Quando bem preservadas, podiam ser identificados vasos contendo hemácias no seu interior. O sinciotrofoblasto de seu revestimento apresentava freqüentemente uma espessura aumentada, com mais de uma camada de núcleos empilhados (Figura 3), um aspecto diferente daqueles mais comumente observados nos cortes de placenta feitos no final da gestação. Foram vistos também, no sinciotrofoblasto de revestimento, diferentes graus de alterações degenerativas. Em muitos locais ele tinha sido destacado, deixando desnudado o estroma da vilosidade.

Foram medidas 182 vilosidades nas suas dimensões longitudinal e transversa (comprimento e largura) e 95 na espessura do seu sincício de revestimento. O comprimento médio foi de 289,3 \pm 13,6 μ m, com limites de variação entre 68,6 e 1.372. A largura média foi de 116,3 \pm 5,3 μ m, com limites de variação entre 39,2 e 372,4 μ m. A espessura do sinciotrofoblasto foi medida nos lugares em que o corte do epitélio podia ser avaliado como perpendicular. A sua média foi de 33,4 \pm 1,7 μ m, com limites entre 10,5 e 98 μ m. As médias dos valores medidos em cada caso, com sua variabilidade, são mostradas na Tabela 3. Os valores globais de todas as medidas feitas, junto com a sua variabilidade, estão na Tabela 4.

Tabela 3 – Dimensões das vilosidades recuperadas do sangue periférico em cada um dos 10 casos de gestantes normais no final da gestação.

| Nº do caso | Número de vilosidades medidas | Comprimento médio (μ m) \pm erro padrão | Largura média (μ m) \pm erro padrão | Espessura média do Sincício (μ m) \pm erro padrão |
|------------|-------------------------------|--|--|--|
| 1 | 7 | 195,2 \pm 36,9 | 77,1 \pm 12,8 | 25,9 \pm 4,6 |
| 2 | 27 | 333,9 \pm 40 | 120,8 \pm 11,6 | 28,8 \pm 3,2 |
| 3 | 25 | 382 \pm 28,8 | 96,2 \pm 8,5 | 32,5 \pm 4,5 |
| 4 | 18 | 424,8 \pm 54,5 | 120,8 \pm 12,3 | 38,7 \pm 7,6 |
| 5 | 7 | 196,1 \pm 11,9 | 119,7 \pm 19,1 | 28,1 \pm 4,7 |
| 6 | 15 | 258,6 \pm 45,1 | 82,3 \pm 6,9 | 45,6 \pm 6 |
| 7 | 24 | 281,4 \pm 50,8 | 124,6 \pm 15,9 | 39,2 \pm 7,9 |
| 8 | 14 | 247,1 \pm 34,4 | 137,1 \pm 18,2 | 31,3 \pm 5,6 |
| 9 | 36 | 313,8 \pm 28,2 | 136,5 \pm 10,4 | 30,9 \pm 3,0 |
| 10 | 20 | 200,2 \pm 26,1 | 91,6 \pm 6,6 | 29,4 \pm 3,2 |
| Total | 182 | 182 | 182 | 95 |



Figura 1 - Placa destacada de sinciotrofoblasto apresentando a colonização por vezes observada e identificada como coriônica por anticorpos monoclonais específicos (aumento 200×).

