LÍLIA ARAÚJO MOURA LIMA DE OLIVEIRA

**Frequência das contrações uterinas em gestações gemelares
assintomáticas em uso de progesterona natural:
estudo randomizado, duplo cego, placebo controlado**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Profa. Dra. Maria de Lourdes Brizot

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Lília Araújo Moura Lima de

Frequência das contrações uterinas em gestações gemelares assintomáticas em uso de progesterona natural : estudo randomizado, duplo cego, placebo controlado / Lília Araújo Moura Lima de Oliveira. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetria e Ginecologia

Orientadora: Maria de Lourdes Brizot.

Descritores: 1.Gestão gemelar 2.Contração uterina 3.Progesterona
4.Prematuridade 5.Monitorização uterina 6.Placebo

USP/FM/DBD-171/15

Quando elevo os meus olhos
não vejo a glória e o sucesso,
mas as novas oportunidades de melhor servir.

Quando elevo os meus olhos
não me vejo só,
pois como Tu, colhi amigos pelo caminho.

Quando elevo os meus olhos
vejo que em todo o tempo Tu estavas lá,
tão perto, que nem sempre Te percebi.

Então, a Ti, Senhor, dedico o fruto do meu trabalho,
que já era Teu antes de ser meu.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Valdemir** e **Dalila**, pelo amor, pelos valores ensinados e por toda a dedicação e esforço que me possibilitaram chegar aqui. Minha dívida, admiração e gratidão são eternas.

Ao meu querido esposo **José Martins**, que torna difícil acreditar ser possível existir alguém mais gentil, compreensivo, companheiro e amoroso para dividir a vida. Sua paciência e apoio constantes foram fundamentais.

Ao meu amado filho **Vinícius**, herança preciosa que alegra nossos dias.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora **Profa. Dra. Maria de Lourdes Brizot**, obrigada por acreditar na minha capacidade e por me conduzir nesta trajetória com tanta sabedoria e paciência. Minha admiração por seu caráter íntegro, sua competência profissional e científica, além de sua energia e firmeza que nos tornam pessoas capazes de ir além.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Marcelo Zugaib**, digníssimo Professor Titular de Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de convivência e aprendizado na mais conceituada Clínica Obstétrica do país.

Ao **Prof. Dr. Adolfo Wenjaw Liao**, a quem aprendi, em todos os anos de convivência, a admirar, não apenas como excelente profissional, mas também como ser humano de qualidades excepcionais e generosidade incríveis. Agradeço pelos ensinamentos compartilhados e pelas valiosas considerações feitas na fase de qualificação do trabalho.

Ao **Prof. Dr. Roberto Eduardo Bittar**, pela contribuição e preciosas considerações dispensadas na fase de qualificação do trabalho. Seu conhecimento científico e firmeza são admiráveis.

Ao **Dr. Silvio Martinelli**, pelo cuidado e atenção dispensados ao trabalho na fase de qualificação.

À **Profa. Dra. Rossana Pulcineli Francisco**, coordenadora da Pós-Graduação do Departamento de Obstétrica, pela oportunidade ímpar.

Aos médicos assistentes do Setor de Gestações Múltiplas da Clínica Obstétrica, **Dr. Wagner Hernandez e Dra. Mariana Miyadahira**, pela convivência nesses anos, além do companheirismo de cada dia e da gentileza em dividir sempre o conhecimento.

Aos assistentes da Clínica Obstétrica e da Medicina Fetal **Prof. Dr. Mario Henrique Burlacchini de Carvalho, Dr. Antônio Gomes de Amorim Filho, Prof. Dr. Vitor Bunduki, Prof. Dr. Seizo Miyadahira, Profa. Dra. Roseli Mieko Yamamoto Nomura e Prof. Dr. Soubhi Kahhale**, pelos preciosos ensinamentos que tanto contribuíram na minha formação profissional e científica.

À **Dra. Renata Almeida de Assunção**, querida amiga e companheira desde o início desta jornada, sempre me estimulando com a sua energia e dinamismo tão ímpares. Nossa convivência e amizade se fortaleceram nestes anos, e isso nos tornou mais enriquecidas.

Às Dras. **Maria Cláudia Afonso, Julianny Cavalheiro Nery Nakano, Carolina Bastos Maia, Marcela Vieira Xavier e Sônia Christina Leme Stach**, amigas e companheiras de pós-graduação, que participaram juntas deste desafio. Minha gratidão pela convivência, pelas palavras de incentivo e pelos muitos momentos alegres compartilhados.

Aos **Residentes e Estagiários da Medicina Fetal**, pela convivência e companheirismo.

A todos os **médicos assistentes da Clínica Obstétrica** do HCFMUSP, por estarem sempre dispostos a dividir os seus conhecimentos.

À Srta. **Aghata Rodrigues**, pela participação na análise estatística desta dissertação.

Às Sras. **Lucinda Cristina Pereira, Soraia Cristina Ferreira da Silva, Raquel Costa Cândido e Marina Martins da Silva**, secretária e funcionárias administrativas da Clínica Obstétrica, por toda a ajuda e gentileza nos mais diferentes momentos.

A todas as gestantes do Setor de Gemelidade da Clínica Obstétrica, motivo maior da realização deste trabalho.

Aos meus familiares, amigos e colegas de trabalho, por sempre me estimularem na busca pelo conhecimento e se alegrarem com minhas conquistas.

A todas as pessoas que colaboraram de variadas maneiras para a execução desta dissertação.

NORMALIZAÇÃO

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade da São Paulo Faculdade de Medicina de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Fredd, Maria F. Crestana, Marinalva se Souza Araújo, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo. Divisão de Biblioteca e Documentação, 2011.

Abreviação dos títulos dos periódicos de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	10
3	REVISÃO DA LITERATURA	12
3.1	Músculo uterino	13
3.2	Características da contração uterina	15
3.3	Monitorização diária da atividade uterina	17
3.4	Progesterona e prematuridade em gestações gemelares	21
3.5	Monitorização da contração uterina em gestações gemelares	24
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	27
4.1	Delineamento da pesquisa	28
4.2	Ética em pesquisa	28
4.3	Seleção das pacientes	29
4.3.1	CrITÉRIOS de inclusão	29
4.3.2	CrITÉRIOS de exclusão	30
4.4	Procedimento para coleta de dados	30
4.4.1	Randomização	30
4.4.2	Execução do estudo	31
4.4.3	Acompanhamento ultrassonográfico das gestantes	32
4.4.4	Datação da gestação	33
4.4.5	Determinação da corionicidade	34
4.4.6	Avaliação das contrações uterinas	34
4.4.7	Obtenção dos dados da gestação	37

4.5	Variáveis estudadas	37
4.5.1	Dados clínico-epidemiológicos	37
A	Variáveis maternas	37
B	Variáveis da gestação	38
4.5.2	Características das contrações uterinas	39
A	Variáveis maternas	39
B	Variáveis das contrações uterinas na tocografia	39
4.6	Armazenamento dos dados	39
4.7	Análise estatística	39
4.7.1	Cálculo do Tamanho Amostral	39
4.7.2	Testes Estatísticos	41
5	RESULTADOS	42
5.1	Características epidemiológicas e gerais da população	44
5.2	Características das gestações nos grupos progesterona e placebo	45
5.3	Avaliação das contrações uterinas pela Tocografia	46
5.3.1	Casuística	46
5.3.2	Frequência das contrações uterinas	48
5.3.3	Comparação da frequência média das contrações uterinas entre os grupos progesterona e placebo	50
5.4	Frequência média das contrações uterinas e idade gestacional no parto	52
5.5	Frequência média das contrações uterinas, colo uterino e corionicidade da gestação	55
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	72
8	ANEXOS	74
9	REFERÊNCIAS	79

LISTAS

ABREVIATURAS E SIGLAS

ACOG	<i>“American College of Obstetricians and Gynecologists”</i>
DC	dicoriônica
DP	desvio-padrão
et al	e outros
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IG	idade gestacional
IL	interleucina
IMC	índice de massa corpórea
MC	monocoriônica
MDAU	monitorização domiciliar da atividade uterina
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	nível descritivo de probabilidade
STFF	Síndrome da transfusão feto-fetal
TNF	fator de necrose tumoral
VS	versus

SÍMBOLOS

%	Por cento
<	Menor que
>	Maior que
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
±	Mais ou menos

TABELAS

Tabela 1 -	Características epidemiológicas e gerais das gestações gemelares nos grupos progesterona e placebo (HCFMUSP – junho de 2007 a outubro de 2013)	44
Tabela 2 -	Características das gestações gemelares nos grupos progesterona e placebo (HCFMUSP – junho de 2007 a outubro de 2013)	45
Tabela 3 -	Comparação da frequência média das contrações uterinas entre os grupos progesterona e placebo nas diferentes idades gestacionais (HCFMUSP – junho de 2007 a outubro de 2013)	50
Tabela 4 -	Comparação dos partos ocorridos abaixo de 34 semanas e abaixo de 37 semanas em gestações gemelares, entre os grupos progesterona e placebo (HCFMUSP – junho de 2007 a outubro de 2013).....	52
Tabela 5 -	Comparação da frequência média das contrações uterinas em gestações gemelares, em relação à idade gestacional no parto, entre os grupos progesterona e placebo (HCFMUSP – junho de 2007 a outubro de 2013)	54
Tabela 6	Comparação da idade gestacional média no parto entre as gestações gemelares monócóricas e dicóricas (HCFMUSP – junho de 2007 a outubro de 2013)	56
Tabela 7 -	Comparação dos partos ocorridos abaixo de 34 semanas e acima de 34 semanas entre as gestações gemelares monócóricas e dicóricas (HCFMUSP – junho de 2007 a outubro de 2013).....	56

FIGURAS

Figura 1	Registro gráfico de tocografia com ausência de contrações uterinas	36
Figura 2 -	Registro gráfico de tocografia com presença de três contrações uterinas	36
Figura 3 -	Fluxograma das gestantes na avaliação das contrações uterinas nos grupos progesterona e placebo	47
Figura 4 -	Distribuição da frequência média das contrações uterinas em 336 gestações gemelares, nas idades gestacionais de 24 a 34 semanas (HCFMUSP – junho de 2007 a outubro de 2013)	49
Figura 5 -	Distribuição da frequência média das contrações uterinas em gestações gemelares, em uso de progesterona (n = 166) e uso de placebo (n = 170), nas idades gestacionais de 24 a 34 semanas (HCFMUSP – junho de 2007 a outubro de 2013)	51

RESUMO

Oliveira LAML. *Frequência das contrações uterinas em gestações gemelares assintomáticas em uso de progesterona natural: estudo randomizado, duplo cego, placebo controlado* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Objetivos: O presente estudo teve como objetivo comparar a frequência das contrações uterinas em gestações gemelares em uso da progesterona natural e de placebo. **Método:** Estudo randomizado, duplo-cego, placebo controlado, realizado no período de 01 de junho de 2007 a 31 de outubro de 2013. Participaram do estudo 341 gestantes, com 170 randomizadas no grupo progesterona e 171 no grupo placebo. Todas as gestantes realizaram exame de tocografia no período de 24 a 34 semanas e 6 dias, com duração de trinta minutos, a cada três semanas. A contração uterina foi definida como uma elevação da linha de base com amplitude acima de 5 mm e duração mínima de trinta segundos. Na comparação da frequência das contrações uterinas entre os grupos, nas diferentes idades gestacionais, utilizou-se o teste t de Student. O modelo de análise GEE - modelo generalizado de equações de estimação – foi utilizado na comparação, entre os grupos, da frequência das contrações uterinas em relação à idade gestacional no parto, e também na avaliação da interação da frequência das contrações uterinas com a medida do colo uterino e a corionicidade. **Resultados:** As características epidemiológicas e gerais das gestantes foram semelhantes nos dois grupos. A frequência média das contrações uterinas diferiu entre os grupos apenas na 34ª semana ($P = 0,005$), com frequência maior de contrações no grupo progesterona ($4,81 \pm 3,24$) em relação ao grupo placebo ($2,73 \pm 2,06$). Não houve diferença significativa na comparação da frequência média das contrações uterinas e a idade gestacional no parto (< 28 sem, < 32 sem, < 34 sem e < 37 semanas) entre os grupos. Não foi observada interação da frequência das contrações uterinas com a medida do colo uterino ou com a corionicidade da gestação, em relação aos grupos progesterona ou placebo. **Conclusão:** O uso da progesterona natural não interfere na frequência das contrações uterinas nas gestações gemelares abaixo de 34 semanas gestacionais.

Descritores: 1.Gestação gemelar 2.Contração uterina 3.Progesterona 4.Prematuridade 5.Monitorização atividade uterina 6.Placebo

SUMMARY

Oliveira LAML. *Uterine contractions frequency in asymptomatic twin pregnancies under natural progesterone use: a randomized, double-blind, placebo-controlled study* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Objectives: The aim of this study was to compare uterine contraction frequency in twin pregnancies in use of natural progesterone and placebo.

Methods: Randomized, double-blind, placebo-controlled study, conducted between June 1, 2007 to October 31, 2013. The study included 341 twin pregnancies, with 170 randomized in the progesterone group and 171 in the placebo group. All pregnancies had uterine contraction registration by tocodynamometry every three weeks, during 30 minutes between 24 to 34 weeks and 6 days. Uterine contraction was defined as an amplitude greater than 5 mm, from baseline registration, and a duration longer than 30 seconds. Comparison of contraction frequency between the groups at different gestational ages was examined using the parametric student t test. The model GEE - generalized estimating equation model – was used in the comparison, between the groups, the uterine contraction frequency according gestational age at delivery, and also for evaluating the interaction of the frequency contractions with cervical length and chorionicity. **Results:** Epidemiological and general characteristics of the pregnant woman were similar in both groups. At the 34 weeks, was only gestational age that presented difference ($P = 0.005$) in the mean uterine contraction frequency between progesterone (4.81 ± 3.24) and placebo (2.73 ± 2.06) groups. No difference in the mean uterine contraction frequency was observed between progesterone and placebo groups in relation to gestational age at delivery. Cervical length measurement and chorionicity did not influence the uterine contraction frequency according to progesterone or placebo. **Conclusion:** The use of natural progesterone in twin pregnancies does not affect the uterine contraction frequency before 34 weeks gestation.

Descriptors: 1.Twin pregnancy 2.Uterine Contraction 3.Progesterone 4.Prematurity 5. Uterine Activity Monitoring 6. Placebo

1 INTRODUÇÃO

Define-se como gestação múltipla aquela proveniente de um ou mais ciclos ovulatórios onde acontece, dentro do organismo materno, o desenvolvimento de mais de um zigoto ou a divisão de um mesmo, independente do número final de neonatos. Cada produto da gestação múltipla denomina-se gêmeo ⁽¹⁾.

As gestações gemelares vêm apresentando aumento global em incidência, nos últimos anos, e esse efeito está relacionado a alguns fatores como: mudança de comportamento das mulheres, postergando a gravidez para um período mais tardio de suas vidas; uso de indutores de ovulação e avanço nas técnicas de reprodução assistida.

No Estado de São Paulo, os dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde – DATASUS / SINASC – fonte oficial de dados do governo, mostram que, em 2012, houve 14036 nascimentos de gestação dupla, correspondendo ao total de 2,27 % dos nascidos vivos. No mesmo ano, no município de São Paulo, houve 5186 nascimentos de gestação dupla, um total de 2,65 % dos nascidos vivos ⁽²⁾.

Apesar de a gestação gemelar ocorrer em aproximadamente 1/80 gestações, correspondendo a 2,6% dos nascidos vivos, ela responde por 12,2% dos partos prematuros e 15,4% das mortes neonatais ^(3,4).

Entre as mulheres com gestações gemelares, mais de 50% terão o parto antes de 37 semanas, e quase 12%, antes de 32 semanas completas

de gestação, primariamente devido ao trabalho de parto prematuro ⁽⁵⁾. Em decorrência desse fato, observa-se uma taxa de mortalidade neonatal nas gestações gemelares de seis a sete vezes maior que nas únicas ⁽⁶⁾.

Fujita et al. ⁽⁷⁾, em 2002, em estudo com 172 gestações gemelares, observaram que a idade gestacional média do parto foi de 36,1 semanas, sendo que 26 (15,1%) das gestantes entraram em trabalho de parto antes de 34 semanas.

No Estado de São Paulo, no ano de 2012, as gestações gemelares responderam por 14,8% de todos os partos ocorridos abaixo de 32 semanas e 11,1% daqueles abaixo de 36 semanas gestacionais ⁽²⁾. No mesmo Estado, entre os anos de 2008 e 2012, o aumento dos partos de gestações gemelares ocorridos entre 32 e 36 semanas foi de 28,27%, enquanto que, no município de São Paulo, foi de 29,67% ⁽²⁾.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o trabalho de parto prematuro é definido como aquele que ocorre antes de 37 semanas de gestação, sendo responsável por 75% a 95% de todas as mortes neonatais não resultantes de malformação.

Os fatores de risco associados à prematuridade são conhecidos há décadas, porém a sua fisiopatologia permanece obscura e com muitas controvérsias.

O caminho comum para o parto em humanos é definido como uma soma de eventos anatômicos, fisiológicos, bioquímicos, endócrinos, imunológicos e clínicos que ocorrem na mãe e no feto, tanto no termo como

no pré-termo da gestação ⁽⁸⁾. O evento particularmente mais conhecido em todo esse processo é o componente uterino, porque ele é clinicamente aparente tanto para a gestante quanto para o médico. Esse componente inclui o aumento da contratilidade uterina, o amadurecimento cervical (dilatação e esvaecimento) e a ativação das membranas deciduais (ruptura). Porém, o trabalho de parto é acompanhado por profundas mudanças em outros sistemas do organismo materno, que são os componentes extrauterinos desse processo ⁽⁹⁻¹¹⁾.

O parto prematuro é consequência de múltiplas ações fisiopatológicas que ativam o caminho habitual para o parto antecipadamente, de maneira sincrônica ou não. Os seguintes mecanismos têm sido implicados: infecções ou inflamações intrauterinas, isquemia intrauterina, sobredistensão uterina, alterações cervicais e distúrbios endócrinos⁽⁹⁾. É aceitável que, nas gestações gemelares, todos esses estímulos possam aumentar devido à presença de dois fetos, maior quantidade de tecido placentário e maior volume de líquido amniótico.

Admite-se que, no trabalho de parto, o aparecimento das contrações uterinas coordenadas seja consequente a eventos fisiológicos em que participam vários processos bioquímicos, maternos, fetais e placentários, tais como: alterações da atividade elétrica da célula miometrial, aumento do número de *gap junctions* e do número de receptores de ocitocina na célula miometrial, e predomínio da ação estrogênica em relação à progesterônica.

Desde a descoberta da progesterona por Corner e Allen, em 1929, ela tem sido chamada de hormônio da gravidez. O corpo lúteo é o responsável pela produção da progesterona nas primeiras seis a oito semanas da gestação, até que, a partir daí, a placenta realiza essa função, em maiores quantidades e de maneira crescente ao longo de toda a gravidez humana ⁽¹³⁾.

A progesterona é chamada de natural porque está presente na natureza, em humanos e animais (ovários, placenta, testículos e adrenal). Os seus precursores estão presentes nos vegetais, como a soja e o inhame, e constituem a principal fonte de produção da progesterona natural comercializada ⁽¹⁴⁾.

A progesterona promove a quiescência do miométrio uterino, a inibição da formação das *gap junctions*, a inibição do amadurecimento cervical pela diminuição da produção das prostaglandinas, a diminuição da produção das citocinas pelas membranas coriônicas, a inibição de processos inflamatórios mediados pelos linfócitos T e, ainda, a criação de barreira no muco cervical, impedindo a ascensão de agentes patogênicos ^(10,15). Dessa forma, constata-se a real importância da progesterona na manutenção da gestação.

A inatividade uterina é mantida, por toda a gestação, pela progesterona e pelos receptores, mediados pela progesterona, que inibem os estímulos inflamatórios e suprimem a ação de genes na contratilidade uterina ⁽¹⁵⁻¹⁸⁾. Os possíveis mecanismos responsáveis pela manutenção do relaxamento uterino seriam a diminuição: dos receptores de estrogênio, dos

receptores beta 2, dos receptores de ocitocina, do cálcio livre intracelular, e ainda a inibição da resposta inflamatória e da apoptose na membrana amniótica ⁽¹⁴⁾.

A ação da progesterona na inibição da contração uterina *in vitro* foi investigada por Ruddock et al. ⁽¹⁹⁾, em 2008, utilizando biópsias de segmento uterino obtido em cesáreas. O estudo concluiu que a progesterona natural inibe diretamente a contratilidade uterina, em concentrações equivalentes àsquelas presentes na placenta e no útero, com ação reversível e rápida.

Anderson et al. ⁽²⁰⁾, em 2009, estudando os efeitos *in vitro* da progesterona sobre a contração uterina, demonstraram que a progesterona em altas concentrações exerce uma consistente, rápida e sustentada inibição da amplitude da contração uterina.

Nas décadas de 1970 e 1980, estudos iniciais foram realizados com a progesterona sintética (caproato de 17- α -hidroxiprogesterona), mostrando eficácia na prevenção do parto prematuro ^(21,22). Porém, o tema foi retomado apenas, em 2003, com o estudo pioneiro realizado na Clínica Obstétrica do HCFMUSP por Fonseca et al. ⁽²³⁾, um ensaio clínico duplo cego e placebo controlado, envolvendo 142 gestações únicas com fatores de risco para prematuridade, e utilizando progesterona natural vaginal em dose diária de 100 mg entre 24 e 34 semanas de gestação. Verificou-se, nesse estudo, redução significativa das taxas de parto prematuro antes de 37 semanas em gestantes com antecedentes de risco, assim como redução da frequência das contrações uterinas no grupo das pacientes que utilizaram a progesterona. Esse estudo possibilitou uma nova intervenção na prevenção

do parto prematuro, sendo responsável por reativar a ideia da importância da progesterona nesse propósito.

Diversos estudos posteriores confirmaram a eficácia da progesterona sintética ou natural na redução das taxas de parto prematuro ^(21,22,24,25).