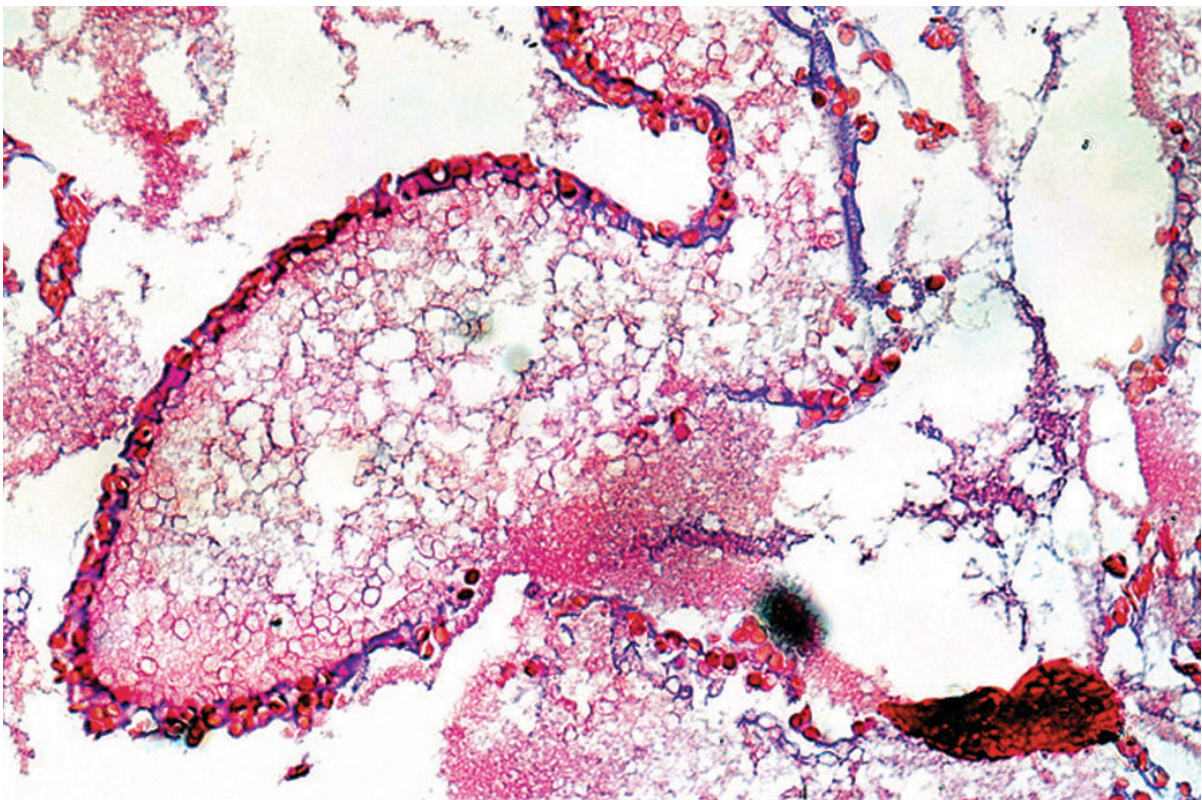


Figura 2 - Grande vilosidade com sinciotrofoblasto delgado (aumento 250×).