Entretanto, nas gestações gemelares, diversos estudos demonstraram não haver redução nas taxas de prematuridade com o uso da progesterona, quer sintética ou natural.

Eddama et al. ⁽²⁶⁾, em 2010, Klein et al. ⁽²⁷⁾, em 2011, e ainda outros ^(28,29) demonstraram que o uso da progesterona, tanto na sua forma injetável como na vaginal, não produziu benefícios, nem promoveu diminuição na incidência da prematuridade, não justificando, dessa forma, o seu uso rotineiro nas gestações gemelares.

Estudo realizado na Clínica Obstétrica do HCFMUSP por Brizot et al. ⁽³⁰⁾, em 2015, envolvendo 390 gestações gemelares sem antecedentes de parto prematuro, concluiu que o uso da progesterona natural não diminuiu as taxas de prematuridade, nem reduziu a morbidade e a mortalidade neonatais.

A etiologia da diferença da atividade uterina entre gestações únicas e múltiplas permanece ainda envolta em muitos questionamentos, mas inclui possibilidades como: alterações do tônus uterino secundário à sobredistensão, alterações hormonais resultantes do desequilíbrio entre as placentas fetais ou o próprio aumento da atividade intrauterina produzida pela presença de dois fetos ⁽¹⁵⁾.

Turton et al. ⁽³¹⁾, em 2013, realizaram estudo *in vitro*, usando biópsias uterinas obtidas em cesáreas e observaram diferenças significantes na atividade contrátil do miométrio, com maior frequência de contrações nas gestações gemelares, quando comparadas com gestações únicas.

Estudos clínicos em gestações gemelares também mostram um nítido aumento da frequência das contrações uterinas, precedendo o aparecimento das evidências clínicas do trabalho de parto prematuro ⁽³²⁾.

Newman et al. ⁽³³⁾, em 1986, compararam o comportamento da atividade uterina em 22 gestações únicas e 18 gemelares, realizando monitoramento das contrações uterinas, diariamente, e observaram que a frequência das contrações uterinas esteve aumentada nas gestações gemelares.

Garite et al. , em 1990 ⁽³⁴⁾, mostraram que, nas gestações gemelares, a média da frequência das contrações uterinas, entre 24 e 36 semanas, aumenta em mulheres com história de parto prematuro anterior quando comparada com aquelas sem esse antecedente. Ainda, nesse estudo, descreveram um aumento significativo da atividade uterina, 24 horas antes do desenvolvimento dos primeiros sinais clínicos do trabalho de parto prematuro.

Embora vários estudos tenham mostrado que a progesterona não diminui as taxas de prematuridade nas gestações gemelares, a importância da contração uterina na antecipação do momento do parto e as lacunas da literatura em trabalhos sobre a ação da progesterona na contração uterina

nas gestações gemelares motivaram a realização deste estudo, em que se compara a frequência das contrações em gestações gemelares em uso de progesterona natural e de placebo. Dessa forma, a intenção foi observar se, nas gestações em uso da progesterona, poderia existir diminuição na frequência das contrações uterinas.

2 OBJETIVOS

O presente estudo em gestações gemelares teve como objetivos:

1 OBJETIVO PRINCIPAL

Comparar a frequência média das contrações uterinas entre as gestantes dos grupos progesterona e placebo.

2 OBJETIVO SECUNDÁRIO

Avaliar a interação do comprimento do colo uterino e da corionicidade com a frequência média das contrações uterinas, em relação aos grupos progesterona e placebo.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MÚSCULO UTERINO

O músculo uterino tem como unidade funcional a fibra muscular lisa, que é fusiforme, alongada e uninucleada. Existem junções comunicantes, conhecidas como *gap junctions*, que são "pontes" intercelulares que permitem a comunicação elétrica e metabólica entre as células miométriais, e possuem a função de coordenar as contrações. As *gap junctions* aumentam em número durante a gravidez, em especial, durante o trabalho de parto ⁽¹²⁾.

A célula muscular lisa é uma célula cujo principal componente é o filamento, na verdade, uma rede de filamentos. Alguns desses são finos (7 nm) e outros são mais grossos (15 nm). Os filamentos grossos são de miosina e os finos, de actina e tropomiosina. A bioquímica molecular da contração do músculo liso envolve o cálcio, além da ligação da actina-miosina. A contração do músculo liso sofre ação de drogas que tanto podem estimular como bloqueá-la ⁽¹²⁾.

Até 1946, os dados relacionados à contratilidade uterina eram muito escassos e não havia ainda tecnologias precisas para avaliar as contrações. Somente, a partir de 1948, Alvarez e Caldeyro-Barcia, estudiosos da Escola de Montevideu, introduziram novas técnicas que esclareceram melhor a função contrátil uterina, como a medida da pressão intraplacentária, o balão

intrauterino, a medida da pressão intra-amniótica e a medida das pressões intramiométriais ⁽³⁵⁾.

Em 1950, Alvarez e Caldeyro-Barcia relataram que “o útero nunca dorme”. Em estudos com métodos de registro utilizando manômetros e avaliando as pressões intramiométriais, eles observaram dois tipos de contrações uterinas. O primeiro tipo foi um padrão de baixa intensidade (1 - 2 mmHg) e alta frequência, que chamaram “ondas de Alvarez”. Esse padrão provavelmente traduzia locais do útero com contrações assíncronas e descoordenadas que geralmente não eram perceptíveis durante a gestação. O segundo tipo foi um padrão de baixa frequência e alta intensidade (10 mmHg – 15 mmHg), traduzido por contrações geralmente pouco dolorosas, mas frequentemente palpáveis, que seriam as conhecidas como de “Braxton-Hicks”. Esse último padrão de contrações apresentava incremento de frequência a partir da 30ª semana, com a aproximação do parto ⁽³⁶⁾.

Nos últimos dias da gestação, com o aumento das contrações de Braxton-Hicks, ocorreria a conseqüente distensão do segmento inferior do útero. Caldeyro-Barcia relata que contrações uterinas com menos de 20 mmHg geralmente não são percebidas ou palpáveis pela própria gestante. Somente contrações entre 20 mmHg e 30 mmHg mostram-se capazes de ser percebidas pela palpação abdominal, embora não sejam ainda descritas como dolorosas. Apenas contrações excedendo 30 mmHg mostram-se associadas à dor ⁽³⁶⁾.

As contrações uterinas presentes durante o trabalho de parto apresentam características próprias relacionadas à intensidade, frequência e

duração. A intensidade seria o produto de uma contração completa do músculo uterino, e sua medida seria possível apenas com a colocação de cateter no interior do útero, intra ou extra-amniótico, introduzido por via transcervical⁽³⁵⁾.

A frequência seria o número de contrações ocorridas em tempo convencional de 10 minutos (período arbitrário sugerido pela escola de Montevideu), e a duração seria o tempo transcorrido entre o início e o fim da percepção da contração uterina pela palpação abdominal⁽³⁵⁾, embora essa definição não correspondesse ao tempo real da contração.

Para dimensionar com exatidão a intensidade ou amplitude das contrações uterinas faz-se necessário utilizar medidas contraturais obtidas por histerografia interna. Os registros com tocometria externa não servem para informar a medida da intensidade das contrações. Em relação ao controle da frequência das contrações uterinas, ele pode ser realizado por qualquer método semiótico tradicional ou por métodos tocométricos mais modernos, como a tocografia⁽³⁵⁾.

3.2 CARACTERÍSTICAS DA CONTRAÇÃO UTERINA

Na intenção de melhor conhecer as características clínicas das contrações uterinas, já há muito tempo, estudos foram realizados e acabaram por descrever importantes características e comportamentos das contrações, que até hoje são usadas na orientação clínica das gestantes.

Em 1954, Reynolds et al.⁽³⁷⁾ usaram tocodinamômetros externos para descrever as contrações uterinas normais na gestação e acabaram por demonstrar o desenvolvimento de uma "dominância fúndica". No início da gestação, pressões medidas no centro e nos segmentos mais baixos do útero excedem aquelas medidas na região fúndica. Entretanto, no final da gestação, as pressões medidas no fundo uterino apresentam um aumento de intensidade, criando assim um gradiente pressórico do fundo em direção aos segmentos baixos do útero, do tipo descendente.

A frequência das contrações uterinas aumenta progressivamente com a idade gestacional. Zahn⁽³⁸⁾, em 1984, demonstrou um progressivo aumento da frequência das contrações uterinas, no último trimestre da gestação, fato também observado, em 1994, por Moore et al.⁽³⁹⁾, bem como há uma década por Reynolds et al.⁽³⁷⁾.

Ainda uma última característica da atividade uterina normal seria a variação diurna. Em 1982, Schwenzer et al.⁽⁴⁰⁾ observaram um padrão circadiano das contrações uterinas. Eles identificaram dois picos da contração uterina: o primeiro e mais proeminente ocorria entre 23:00 hs e 03:00 hs, enquanto o segundo, entre 11:00 hs e 13:00 hs.

Pode-se descrever, então, como características das contrações uterinas: o início, no fundo uterino em direção aos segmentos inferiores; o aumento, em número, com o avançar da idade gestacional e as variações cíclicas diurnas acontecendo com maior predileção em alguns horários do dia.

3.3 MONITORIZAÇÃO DIÁRIA DA ATIVIDADE UTERINA

Em 1957, Bruns et al. ⁽⁴¹⁾ descreveram excesso de contração uterina precoce entre gestantes que tiveram parto prematuro. Usando tocodinamômetros externos, eles observaram que o aumento da contração uterina precedia o início do trabalho de parto prematuro em algumas semanas. Achado semelhante foi descrito em estudo de Aubry e Penington ⁽⁴²⁾, em 1973, que constataram aumento das contrações uterinas semanas antes do início clínico das mesmas.

A partir do desenvolvimento da HUAM - *home uterine activity monitoring* (monitorização domiciliar da atividade uterina – MDAU), em 1986, vários estudos foram feitos monitorizando diariamente as contrações uterinas na gestação.

Em 1986, Katz et al. ⁽⁴³⁾ monitorizaram diariamente 34 gestações de alto risco para prematuridade (parto prematuro anterior, gestação múltipla, anomalias uterinas), e observaram que, após a idade gestacional de 30 semanas, houve diferença significativa na frequência das contrações uterinas entre as gestantes cujo parto ocorreu antes de 37 semanas e aquelas que tiveram parto de termo, com maior número de contrações no primeiro grupo.

Katz et al. ⁽⁴⁴⁾, em 1986, realizaram estudo com gestantes de alto risco para prematuridade, comparando dois grupos: o primeiro recebeu monitorização domiciliar diária das contrações uterinas (MDAU) e o segundo, apenas orientação preventiva de autopalpação das contrações

uterinas. Observaram, então, que a incidência do trabalho de parto prematuro não foi diferente entre os dois grupos. Entretanto, o diagnóstico era feito mais precocemente no grupo monitorizado, e, dessa forma, somente 12% das pacientes do grupo monitorizado tiveram parto antes de 37 semanas contra 41% do segundo grupo.