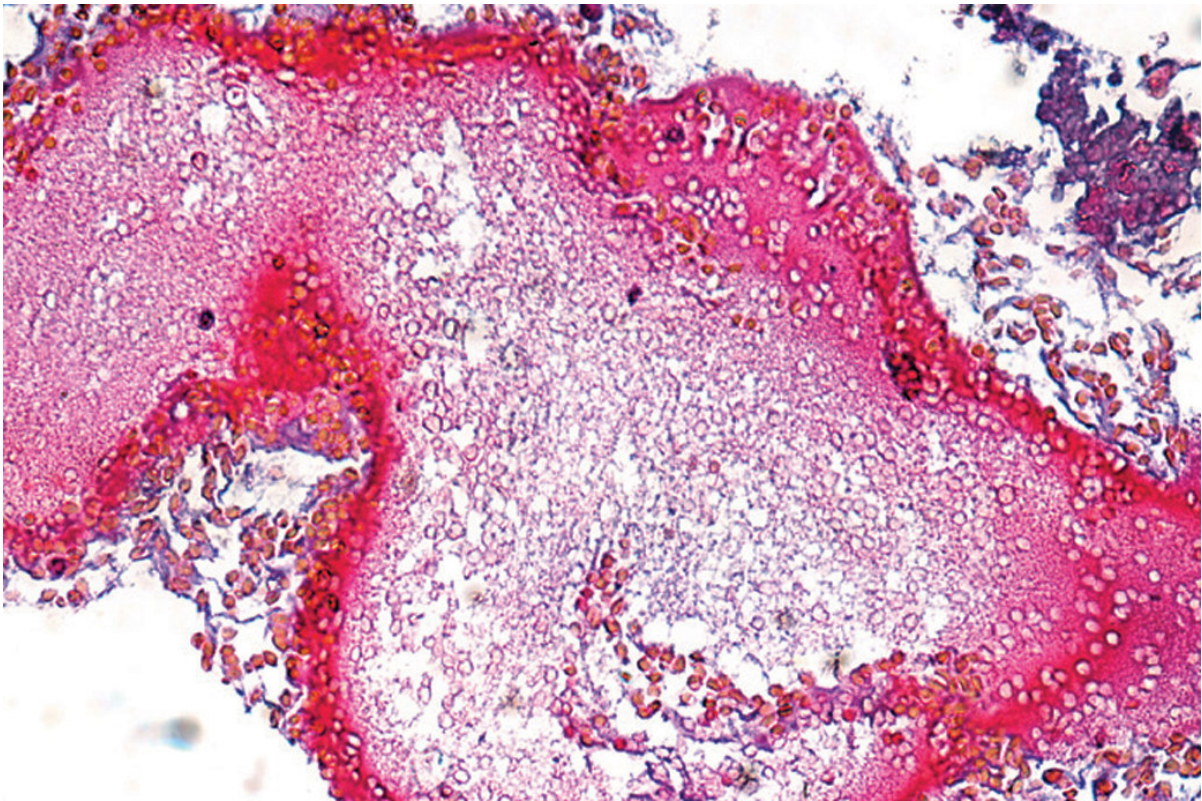


Figura 3 - Grande vilosidade mostrando sincício espessado e vaso contendo hemácias fetais (aumento 250×).

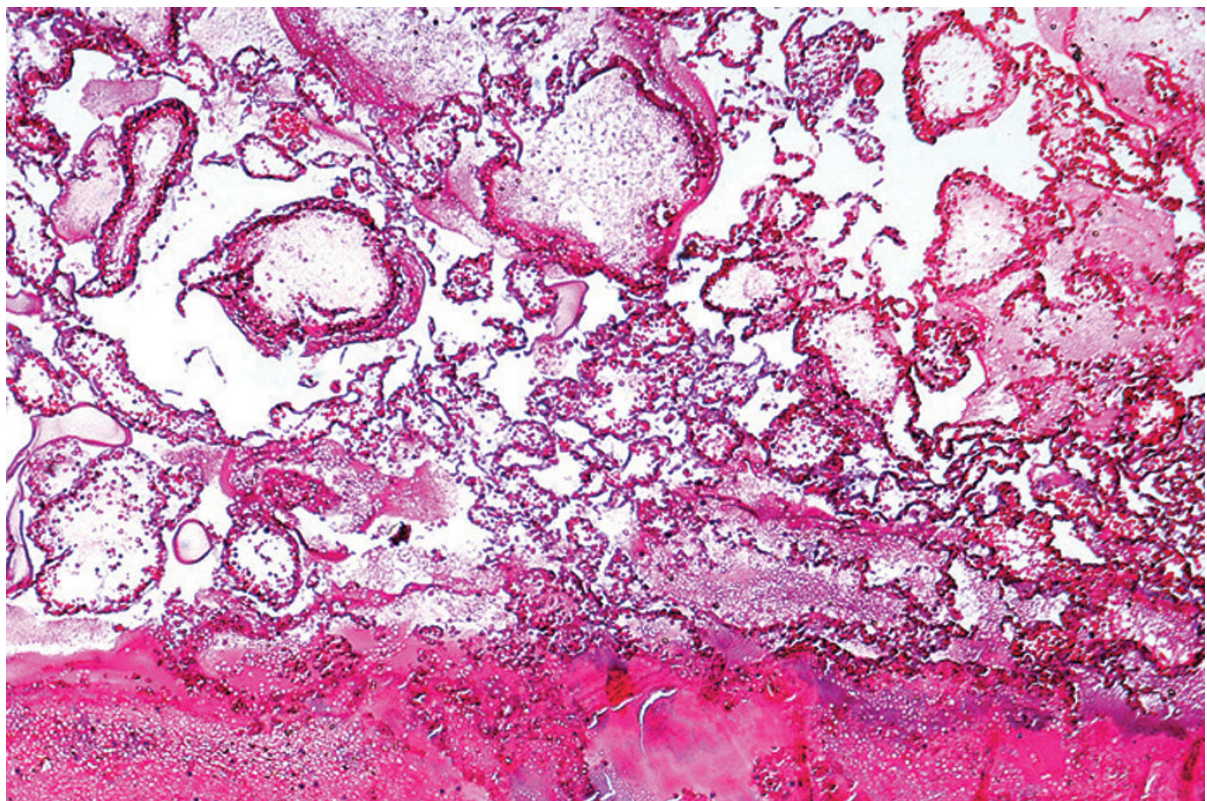


Figura 4 - Densa massa de eritrócitos maternos sedimentados e, no seu topo, muitas vilosidades coriônicas agrupadas (aumento 63×).

Tabela 4- Dimensões das vilosidades coriônicas no sangue periférico de gestantes e sua variabilidade.

| Variável medida | Número de medidas | Média (µm) | Erro padrão (µm) | Limites de variação (µm) |
|-----------------------|-------------------|------------|------------------|--------------------------|
| Diâmetro longitudinal | 182 | 289,3 | 13,6 | 68,6 até 1372 |
| Diâmetro transverso | 182 | 116,3 | 5,3 | 39,2 até 372,4 |
| Espessura do sincício | 95 | 33,4 | 1,7 | 10,5 até 98 |

A identificação imunológica com anticorpos monoclonais específicos para tecidos coriônicos só foi positiva em dois dos seis casos nos quais foram realizados testes de imunohistoquímica. As placas de sinciotrofoblasto destacadas mostraram reatividade ao coquetel Flinders QBNL 185 (Tabela 1).

DISCUSSÃO

O número de elementos trofoblásticos migrados para o sangue materno não está bem estudado, variando segundo o tipo dos elementos procurados e com o tipo de estudo realizado. Desde a década de 1990, muitos trabalhos vêm documentando a constante passagem de células trofoblásticas para o sangue materno, encontradas em todos os casos estudados e usadas para estudos genéticos não invasivos do feto.⁷⁻¹² Seria muito importante que se pudesse definir a frequência dessa migração trofoblástica, assim como sua quantidade, destino e verdadeiro significado biológico.

Com técnicas mais simples, Douglas et al.¹⁷ já haviam recuperado e identificado células trofoblásticas nas veias uterinas e pélvicas, mas raramente no sangue periférico. Luz⁶ publicou uma técnica em que recuperou vilosidades coriônicas completas em exames a fresco de todos os 30 casos estudados com microscopia de fase. Outros autores publicaram trabalhos documentando a passagem de estruturas coriônicas para o sangue periférico de gestantes: Lo et al.¹⁸ encontraram que o DNA fetal no final da gestação representava 6,2% do DNA presente no plasma materno e calcularam que para atingir essa concentração era necessária a deportação de $22,4 \times 10^4$ genoma-equivalentes por minuto do DNA fetal para o sangue materno. Huppertz et al.¹⁹ descreveram a existência de uma migração diária de 3g de nós sinciciais apoptóticos para o sangue materno.

O presente estudo sugere que, se extrapolarmos a quantidade de estruturas coriônicas recuperadas por mililitro de sangue materno e a ajustarmos à volemia de uma gestante, é possível que estejam circulando no sangue de cada gestante 115.720 estruturas coriônicas, sendo 84.920 placas com mais de 100µm e 30.800 vilosidades. Estudos mais abrangentes poderiam definir o número real dessas estruturas no sangue das gestantes. A deportação de estruturas fetais ou placentárias para o sangue materno durante a gravidez pode hoje ser considerada como um fato estabelecido, embora o número e a quantidade dessas estruturas mereçam ser melhor estudados.

Outro aspecto que precisa ser melhor conhecido é o destino desses tecidos coriônicos depois de chegar ao sangue periférico das gestantes. Simples raciocínios lógicos nos levam a supor que existam mecanismos para removê-los do sangue materno, evitando complicações embólicas e imunológicas que podem ser desencadeadas por sua presença na circulação. Além dos raciocínios lógicos, muitas evidências já foram publicadas documentando a existência desses mecanismos.^{17, 20, 26}

Douglas et al.¹⁷ encontraram células trofoblásticas em 8 de 13 amostras de sangue colhidas nas veias uterinas, em 3 das 33 amostras colhidas na veia cava inferior, e em nenhuma das amostras colhidas simultaneamente no sangue periférico. Para eles, o fator principal dessa ausência seria a sua captura nos capilares do pulmão, não tendo sido considerada a possibilidade de elas poderem ser destruídas no sangue circulante. Precisa ser entendido como é que essas estruturas, de tão grandes dimensões, podem não ser aprisionadas pelos capilares pulmonares, conseguindo atingir o sangue circulante das gestantes. Pelo seu tamanho, elas deveriam embolizar os capilares do pulmão. Sua presença no sangue circulante das gestantes só pode ser explicada pela existência de caminhos

alternativos, que derivam uma parte do sangue arterial diretamente para as veias. Beinder et al.²⁰ e Esteve et al.²¹ já descreveram o aumento no número dessas anastomoses arteriovenosas durante a gestação.