Na mesma linha de raciocínio, em 1987, Morrison et al.⁽⁴⁵⁾ fizeram o primeiro estudo randomizado prospectivo avaliando o uso da MDAU, com 67 gestantes de alto risco para parto prematuro distribuídas em dois grupos: o primeiro recebia monitorização domiciliar diária das contrações uterinas (MDAU) e o segundo, instrução de autopalpação das contrações. Um número semelhante de pacientes, em cada grupo, apresentou trabalho de parto prematuro. No entanto, 92% das pacientes do grupo da MDAU foram consideradas candidatas à tocolise contra apenas 45 % das pacientes do grupo controle. Por fim, 29 das 34 pacientes do primeiro grupo tiveram o parto com 37 semanas ou mais, contra 18 das 33 do segundo grupo.

Os estudos com a monitorização domiciliar das contrações uterinas (MDAU) sofreram muitas críticas já desde aqueles anos, sendo atribuído parte do sucesso do método, na verdade, ao grande valor existente no frequente contato que as enfermeiras perinatais mantinham diariamente com as pacientes.

Em resposta a isso, em 1989, o *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG)⁽⁴⁶⁾ publicou opinião a respeito do método, afirmando que ele não podia mostrar o seu próprio valor quando dissociado do contato diário telefônico realizado pelas enfermeiras, e recomendou,

assim, que mais estudos fossem realizados para determinar a real contribuição da monitorização domiciliar diária das contrações uterinas versus o contato diário das enfermeiras. Enquanto isso, a monitorização (MDAU) não pôde ser recomendada na rotina clínica diária, pois sua segurança havia sido estabelecida, porém sua eficácia ainda não.

Knuppel et al. ⁽⁴⁷⁾, em 1990, publicaram um trabalho randomizado prospectivo envolvendo apenas gestações gemelares. Nesse estudo, o primeiro grupo envolveu 19 gestantes com a monitorização domiciliar diária das contrações uterinas (MDAU) e contato da enfermeira perinatal. No segundo grupo, 26 gestantes foram orientadas a respeito do parto prematuro e da autopalpação da contração uterina, porém sem o contato da enfermeira perinatal. Não houve diferença estatística na incidência do trabalho de parto prematuro entre os dois grupos. No entanto, na ocasião desse diagnóstico, a medida da dilatação cervical era menor no grupo da MDAU (1,6 cm contra 2,9 cm do outro grupo), fato que proporcionou melhor resultado na tocólise e taxa de parto prematuro de 50 % no grupo monitorizado, contra 81 % no grupo controle.

Em 1991, Mou et al. ⁽⁴⁸⁾ realizaram um estudo prospectivo randomizado e multicêntrico, envolvendo 377 gestantes de risco para parto prematuro de três centros universitários distintos. O primeiro grupo (controle) incluiu 179 gestantes que foram devidamente orientadas sobre o parto prematuro e ensinadas a respeito da autopalpação da contração uterina, porém não receberam suporte de enfermeiras. O segundo grupo incluiu 198 gestantes que receberam a monitorização domiciliar das contrações uterinas

(MDAU), por duas horas, diariamente, e transmitiram os dados para um centro de estudo, sem qualquer contato com enfermeiras. A percentagem de pacientes que desenvolveram o trabalho de parto prematuro foi praticamente idêntica (24 % contra 25 %) nos dois grupos. Entretanto, o momento mais precoce em que o trabalho de parto foi diagnosticado no grupo da monitorização proporcionou uma tocólise mais eficiente, e, conseqüentemente, um aumento da idade gestacional no momento do parto (36,6 contra 34,9 semanas).

Novo parecer do *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) foi publicado, em 1992, a respeito do método da MDAU, concluindo, dessa vez, sua efetividade no diagnóstico precoce do trabalho de parto prematuro, mas o seu valor para identificar pacientes de risco e reduzir as taxas de prematuridade permanecia incerto, com evidências insuficientes para recomendá-lo como teste de *screening* para trabalho de parto prematuro em gestações de alto risco ⁽⁴⁹⁾.

Resumindo: a monitorização da frequência das contrações uterinas tem sido sugerida como um método de *screening* para identificação das gestantes com risco aumentado de parto prematuro, e é considerado um teste diagnóstico na detecção dos estágios iniciais do trabalho de parto prematuro, porém com valor preditivo baixo. Apesar de o incremento na frequência das contrações uterinas ser esperado, precedendo o trabalho de parto prematuro, seu valor clínico não está bem claro. O uso clínico ambulatorial da monitorização das contrações uterinas não tem se mostrado útil na redução da taxa do parto prematuro ⁽⁵⁰⁾. Outras variáveis podem

afetar a frequência das contrações, como a duração da gestação, o período do dia, os antecedentes da gestante em relação à prematuridade e ainda as características físicas maternas.

Na nossa prática clínica diária, em especial no acompanhamento pré-natal de gestações gemelares ou gestações de risco por associação com doenças maternas ou fetais, utilizamos, com frequência, a tocografia como método de monitorização das contrações uterinas, quando a gestante refere dores suspeitas de atividade contrátil do útero, sempre na intenção de detectar a presença dessas contrações.

3.4 PROGESTERONA E PREMATURIDADE EM GESTAÇÕES GEMELARES

De maneira contrária à observada nas gestações únicas ⁽²²⁻²⁵⁾, o uso da progesterona em gestações gemelares não tem mostrado benefício no sentido de diminuir as taxas de prematuridade nessas gestações ⁽⁵¹⁾.

Rouse et al. ⁽⁵²⁾, em 2007, em estudo randomizado com 661 gestações gemelares, entre 16 e 34 semanas gestacionais, compararam o uso semanal da progesterona injetável (250 mg de caproato de 17-OHPC) com o placebo, e observaram que não houve diminuição nas taxas de partos ocorridos abaixo de 35 semanas nas gestantes que usaram a progesterona.

Em 2009, Norman et al. ⁽⁵³⁾, em estudo randomizado com 500 gestações gemelares, compararam o uso diário da progesterona vaginal (90 mg) com o placebo, e novamente não encontraram, com o uso da

progesterona, diminuição nos índices de partos ocorridos antes de 34 semanas gestacionais.

Eddama et al. ⁽²⁶⁾, em 2010, em estudo duplo cego, placebo controlado, realizado com 500 mulheres com gestações gemelares que usaram diariamente gel de progesterona via vaginal (90 mg), a partir de 24 semanas da gestação, observaram que a progesterona não reduziu a incidência do parto prematuro.

Klein et al. ⁽²⁷⁾, em 2011, em estudo duplo cego, placebo controlado, realizado com 677 mulheres com gestações gemelares que usaram óvulos de progesterona micronizada, via vaginal, a partir de 20 a 24 semanas até 34 semanas da gestação, também chegaram à observação final de que a progesterona não preveniu o parto prematuro.

Klein et al. ⁽⁵⁴⁾, em 2011, realizaram estudo randomizado com 72 gestações gemelares de alto risco (colo curto, parto abaixo de 34 semanas em gestação anterior ou história prévia de aborto após 12 semanas), com uso diário de progesterona vaginal e placebo, entre 20 e 34 semanas, e não observaram efeito significativo da progesterona na prevenção do parto antes de 34 semanas gestacionais nessa população de risco selecionada.

Ainda, em 2011, Rode et al. ⁽⁵⁵⁾, em estudo randomizado com 677 gestações gemelares, provenientes de 17 centros hospitalares da Dinamarca e da Áustria, em uso da progesterona vaginal (utrogestan[®]) e do placebo, entre 20 e 34 semanas gestacionais, não observaram diminuição

significante no número de partos ocorridos antes de 34 semanas no grupo que fez uso da progesterona.

Em estudo randomizado realizado na Espanha em 2012, envolvendo cinco centros hospitalares e 290 gestantes, Serra et al. ⁽⁵⁶⁾ compararam três diferentes grupos de gestações gemelares entre 20 e 34 semanas: grupo com uso diário de 200 mg de progesterona vaginal, com uso diário de 400 mg de progesterona vaginal e com uso diário de placebo. Buscando comparar a eficácia de diferentes doses da progesterona na prevenção do parto prematuro, ao final do estudo, observaram que a dose de 400 mg de progesterona não se mostrou superior a de 200 mg, e ambas não mostraram eficácia na prevenção do parto prematuro, com semelhança nas idades gestacionais dos partos nos três grupos avaliados.

Schuit et al. ⁽⁵⁷⁾, em 2012, publicaram uma meta-análise envolvendo dez importantes estudos randomizados duplo cegos, placebos controlados, com uso da progesterona injetável (17-OHPC) ou progesterona natural vaginal para a prevenção do parto prematuro em gestações gemelares. Apenas um desses dez estudos, que envolveu 67 mulheres com gestações gemelares em uso de 100 mg de progesterona natural vaginal, observou redução nas taxas de parto antes de 37 semanas de gestação. Em todos os demais estudos, o uso da 17-OHPC ou da progesterona natural vaginal não mostrou redução significativa nas taxas de parto prematuro ou nas perdas fetais.

3.5 MONITORIZAÇÃO DA CONTRAÇÃO UTERINA EM GESTAÇÕES GEMELARES

A HUAM (home uterine activity monitoring) - monitorização domiciliar da atividade uterina (MDAU) é um método que pode detectar, de forma mais precoce, o trabalho de parto e, dessa maneira, proporcionar o tratamento desse evento antes que mudanças no colo possam se tornar muito avançadas. Na nossa prática clínica diária, a monitorização da atividade uterina é feita com a utilização da tocografia, método, na atualidade, bastante presente em grande parte dos centros hospitalares de referência na assistência às gestações de alto risco, como é o caso das gestações gemelares.

A utilidade dessa monitorização em gestações gemelares pode ser reforçada por estudo que demonstrou um aumento clínico da atividade uterina, antecedendo 24 a 72 horas o início do trabalho de parto ⁽³⁴⁾.

Estudos com monitorização das contrações uterinas demonstraram que as gestações gemelares têm maior frequência de contrações que as únicas ^(32,33). Newman et al. ⁽⁵⁸⁾, em 1987, estudaram o significado das contrações uterinas de baixa amplitude e alta frequência para determinar o significado clínico desse padrão contrátil uterino. Em 142 gestantes que passaram pela monitorização diária da contração uterina, entre 23 e 36 semanas, as que desenvolveram partos prematuros demonstraram esse padrão de contração mais frequentemente que as mulheres que tiveram

parto a termo. Paridade e idade gestacional não afetaram a ocorrência desse padrão contrátil, mas ele foi mais prevalente nas gestações múltiplas.

Knuppel et al. ⁽⁴⁷⁾, em 1990, avaliaram 19 gestações gemelares que foram submetidas à monitorização diária da atividade uterina, entre 20 e 34 semanas, e compararam com 26 gestações gemelares que foram apenas orientadas sobre os sinais e sintomas clínicos do trabalho de parto. Observaram que as taxas de parto prematuro foram um terço menor no primeiro grupo, devido à antecipação no diagnóstico do trabalho de parto pela monitorização das contrações, fato que possibilitou a intervenção mais precoce pela tocólise, com melhores resultados finais.