A morfologia e o número de derivações arteriovenosas nas paredes uterinas foram descritos recentemente por Schaaps et al.²² Foi demonstrado por Niden e Aviado²³ que esférulas de 63 a 420 µm passam diretamente da circulação arterial dos pulmões para as veias de cães anestesiados. Portanto, a presença no sangue periférico de fragmentos coriônicos tão grandes quanto os descritos neste trabalho é factível, já que o diâmetro interno desses canais anastomóticos assim o permite.

Outra explicação para a dificuldade de recuperar tecidos trofoblásticos do sangue das gestantes seria a sua destruição por mecanismos maternos. Thomas et al.²⁴ já haviam demonstrado que vilosidades coriônicas, quanto incubadas com tripsina, a uma diluição de 1:1.000, têm o seu sinciotrofoblasto separado do seu estroma e são destruídas em 3 a 4 minutos. A uma diluição maior, de 1 grama/ml, o efeito é o mesmo, apenas leva de 2 a 3 horas para se completar. Lo et al.²⁵ descreveram a rápida eliminação do DNA fetal do plasma materno, com sua meia vida calculada em 16,3 minutos.

Todas essas observações demonstram tanto a presença de muitas estruturas coriônicas no sangue materno, quanto a existência de mecanismos ativos para a sua rápida destruição. O papel da tripsina nessa destruição foi sugerido por Thomas et al.²⁴ e confirmado pelas observações de Luz,²⁶ que identificou, com imunohistoquímica, a presença desta enzima nas estruturas trofoblásticas recuperadas no sangue de gestantes. Isso explicaria o fato de não ter sido publicada até agora a presença constante no sangue das gestantes de tantas estruturas como as aqui apresentadas (Figura 4). No presente estudo foram tomados cuidados para bloquear essa destruição, por uma antiprotease, complementada por uma fixação imediata.

A repercussão imunológica da deportação de estruturas coriônicas para a circulação materna merece também uma consideração. O privilégio imune que protege o feto humano ainda não está completamente esclarecido. Entretanto, a importância imunológica da grande quantidade de tecidos semi-alogênicos circulando no sangue materno não deve ser pequena.

Jerzak e Bishop²⁷ sugerem ser este um aspecto até hoje pouco valorizado da promoção da tolerância materna ante seu feto. A área de contato direto entre a placenta e o sangue materno também deve ser considerada. Quando essa área foi avaliada por microscopia eletrônica e levando em consideração as microvilosidades que forram toda a superfície materna da placenta, o valor encontrado foi de 70 a 150m² (Salazar e Gonzáles-Ángulo,²⁸ Winn,²⁹ Bagshawe³⁰). A repercussão imunológica dessa grande superfície de contato materno-fetal, deve ser somado o impacto do grande número de estruturas coriônicas circulando no sangue materno, num desafio para o sistema imunológico da gestante.

Foi apresentada no presente estudo uma técnica original, usando uma antiprotease e a fixação imediata das amostras, para recuperar, identificar e quantificar as estruturas coriônicas presentes no sangue periférico de gestantes normais. Vários mecanismos podem explicar a presença e a destruição dessas estruturas coriônicas no sangue periférico das gestantes. É importante que novos estudos possam confirmar nossos achados e definir a magnitude dessa migração trofoblástica para o sangue materno, para melhorar o entendimento de importantes aspectos da fisiologia e da patologia da gestação humana.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos são devidos a Bill Kalionis, Universidade de Melbourne, Melbourne, Austrália que realizou os estudos imunológicos e auxiliou na redação do texto, com críticas e sugestões. Os componentes do Centro Obstétrico do Hospital São Lucas da PUCRS muito ajudaram na coleta das amostras usadas neste estudo.

REFERÊNCIAS

- Schmorl G. Über das Schicksal embolisch veeschleppter Plazentazellen. *Verh Deutsch Ges Pathol.* 1904;8:39-46
- Veit J Ueber Deportation von chorionzotten. *Zentralbl Gynakol.* 1904;28:466-504
- Novak E, Novak ER. *Gynecological and obstetrical pathology.* 4th.ed. Philadelphia: Saunders; 1958
- Bardawil WA, Toy BL. The natural story of chorio-carcinoma: problems of immunity and spontaneous regression. *Ann N Y Acad Sci.* 1959;80:197-261
- Luz NP, Crottogini JJ, Saguier-Negreti V, et al. A method for identification of chorionic villi in peripheral blood of pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 1966;94:1079-84

- 6 Luz NP. Vilosidades coriônicas no sangue periférico de gestantes. *Ginecol Bras.* 1999; 1: 19-21.
- 7 Hawes CS, Suskin HÁ, Petropoulos A, et al. A morphological study of trophoblast isolated from peripheral blood of pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 1994; 178:1297-300
- 8 Durrant LG, McDowall KM, Liu DTY. Efficient isolation of trophoblastic cells from peripheral blood. *Ann NY Acad Sci.* 1994; 731: 175-7.
- 9 Bulmer AE, Billington WD, Johnson PM. Immunohistologic identification of trophoblast populations in early human pregnancy with the use of monoclonal antibodies. *Am J Obstet Gynecol.* 1984; 148: 19-26
- 10 Chua S, Wilkins T, Sargent IL, et al. Trophoblast deportation in pre-eclamptic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 98: 973-9
- 11 Jhansen M, Redman C, Wilkins T, et al. Trophoblast deportation in human pregnancy: its relevance for pre-eclampsia. *Placenta.* 1999; 20: 531-9
- 12 Redman C, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 180: 499-506
- 13 Anderson DJ, Johnson PM, Alexander NJ, et al. Monoclonal antibodies to human trophoblast and sperm antigens: report of two WHO-sponsored workshops, June 30, 1986-Toronto, Canada. *J Reprod Immunol.* 1987; 10: 231-57.
- 14 Mueller UW, Hawes CS, Jones WR. Identification of extra-villous trophoblast cells in human decidua using an apparently unique murine monoclonal antibody. *Histochem J* 1987; 19: 288-90
- 15 Latham SE, Hawes CS, Jones WR, et al. A monoclonal antibody to human placental lactogen hormone facilitates isolation of fetal cells from maternal blood. *Prenat Diagn.* 1996; 16: 813-21.
- 16 Nickson DA, McBride MW, Zeinali S, et al. Molecular cloning and expression of human trophoblast antigen FDO 151G and its identification as a 3 beta-hydroxy-6 ene steroid *J Reprod Fertil.* 1991; 93: 149-56
- 17 Douglas GW, Thomas L, Carr M, et al. Trophoblast in the circulating blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1959; 78: 969-73
- 18 Lo YM, Tein MSC, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998; 62: 768-75
- 19 Huppertz B, Kaufmann P, Kingdom JCP. Trophoblast turnover in health and disease. *Fetal Matern Med Rev.* 2002; 13: 17-32
- 20 Beinder E, Huch A, Huch R. Peripheral skin temperature and microcirculatory reactivity during pregnancy. *J Perinat Med.* 1990; 48: 383-90
- 21 Esteve E, Saudeau L, Pierre F, et al. Signes cutanes physiologiques au cours de la grossesse normale: étude de 60 femmes enceintes. *Ann Dermatol Vénéreol.* 1994; 121: 227-31.
- 22 Schaaps JP, Tsatsaris V, Goffin R, et al. Shunting the intervillous space: new concepts in uteroplacental vascularization. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192: 323-32
- 23 Niden AH, Aviado DM Jr. Effects of pulmonary embolism on the pulmonary circulation with special reference to arteriovenous shunts in the lungs. *Circ Res.* 1958; 4: 67-73
- 24 Thomas L, Douglas GW, Carr MC. The continuous migration of syncytial trophoblast from the human placenta into the maternal circulation. *Trans Assoc Am Physicians.* 1959; 72: 70-8
- 25 Lo YM, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 1999; 64: 218-24
- 26 Luz, NP. Chorionic structures in maternal blood [abstract]. *Nature Preceding: pre-publication research and preliminary findings* [Internet]: [citado: 2007 Dec 13]. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10101/npre.2007.1393.1>
- 27 Jerzak M, Bishop C. Apoptosis in the first trimester human placenta: the role in maintaining immune privilege at the maternal/fetal interface and in trophoblast remodeling *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2002; 100: 138-42.
- 28 Salazar H, González-Angulo A. The fine structure of human chorionic villi and placental transfer of iron in late pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1967; 97: 851-65
- 29 Winn RM. Comparative electron microscopy of the placenta junctional zone. *Obstet Gynec.* 1967; 29: 644-66
- 30 Bagshawe KD. Immunologic aspects of trophoblast. *J Obst Gynaecol Br Commonw.* 1967; 829-33

Endereço para correspondência:
 NILO PEREIRA LUZ
 Av. Padre Cacique 266 apto 301
 CEP 90810-240, Porto Alegre, RS, Brasil
 Telefone/fax : (51) 3231-3277
 E-mail: nilopereiraluz@terra.com.br