Newman et al. ⁽⁵⁹⁾, em 2006, compararam as contrações uterinas de 306 gestações únicas e 59 gemelares, entre 22 e 36 semanas, e observaram uma frequência média de contrações uterinas maior nas gestações gemelares, independentemente da idade gestacional, e entre 16:00 hs e 03:59 hs do dia.

Hernandez et al. ⁽⁶⁰⁾, em 2008, estudaram as diferenças da frequência média das contrações uterinas em 7891 gestações gemelares, entre 24 e 34 semanas, comparando, retrospectivamente, três grupos: grupo controle, com gestantes sem trabalho de parto prematuro e parto ocorrido em idade ≥ 36 semanas; grupo 1, com gestantes com trabalho de parto prematuro e parto ocorrido em idade < 36 semanas e grupo 3, com gestantes com trabalho de parto prematuro e parto ocorrido em idade ≥ 36 semanas. Observaram que a frequência das contrações uterinas foi maior no terceiro trimestre e nas

gestações gemelares com trabalho de parto prematuro na gestação, com ou sem posterior parto prematuro (< 36 semanas).

Em relação à monitorização das contrações uterinas em gestantes em uso de progesterona para prevenção do parto prematuro, temos o trabalho de Fonseca et al. ⁽²³⁾, em 2003. Em estudo randomizado, duplo cego, placebo controlado, com 142 gestações únicas, com fatores de risco para prematuridade e utilizando progesterona natural vaginal, entre 24 e 34 semanas de gestação, relataram redução significativa das taxas de parto prematuro, antes de 37 semanas, em gestantes com antecedentes de risco, assim como redução da frequência das contrações uterinas no grupo das pacientes que utilizaram a progesterona.

O'Brien et al. ⁽⁶¹⁾, em 2010, avaliaram, em estudo retrospectivo, a frequência das contrações uterinas em 388 gestações únicas que receberam caproato de 17- α -hidroxiprogesterona (17-OHP) para prevenção do parto prematuro. Compararam a frequência das contrações três dias antes e três depois da administração da progesterona. Observaram que a média da frequência das contrações uterinas foi maior nas gestantes que tiveram subsequente parto prematuro em relação àquelas que tiveram o parto de termo. Porém, não houve diferença entre os dois grupos na frequência das contrações uterinas após a administração da progesterona.

Na literatura, não foram encontrados estudos comparativos do comportamento da frequência das contrações uterinas em gestações gemelares, sob uso de progesterona ou placebo, para a prevenção da prematuridade.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Este foi um estudo randomizado duplo cego, placebo controlado, realizado no ambulatório de gestação múltipla da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), no período de 01 de junho de 2007 a 31 de outubro de 2013. Realizou-se uma análise secundária desenvolvida a partir de estudo primário denominado "progesterona vaginal para prevenção do parto prematuro em gestações gemelares: estudo randomizado, duplo-cego, placebo controlado" ⁽³⁰⁾.

4.2 ÉTICA EM PESQUISA

O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade da Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP (418/04) (Anexo 1).

As gestantes envolvidas receberam o Termo de Consentimento livre e esclarecido e a devida orientação a respeito do estudo (Anexo 2). Após assinarem o termo, foram incluídas no estudo.

4.3 SELEÇÃO DAS PACIENTES

4.3.1 Critérios de Inclusão

Gestantes com gestações gemelares foram randomizadas de acordo com os seguintes critérios de inclusão:

- Gestações gemelares concebidas naturalmente (não provenientes de métodos de reprodução assistida);
- Gestações gemelares diamnióticas (dicoriônicas ou monocoriônicas);
- Ausência de história prévia de parto prematuro (abaixo de 37 semanas);
- Idade gestacional entre 18 e 21 semanas e 6 dias na randomização;
- Avaliação das contrações uterinas pela tocografia entre 24 e 34 semanas e 6 dias, a cada três semanas, com o mínimo de uma avaliação no estudo;
- Ausência de malformações estruturais fetais maiores, em qualquer um dos gêmeos, determinadas ao exame ultrassonográfico realizado no momento da randomização;
- Pacientes não alérgicas a óleo de milho ou lecitina de soja (excipientes das cápsulas de progesterona);

- Realização do pré-natal no ambulatório de gemelidade da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

4.3.2 Critérios de Exclusão.

- Diagnóstico subsequente de malformações fetais;
- Síndrome da transfusão feto-fetal (STFF) prévia à randomização ou desenvolvida após esse período;
- Presença de infecção ovular;
- Óbito fetal anteparto;
- Abandono do acompanhamento pré-natal no nosso serviço.

4.4 PROCEDIMENTO PARA COLETA DE DADOS

4.4.1 Randomização

As pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram informadas sobre o estudo e receberam orientação verbal e escrita. Somente as gestantes que consentiram em participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido foram incluídas no estudo.

As gestantes foram randomizadas em uma proporção de 1:1 em dois grupos (progesterona e placebo). A randomização foi realizada usando um

sistema computadorizado, utilizando segmentos balanceados de 20 pacientes em cada bloco (<http://www.randomization.com>).

O Serviço de Farmácia do Hospital das Clínicas foi responsável pela embalagem e rotulagem dos óvulos (A e B), e o código de randomização foi mantido em segredo até a análise dos dados. Dessa forma, as gestantes, os médicos e os pesquisadores envolvidos no atendimento clínico ou ultrassonográfico das gestantes desconhecaram o tratamento que era utilizado por cada uma das participantes durante toda a duração do estudo.

Os óvulos de progesterona (Utrogestan®) continham 200 mg de progesterona natural micronizada e excipientes tais como o óleo de amendoim, lecitina de soja, gelatina, glicerol e dióxido de titânio. Os óvulos de placebo continham apenas excipientes tais como óleo de amendoim, lecitina de soja, gelatina, glicerol e dióxido de titânio. Ambos os óvulos possuíam as mesmas características físicas, e foram manipulados e fornecidos pelo Laboratório fornecedor da progesterona (Besins Healthcare, Bruxelas, Bélgica).

4.4.2 Execução do estudo

No dia da randomização, cada gestante recebeu uma embalagem plástica lacrada contendo 21 óvulos e foi orientada a colocar um óvulo vaginal todas as noites, até a idade gestacional de 34 semanas e 6 dias. A fim de verificar a aderência ao tratamento por parte das gestantes, foi solicitado que elas devolvessem a embalagem vazia para receber uma nova,

a cada três semanas, quando era realizada a consulta pré-natal e o exame ultrassonográfico.

Na primeira consulta de pré-natal, todo o atendimento às gestantes seguiu a rotina do protocolo padrão do ambulatório de gestação múltipla do nosso serviço. Além desses cuidados, foram realizados exames bacterioscópicos para *Trichomonas vaginalis*, *Candida sp* e *Gardnerella vaginalis*, culturas endocervicais para *Mycoplasma sp* e *Ureaplasma sp*, e pesquisa com PCR para *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*. No terceiro trimestre, foi feita a investigação para Estreptococo do grupo B. Nos casos de pesquisa positiva, procedeu-se o tratamento específico e o exame de controle, exceção feita ao Estreptococo de grupo B.

Após a randomização, as gestantes receberam acompanhamento de consulta pré-natal, exame de ultrassonografia e avaliação das contrações uterinas pela tocografia a cada três semanas. As necessidades de internação e o manuseio das complicações da gestação (parto prematuro, corticoterapia, antibioticoterapia e tocólise) seguiram o protocolo clínico do serviço, e todas as gestantes receberam tratamento padrão.

4.4.3 Acompanhamento Ultrassonográfico das gestantes

As gestantes realizaram exame ultrassonográfico para determinação da idade gestacional, da corionicidade, do número de fetos, vitalidade dos fetos, pesquisa de malformações estruturais fetais e medida do comprimento do colo uterino.

As avaliações ultrassonográficas foram realizadas com os aparelhos de ultrassom Envisor (Philips, Holanda) e Voluson Pró e Expert (General Eletrics, Áustria).

As avaliações do colo uterino foram realizadas por médico colaborador, sob supervisão de médico assistente do setor de gemelidade, utilizando-se sonda transvaginal de 5,0 - 7,5 MHz, segundo técnica padronizada, anteriormente descrita ⁽⁶²⁾.

4.4.4 Datação da Gestação

A datação da gestação foi definida pela data da última menstruação, quando essa mostrou-se concordante com o exame ultrassonográfico realizado até 12 semanas.

No primeiro trimestre da gestação, quando a data da última menstruação foi desconhecida, ou houve discordância maior que sete dias entre a idade gestacional menstrual e a idade estimada pela ultrassonografia, a datação da gestação foi definida pelo exame ultrassonográfico (utilizando-se medida do comprimento cabeça-nádegas do feto maior).

No segundo trimestre da gestação, quando houve discordância acima de 10 dias entre a idade gestacional menstrual e a estimada pela biometria fetal, a datação da gestação foi definida pelo exame ultrassonográfico (utilizando-se parâmetros do diâmetro biparietal, circunferência cefálica, circunferência abdominal e comprimento do fêmur do maior feto).

4.4.5 Determinação da Corionicidade

Embora quanto mais precoce o período da gestação em que o exame ultrassonográfico for realizado melhor o diagnóstico da corionicidade, nem todas as gestantes do estudo realizaram a primeira avaliação ultrassonográfica no primeiro trimestre da gestação, ou no serviço de gemelidade da Clínica Obstétrica.

Foram então utilizados os seguintes critérios para a determinação da corionicidade: visualização de duas massas placentárias distintas; discordância entre os sexos fetais; presença do sinal do lambda (projeção do componente coriônico entre as membranas amnióticas, identificado na base da inserção placentária); ou ainda o exame histológico da placenta realizado após o parto.

4.4.6 Avaliação das Contrações Uterinas

A partir de 24 semanas de gestação até 34 semanas e 6 dias, todas as gestantes do estudo realizaram a avaliação das contrações uterinas por um período de 30 minutos, a cada três semanas, utilizando aparelho de tocografia externa da marca Philips, modelo M1351A (Boeblingen, Germany).

O exame foi realizado com a gestante em posição de Semi-Fowler, após 60 minutos de repouso, com o transdutor de contração do aparelho posicionado sobre o abdome materno, ao nível da região corporal alta do útero, a aproximadamente quatro centímetros do fundo uterino, próximo à

região cornual. Todos os exames de tocografia foram realizados no período da manhã, entre 08:00 hs e 12:00 hs, pelos médicos e demais pesquisadores envolvidos no projeto.

A leitura dos registros gráficos da tocografia foi realizada pelo pesquisador executante, e a contração uterina foi definida como a deflexão ou desvio ascendente do traçado em relação a uma linha de base, com amplitude acima de 5 mm, que apresentou um pico máximo e teve duração mínima de trinta segundos. Estudos como o de Newman et al. ⁽³²⁾ usaram critérios semelhantes para a definição da contração uterina.

A figura 1 ilustra um registro gráfico de tocografia com ausência de contrações uterinas.

A figura 2 ilustra um registro gráfico de tocografia em que se pode observar três contrações uterinas.

Figura 1 - Registro gráfico de tocografia com ausência de contrações uterinas

Figura 2 - Registro gráfico de tocografia com presença de três contrações uterinas

4.4.7 Obtenção dos dados da gestação

Os dados de interesse das gestantes (dados clínicos, epidemiológicos, antecedentes clínicos e obstétricos), bem como as complicações da gestação atual e os dados do parto foram obtidos diretamente das gestantes e de seus prontuários, em virtude de tratar-se de um estudo prospectivo.

4.5 VARIÁVEIS ESTUDADAS

4.5.1 Dados Clínico-Epidemiológicos e Gerais

A. Variáveis Maternas

- Idade materna em anos.
- Altura materna em centímetros.
- Índice de Massa corpórea (IMC).
- Cor (definida como branca ou não branca).
- Nível educacional (definido como tempo de estudo em anos).
- Antecedentes obstétricos (definido como nuliparidade ou não).
- Tabagismo: sim ou não.
- Uso de álcool: sim ou não.
- Uso de drogas ilícitas: sim ou não.
- Doenças clínicas (prévias à gestação): sim ou não.

B. Variáveis da Gestação

- Idade gestacional na realização do primeiro exame de tocografia.
- Corionicidade da gestação: monocoriônica ou dicoriônica.
- Avaliação do comprimento do colo uterino:
 - . número absoluto de gestantes que realizaram a aferição;
 - . medida do comprimento do colo uterino em milímetros na realização do primeiro exame de tocografia;
 - . medida do colo uterino igual ou inferior a 25 milímetros na realização do primeiro exame de tocografia.
- Número de exames de tocografia realizados por cada gestante.
- Vaginose Bacteriana na gestação (bacterioscopia positiva): sim ou não.
- Pré-Eclâmpsia na gestação: sim ou não.
- Diabetes Mellitus na gestação: sim ou não.
- Infecção Urinária na gestação: sim ou não.

4.5.2 Características das Contrações Uterinas

A. Variáveis Maternas

- Idade Gestacional no parto (< 28 sem, < 32 sem, < 34 sem, < 37 sem).

B. Variáveis das Contrações Uterinas na Tocografia

- Frequência das contrações (número de contrações em 30 minutos).

4.6 ARMAZENAMENTO DOS DADOS

Todas as informações coletadas foram armazenadas em planilha eletrônica Excel[®] (Microsoft[®]).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.7.1 Cálculo do Tamanho Amostral

O estudo em questão tratou-se de uma análise secundária realizada a partir de um estudo primário intitulado "progesterona vaginal para prevenção do parto prematuro em gestações gemelares: estudo randomizado, duplo cego, placebo controlado" ⁽³⁰⁾.

Na ocasião do desenho do estudo primário, ainda não haviam sido publicados estudos randomizados usando progesterona em gestações gemelares. O tamanho amostral do estudo primário foi então calculado tendo-se como referência o estudo realizado em gestações únicas, em 2003, na Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da FMUSP por Fonseca et al.⁽²³⁾, que mostraram redução de 50 % na taxa de parto prematuro espontâneo em gestações com alto risco para prematuridade em uso da progesterona vaginal, além de menor frequência de contrações uterinas nesse grupo.

Portanto, considerando o efeito encontrado no estudo de Fonseca et al.⁽²³⁾, ao avaliar a diferença da frequência média das contrações uterinas entre os grupos progesterona e placebo, e o número de avaliações das contrações (tocografias), realizadas em cada idade gestacional, o tamanho da amostra necessário para contemplar o objetivo do presente estudo (nível de significância = 5 %; poder = 80 %), seria de 38 avaliações das contrações uterinas (tocografias) em cada idade gestacional (24 a 34 semanas).

Foram randomizadas no estudo 336 gestantes, e o menor número de avaliações das contrações uterinas (tocografias) realizado nas diferentes idades gestacionais foi 58, contemplando, dessa forma, a amostra calculada. O software utilizado para o cálculo do tamanho amostral foi o g-power (versão 3.1).

4.7.2 Testes Estatísticos

Na comparação das características epidemiológicas e gerais da população, entre os grupos progesterona e placebo, utilizou-se o teste paramétrico t de Student para as variáveis numéricas, e o teste qui-quadrado para as variáveis categóricas. O Teste exato de Fisher foi utilizado para as variáveis categóricas com amostra pequena. Variáveis numéricas foram apresentadas como médias e desvios-padrão e as variáveis categóricas como frequências absolutas e relativas.

Na comparação da frequência média das contrações uterinas entre os dois grupos, nas diferentes idades gestacionais, utilizou-se o teste paramétrico t de Student.

Na comparação da frequência média das contrações entre os dois grupos, em relação à idade gestacional no parto, foi utilizado o modelo de análise GEE – modelo generalizado de equações de estimação. Esse modelo considera na análise a dependência da repetição das gestantes nas diferentes idades gestacionais avaliadas. O modelo GEE também foi utilizado na avaliação da interação da frequência das contrações uterinas com a medida do comprimento do colo uterino e com a corionicidade da gestação, entre os grupos progesterona e placebo.

Os dados foram analisados utilizando o software SPSS (versão 20). Nos testes estatísticos, o nível de significância considerado foi de 5% ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS

Durante o período de 01 de junho de 2007 a 31 de outubro de 2013, 341 gestantes preencheram os critérios de inclusão. Metade delas foi randomizada em cada um dos grupos: 170 (49,9%) no grupo progesterona e 171 (50,1%) no grupo placebo.

5.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E GERAIS DA POPULAÇÃO

Os achados em relação às características epidemiológicas e gerais da população, na ocasião da realização da primeira tocografia, foram semelhantes entre os dois grupos, não havendo diferenças significativas (Tabela 1).

Tabela 1 - Características epidemiológicas e gerais da população das gestações gemelares nos grupos progesterona e placebo (HCFMUSP – junho de 2007 a outubro de 2013)

Características Maternas	Progesterona n = 170 (49,9%)	Placebo n = 171 (50,1%)	P
Idade média em anos*	28,38 ± 5,98	28,32 ± 6,17	0,99
Altura média em cm*	160,82 ± 6,62	160,99 ± 6,10	0,82
Nível educacional em anos*	10,42 ± 2,50	10,47 ± 2,19	0,85
Cor branca**	95 (56,5%)	86 (52,1%)	0,42
IMC (kg/m ²)*	24,88 ± 4,54	25,29 ± 5,28	0,46
Nuliparidade**	64 (37,6%)	65 (38,2%)	0,91
Tabagismo	14 (8,2%)	17 (10%)	0,57
Uso de álcool***	0	4 (2,4%)	0,12
Uso de drogas ilícitas***	1 (0,6%)	2 (1,2%)	0,99
Doenças Clínicas prévias**	44 (25,9%)	44 (25,9%)	0,99

* Teste t de Student

** Teste Qui-Quadrado

*** Teste Exato de Fisher

HAS, hipotireoidismo, diabetes mellitus, asma, depressão, trombofilia

n = número de gestantes

5.2 CARACTERÍSTICAS DAS GESTAÇÕES NOS GRUPOS PROGESTERONA E PLACEBO

Os achados em relação às características das gestações também foram semelhantes entre os dois grupos, não havendo diferenças significativas (Tabela 2).

Tabela 2 - Características das gestações gemelares nos grupos progesterona e placebo (HCFMUSP – junho de 2007 a outubro de 2013)

Características das Gestações	Progesterona n = 170 (49,9%)	Placebo n = 171 (50,1%)	P
Monocorionicidade**	42 (25,0%)	30 (17,9 %)	0,11
Número de tocografias por gestante*	3,04 ± 1,02	2,91 ± 1,02	0,24
Idade gestacional na realização da primeira tocografia*	25,76 ± 1,80	25,71 ± 1,47	0,79
Número total de gestantes que aferiram o colo**	148 (87,1%)	150 (87,7 %)	0,85
Medida média do colo em mm na primeira tocografia*	31,95 ± 10,95	33,46 ± 10,72	0,23
Medida do colo ≤ 25 mm na primeira tocografia*	34 (23%)	22 (14,7 %)	0,07
Vaginose Bacteriana na gestação, n/N**	20/158 (12,7%)	17/162 (10,5%)	0,54
Pré-Eclâmpsia na gestação, n/N**	24/169 (14,2%)	24/171 (14%)	0,96
Infecção Urinária na gestação, n/N**	14/169 (8,3%)	18/169 (10,7%)	0,45
Diabetes Mellitus na gestação, n/N**	12/169 (7,1%)	14/171 (8,2%)	0,70

* Teste t de Student

** Teste Qui-Quadrado

n = número de gestantes

5.3 AVALIAÇÃO DAS CONTRAÇÕES UTERINAS PELA TOCOGRAFIA

5.3.1 Casuística

Na avaliação das contrações uterinas pela tocografia das 341 gestantes que preencheram os critérios de inclusão, no grupo progesterona, uma gestante (0,58%) abandonou o acompanhamento pré-natal no serviço, duas (1,17%) tiveram óbito fetal intrauterino e uma (0,58%) teve o seguimento perdido. O número total de gestantes avaliadas foi 166 (97,65%). Já no grupo placebo, apenas uma gestante (0,58%) abandonou o acompanhamento pré-natal no serviço, com número total de gestantes avaliadas de 170 (99,41%). Dessa forma, na análise das contrações uterinas, foram consideradas 166 gestantes no grupo progesterona e 170, no grupo placebo.

O fluxograma com o número total de gestantes nos grupos progesterona e placebo que realizaram as avaliações das contrações uterinas pela tocografia encontra-se detalhado na Figura 3.

Figura 3 - Fluxograma das gestantes na avaliação das contrações uterinas nos grupos progesterona e placebo; n = número de gestantes

5.3.2 Frequência das contrações uterinas

Na avaliação de todas as gestantes do estudo, independente dos grupos progesterona e placebo, verificou-se que a idade gestacional influenciou a frequência das contrações uterinas ($P < 0,0001$). Utilizou-se para a análise o modelo GEE - modelo generalizado de equações de estimação, levando em conta a dependência das medidas da mesma gestante nas diferentes idades gestacionais avaliadas.

A frequência das contrações uterinas aumentou significativamente com a idade gestacional, independente do grupo progesterona ou placebo ($P < 0,0001$). A cada semana gestacional, o número de contrações aumentou em média 12% (Coeficiente 0,118, Erro Padrão = 0,0142).

Porém, observou-se que, em relação aos grupos progesterona e placebo, não houve interação entre a frequência das contrações uterinas e a idade gestacional ($P = 0,334$).

O gráfico ilustrativo da frequência média amostral das contrações, nas diferentes idades gestacionais, encontra-se detalhado na Figura 4.

Figura 4 - Distribuição da frequência média das contrações uterinas em 336 gestações gemelares, nas idades gestacionais de 24 a 34 semanas, com base de ± 1 Erro Padrão (HCFMUSP – junho de 2007 a outubro de 2013)

5.3.3 Comparação da frequência média das contrações uterinas entre os grupos progesterona e placebo

Comparando-se a frequência média das contrações uterinas, entre os grupos progesterona e placebo, nas idades gestacionais de 24 a 34 semanas, houve diferença significativa apenas na idade gestacional de 34 semanas ($P = 0,005$), com frequência de contrações maior no grupo progesterona (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação da frequência média das contrações uterinas entre os grupos progesterona e placebo nas diferentes idades gestacionais (HCFMUSP – junho de 2007 a outubro de 2013)

IG	n Total	Frequência média das contrações uterinas ± DP				Progesterona vs Placebo P*
		Progesterona		Placebo		
		n		n		
24	144	79	1,25 ± 2,90	65	0,98 ± 2,68	0,540
25	66	24	0,66 ± 1,52	42	1,50 ± 3,39	0,221
26	71	35	1,63 ± 2,49	36	2,75 ± 4,08	0,148
27	150	76	1,80 ± 2,70	74	2,28 ± 3,90	0,466
28	71	33	3,06 ± 3,90	38	2,55 ± 3,21	0,689
29	70	31	2,93 ± 3,26	39	2,49 ± 3,99	0,686
30	123	70	2,91 ± 3,29	53	3,15 ± 4,08	0,755
31	64	31	2,29 ± 2,32	33	3,88 ± 4,02	0,057
32	72	33	3,76 ± 3,84	39	4,18 ± 3,74	0,639
33	110	61	3,77 ± 2,96	49	2,98 ± 2,61	0,181
34	58	32	4,81 ± 3,24	26	2,73 ± 2,06	0,005

* Teste t de Student

IG = idade gestacional em semanas; n = número de gestantes; DP = desvio-padrão

O comportamento da frequência média das contrações uterinas nos grupos progesterona e placebo, nas diferentes idades gestacionais, encontra-se ilustrado na Figura 5.

Figura 5 - Distribuição da frequência média das contrações uterinas em gestações gemelares, em uso de progesterona (n = 166) e uso de placebo (n = 170), nas idades gestacionais de 24 a 34 semanas (HCFMUSP – junho de 2007 a outubro de 2013)

5.4 FREQUÊNCIA MÉDIA DAS CONTRAÇÕES UTERINAS E IDADE GESTACIONAL NO PARTO

Na população avaliada no estudo, 17,9 % (60/336) das gestantes tiveram o parto abaixo de 34 semanas, enquanto que, em 68,2 % (229/336) delas, o parto aconteceu abaixo de 37 semanas gestacionais.

Não houve diferença significativa entre os grupos progesterona e placebo em relação à incidência de partos ocorridos abaixo de 34 semanas e abaixo de 37 semanas de gestação (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação dos partos ocorridos abaixo de 34 semanas e abaixo de 37 semanas em gestações gemelares, entre os grupos progesterona e placebo (HCFMUSP – junho de 2007 a outubro de 2013)

IG no Parto	Progesterona n	Placebo n	P*
< 34 semanas	31/166 (18,7%)	29/170 (17,5%)	0,69
< 37 semanas	121/166 (72,9%)	108/170 (63,5%)	0,06

** Teste Qui-Quadrado

n = número de gestantes

Para a comparação da frequência média das contrações uterinas em relação à idade gestacional no parto, entre os grupos progesterona e placebo, inicialmente, realizou-se a descrição dos grupos. Utilizou-se, então, a média das médias da frequência das contrações uterinas de cada gestante, isto é, calculou-se a média de cada gestante nas diferentes idades gestacionais em que realizou as tocografias, e depois calculou-se a média desses valores.

Realizou-se, a seguir, a comparação da frequência média das contrações uterinas em relação à idade gestacional no parto, entre os dois grupos, utilizando-se o modelo GEE - modelo generalizado de equações de estimação, que leva em conta a dependência das medidas repetidas da mesma gestante nas diferentes idades gestacionais.

Na comparação da frequência média das contrações uterinas em relação à idade gestacional no parto, não houve diferença significativa entre os dois grupos (Tabela 5).

No grupo progesterona, apenas uma gestante teve o parto antes de 28 semanas gestacionais, e esta não apresentou contrações uterinas nas avaliações prévias ao evento do parto.

Os achados da comparação da frequência média das contrações uterinas, em relação às diferentes idades gestacionais no parto, entre os grupos progesterona e placebo, encontram-se detalhados na Tabela 5.

Tabela 5 - Comparação da frequência média das contrações uterinas em gestações gemelares, em relação à idade gestacional no parto, entre os grupos progesterona e placebo (HCFMUSP – junho de 2007 a outubro de 2013)

IG Parto em sem	Progesterona		Placebo		P*
	n	Frequência média das contrações ± DP	n	Frequência média das contrações ± DP	
< 28	1	0,0	4	3,50 ± 4,43	NA**
< 32	9	3,61 ± 4,86	14	3,73 ± 3,40	0,87
< 34	29	3,02 ± 3,33	27	3,04 ± 3,09	0,81
< 37	109	2,69 ± 2,53	101	2,92 ± 3,05	0,44

* GEE - modelo generalizado de equações de estimação

** NA = não aplicado

n = número de gestantes; DP = desvio-padrão

5.5 FREQUÊNCIA MÉDIA DAS CONTRAÇÕES UTERINAS, COLO UTERINO E CORIONICIDADE DA GESTAÇÃO

Os efeitos de interação da frequência média das contrações uterinas com a medida do comprimento do colo uterino e com a corionicidade da gestação, em relação aos grupos progesterona e placebo, não foram significativos ($P = 0,42$ e $P = 0,744$; respectivamente).

Apesar disso, independente dos grupos, foi observado efeito de interação significativo da medida do colo uterino com a frequência das contrações uterinas ($P < 0,0001$), e da corionicidade da gestação com a frequência das contrações ($P = 0,021$). Quanto menor a medida do comprimento do colo uterino maior a frequência média das contrações uterinas observada - correlação negativa entre os dois parâmetros (Coeficiente = $-0,028$; Erro Padrão = $0,0037$).

Em relação à corionicidade, constatou-se que as gestações monócóricas apresentaram uma frequência média de contrações uterinas maior, quando comparadas com as gestações dicóricas (Coeficiente $0,280$; Erro Padrão = $0,1214$).

Também observou-se uma diferença significativa ($P = 0,004$) entre a idade gestacional média no parto entre as gestações monócóricas ($35,12 \pm 1,76$) e dicóricas ($35,87 \pm 2,41$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Comparação da idade gestacional média no parto entre as gestações gemelares monocoriônicas e dicoriônicas (HCFMUSP – junho de 2007 a outubro de 2013)

Idade Gestacional média no Parto ± DP		
Gestações Monocoriônicas	Gestações Dicoriônicas	P*
35,12 ± 1,76	35,87 ± 2,41	0,004

* Teste Qui-Quadrado

DP = desvio- padrão

No entanto, considerando-se os partos ocorridos abaixo de 34 semanas, não houve diferença significativa ($P = 0,252$) quando comparadas as gestações monocoriônicas com as dicoriônicas (Tabela 7), apesar do encontro de maior frequência de contrações uterinas nas gestações monocoriônicas.

Tabela 7 - Comparação dos partos ocorridos abaixo de 34 semanas e acima de 34 semanas entre as gestações gemelares monocoriônicas e dicoriônicas (HCFMUSP – junho de 2007 a outubro de 2013)

IG no Parto	Gestações Monocoriônicas n/N	Gestações Dicoriônicas n/N	P*
< 34 semanas	16/71 (22,5%)	43/260 (16,5%)	0,252
> 34 semanas	55/71 (77,5%)	217/260 (83,5%)	0,252

* Teste Qui-Quadrado

n = número de gestantes

6 Discussão

O parto prematuro em gestações múltiplas é um importante problema de saúde pública. Natimortos e óbitos neonatais em gêmeos são 3 a 6 vezes mais comuns que nas gestações únicas, e uma morbidade importante está associada a longo prazo a essas gestações ⁽⁶³⁾. Apesar disso e da taxa elevada de trabalho de parto prematuro, há poucas pesquisas sobre a forma como a atividade contrátil uterina difere entre a gestação única e as gestações gemelares ⁽⁶⁴⁾.

Estudos de monitorização das contrações uterinas sugerem que as gestações gemelares e trigemelares apresentam maior frequência de contrações após 35 semanas gestacionais ^(65,32). Entretanto, estudos concluem que o aumento da frequência das contrações uterinas não é fator preditor para o parto prematuro nessas gestações ^(32,66).

Este estudo propôs a comparação, nas gestações gemelares, da frequência das contrações uterinas entre as gestantes que usaram a progesterona e as que usaram o placebo, buscando identificar possíveis diferenças entre os dois grupos, o que refletiria a ação da progesterona sobre a contratilidade uterina.

A literatura apresenta vários estudos que avaliam contrações uterinas em gestações gemelares ^(31,33,34,59,60), porém não há trabalhos que analisam o comportamento das contrações uterinas nessas gestações sob o uso da progesterona.

As características epidemiológicas e gestacionais foram similares entre as gestantes dos grupos progesterona e placebo. Parâmetros como paridade, tabagismo, IMC e corionicidade das gestações não influenciaram na análise de comparação entre os dois grupos (Tabela 1; Tabela 2), o que mostrou homogeneidade importante na população envolvida no estudo.

O estudo de Newman et al.⁽⁵⁹⁾ de 2006, comparando as contrações uterinas de 306 gestações únicas e 59 gestações gemelares, entre 22 e 36 semanas gestacionais, encontrou limitações tanto pelo número pequeno de gestações gemelares envolvidas (59 gestações), como pelo número expressivo de gestações provenientes de técnicas de reprodução assistida, cujas taxas de parto prematuro são sabidamente maiores se comparadas com gestações gemelares espontâneas^(67,68).

Este estudo contou com um número significativo de gestantes em cada grupo randomizado (170 no grupo progesterona e 171 no grupo placebo), e todas as gestantes envolvidas tiveram suas gestações naturalmente concebidas, e não possuíam histórico de prematuridade. Esse fato mostrou-se um diferencial importante no sentido de promover uma maior homogeneidade na população do estudo, especialmente considerando-se que gestações provenientes de técnicas de reprodução assistida apresentam maiores taxas de partos prematuros^(67,68).

Vários estudos, cujo objetivo era avaliar o comportamento das contrações uterinas, realizaram a monitorização externa das contrações por período de uma hora, como Newman et al.⁽³²⁾, em 1989, Knuppel et al.⁽⁴⁷⁾, em 1990, Newman et al.⁽⁵⁹⁾, em 2006, e O'Brien et al.⁽⁶¹⁾, em 2010. Ressalte-

se que, nesses estudos, as monitorizações das contrações foram realizadas no domicílio das gestantes, visto os aparelhos serem disponibilizados e as gestantes devidamente instruídas quanto ao seu manuseio. A ausência de necessidade de deslocamento da gestante para um ambiente hospitalar é fator que certamente viabiliza positivamente a realização da monitorização das contrações por um período de tempo mais longo.

No presente estudo, realizou-se a monitorização das contrações pela tocografia, em todas as pacientes, por período apenas de trinta minutos. Como todos os exames foram realizados no ambulatório da Clínica Obstétrica, definiu-se um período de tempo menor para a monitorização das contrações, a fim de evitar que essas gestantes permanecessem em ambiente hospitalar por mais de quatro horas consecutivas, já que todas realizavam, na mesma visita ao Serviço, a consulta de pré-natal e a ultrassonografia para avaliação dos fetos e para a medida do colo uterino. Além disso, não acreditamos que um período maior de monitorização fosse capaz de representar mudanças na frequência das contrações, visto as gestantes não estarem sujeitas a qualquer atividade física significativa durante ou previamente ao exame da tocografia.

Estudos prospectivos observacionais em gestações únicas mostraram que a frequência das contrações uterinas aumentou com a idade gestacional, no período da tarde e à noite, e também após o coito ^(39,69). Entretanto, pouco é conhecido a respeito das contrações uterinas nas gestações gemelares. Newman et al.⁽³²⁾, em 1989, observaram que a relação entre o aumento da frequência das contrações uterinas e o parto

prematureo foi maior nas gestações únicas com alto risco para prematuridade, sendo que essa relação também existiu nas gestações gemelares, só que de forma menos intensa.

Observou-se que a frequência das contrações uterinas aumentou significativamente com a idade gestacional nas gestações gemelares, de uma maneira geral, isto é, independente do grupo progesterona ou placebo. A cada semana gestacional, a frequência média das contrações uterinas apresentou aumento de 12%. Esse achado mostrou-se concordante com os estudos em gestações gemelares de Newman et al.⁽³²⁾, de 1989, e Newman et al.⁽⁵⁹⁾, de 2006. Hernandez et al.⁽⁶⁰⁾, em 2008, também demonstrou que a frequência das contrações uterinas nas gestações gemelares foi maior no terceiro trimestre da gestação.

Em relação à comparação da frequência das contrações uterinas entre os grupos progesterona e placebo, observou-se que apenas na idade gestacional de 34 semanas houve diferença significativa entre os dois grupos ($P = 0,005$), com frequência maior de contrações no grupo progesterona (Tabela 3). Não houve uma justificativa plausível para esse achado, isto é, um fator que fosse responsabilizado pela diferença apresentada entre os dois grupos, apenas pontualmente nessa idade gestacional. Porém, esse achado não interferiu no desfecho final das gestações, pois não houve diferença significativa entre os dois grupos na comparação da frequência das contrações e a idade gestacional no parto (Tabela 4).

Em estudo prospectivo duplo cego placebo controlado em gestações únicas com alto risco para prematuridade, e utilizando a progesterona natural vaginal, Fonseca et al.⁽²³⁾, em 2003, observaram redução da frequência das contrações uterinas no grupo das pacientes que utilizaram a progesterona, mostrando associação direta entre o uso da progesterona natural e a contração uterina.

Entretanto, como comentado anteriormente, nenhum estudo sobre avaliação das contrações uterinas foi realizado em gestações gemelares sob o uso da progesterona, impossibilitando assim estabelecer-se comparação.

Dessa forma, as observações deste estudo, mostrando ausência de efeito direto da progesterona na frequência das contrações uterinas, em gestações gemelares, estariam em concordância com o resultado de vários estudos que mostram que a progesterona não atua reduzindo as taxas de prematuridade nas gestações gemelares ^(26,27,29,53-56).

O conceito de que a progesterona é o hormônio que mantém a gravidez é clássico ⁽⁷⁰⁾. A retirada da progesterona no início da gestação (ex. ooforectomia) ou a administração de antagonista da progesterona (RU486) interrompe a gestação.

Sabemos que a progesterona promove, ao longo da gestação, a quiescência uterina, atuando, assim, diretamente em um dos conhecidos mecanismos do parto prematuro: as contrações uterinas ⁽⁷⁰⁾. A progesterona parece promover a quiescência uterina inibindo a expressão do gene responsável pela síntese de proteína relacionada à contração miometrial

(CAP), regulando os mecanismos de relaxamento, incluindo o sistema do óxido nítrico, suprimindo a liberação de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-8 e CCL-2), e reduzindo a disponibilidade das prostaglandinas ⁽⁷¹⁾. O efeito da progesterona na decídua e nas membranas coriônicas inclui também a inibição do efeito da TNF- α ⁽⁷²⁾.

Norman et al. ⁽⁶⁶⁾, em 2011, procuraram estudar, nas gestações gemelares, entre 24 e 34 semanas, com uso de 90 mg de progesterona vaginal ou placebo, o efeito desse hormônio sobre a expressão gênica e sua função sobre o miométrio uterino e os leucócitos circulantes no sangue periférico. Com esse propósito, mostraram que o uso prolongado da progesterona inibiu a conexão miometrial com a proteína de expressão 43 (componente das *gap junctions*) e diminuiu a expressão de leucócito CD 11b no sangue periférico. Esses efeitos seriam responsáveis por diminuir tanto a capacidade de contração do útero como a de migração dos leucócitos do sangue periférico para o miométrio, sendo, assim, mecanismos distintos e pontuais por meio dos quais a progesterona poderia prevenir o parto prematuro nessas gestações.

Nas gestações únicas, é possível que a eficácia da progesterona na redução do parto prematuro esteja mais relacionada à sua ação farmacológica do que ao tratamento ou suplementação de uma deficiência progestogênica ⁽⁷²⁾.

A progesterona inibe a apoptose basal e a apoptose induzida por TNF- α em membranas fetais de termo ⁽⁷³⁾. Essa observação poderia explicar, em parte, o mecanismo pelo qual a suplementação de progesterona

dificultaria a ruptura prematura das membranas e o parto prematuro em algumas gestações de alto risco. Apesar de tantos estudos e supostas ações, o exato mecanismo pelo qual a progesterona atua prevenindo o parto prematuro em gestações únicas ainda permanece obscuro.

Embora nas gestações únicas com história prévia de parto prematuro se recomende o uso da progesterona entre 16 e 24 semanas de gestação ⁽⁷⁴⁾, nas gestações gemelares, ele não apresenta o mesmo benefício, devido aos mecanismos do trabalho de parto prematuro entre esses dois tipos de gestações iniciarem e acontecerem de maneira diferente.

A sobredistensão uterina tem sido implicada em partos prematuros espontâneos associados com gestações múltiplas e com polidrâmnio. Em primatas não humanos, balões intra-amnióticos inflados podem estimular a contratilidade uterina, o parto prematuro e "pulsos inflamatórios" caracterizados pelo aumento das concentrações plasmáticas maternas de IL-1 β , TNF- α , IL-8 e IL-6 ⁽⁷⁵⁾. Esses achados são consistentes com a observação de que o "estiramento" do miométrio uterino humano resulta em elevação na produção de citocinas inflamatórias ⁽⁷²⁾. O "alongamento" ou "estiramento" do útero pode induzir ao aumento da contratilidade do miométrio, liberação de prostaglandinas, expressão das proteínas de junção (*gap junctions*) como a conexina-43, e aumento de receptores de ocitocina no miométrio ⁽⁷⁶⁾. Portanto, seria possível haver maior processo inflamatório em gestações gemelares em decorrência da sobredistensão uterina.

Lei et al. ⁽⁷⁷⁾, em 2011, em estudo *in vitro* com cultura de células miometriais humanas pré-incubadas com progesterona, investigaram a

relação entre a progesterona e o "estiramento" uterino, e concluíram que a progesterona não inibiu a sinalização intracelular ou a ativação da expressão genética induzida pelo "estiramento" uterino, oferecendo, dessa forma, uma possível explicação da sua ineficácia na prevenção do parto prematuro nas gestações gemelares, que cursam com maior "estiramento" do músculo uterino. No entanto, não se pode esquecer que a progesterona também pode atuar por meio de outros mecanismos (não-genômicos), a fim de manter a quiescência miometrial.

Apesar de a etiologia do parto prematuro ser multifatorial, já é bastante estabelecido que um dos mecanismos responsáveis pelo início do trabalho de parto ou pela ruptura das membranas antes do termo é inflamatório, em presença ou ausência de infecção ⁽⁷⁸⁾. A resposta inflamatória é mediada por meio de células como as T auxiliares (*T helper cells*), que produzem citocinas. As citocinas podem ser essencialmente pró-inflamatórias, como a IL-1 e o fator de necrose tumoral (TNF- α), ou essencialmente anti-inflamatórias, como a IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 e IL-13 ^(79,80).

A conhecida relação entre as citocinas e o parto prematuro é o aumento dos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α no líquido amniótico, fluido cervical e soro, e diminuição dos níveis séricos de IL-12 e IL-17 ⁽⁸¹⁻⁸⁴⁾. Os níveis de IL-1 β , IL-6 e IL-8 também têm se mostrado elevados em fluido cervical em relação direta com o amadurecimento cervical ⁽⁸⁵⁾. Uma das principais ações da progesterona na prevenção da prematuridade em gestações únicas acredita-se estar no encurtamento e na maturação do colo

uterino, processos em que a resposta inflamatória desempenha um papel importante ⁽⁸⁶⁾. Estudos *in vitro* sugerem que a progesterona pode ter um efeito anti-inflamatório ⁽⁸⁷⁾.

A relação das citocinas com o parto prematuro foi principalmente investigada em gestações únicas, e existem poucos estudos em gestações múltiplas. Os mecanismos responsáveis por essas diferenças entre as gestações únicas e gemelares são desconhecidos e apenas abertos a especulações, porém o incremento na produção das citocinas inflamatórias e nos reguladores de ativação imune contribuiria para a suscetibilidade elevada das gestações gemelares ao parto prematuro, e ainda para o aumento das taxas de ruptura prematura de membranas nessas gestações ⁽⁸⁸⁾.

Perni et al. ⁽⁸⁸⁾, em 2005, avaliaram líquido amniótico de 252 gestações únicas e 46 gemelares, entre 15 e 19 semanas gestacionais, sem sinais clínicos de infecção ou contração uterina na ocasião da coleta do líquido por amniocentese. Observaram diferenças nos mediadores imunológicos do líquido amniótico das gestações únicas e gemelares. Elevadas concentrações médias de IL-1 β , TNF- α , IL-4, CLP-16, leptina e angiotensina foram constatadas no líquido amniótico das gestações gemelares, concluindo, dessa maneira, que os níveis elevados desses ativadores imunes poderiam contribuir para o aumento na taxa de ruptura prematura de membranas e parto prematuro espontâneo nas referidas gestações.

Wennerholm et al. ⁽⁸⁹⁾, em 1998, realizaram estudo com 121 gestações gemelares, avaliando as citocinas inflamatórias IL-1 α , IL-6 e IL-8 na

secreção vaginal entre as gestantes que tiveram o parto < 37 semanas e ≥ 37 semanas. Observaram que os níveis de IL-8 na secreção vaginal estiveram significativamente elevados nas gestantes que tiveram o parto prematuro (< 37 semanas). A IL-8 pode ser produzida pelas células coriônicas, decíduais e fibroblastos cervicais, e sua produção é influenciada por hormônios esteroides ⁽⁹⁰⁾. Assim, a sobredistensão uterina e o consequente "estiramento" das membranas fetais nas gestações gemelares poderiam causar um incremento na produção da IL-8, com subsequente maturação cervical e início do trabalho de parto.

Rode et al.⁽⁹¹⁾, em 2012, em estudo secundário randomizado, duplo cego placebo controlado, envolvendo 523 gestações gemelares com uso de progesterona natural, procuraram estimar a associação entre os níveis de IL-8 em amostras de sangue e o parto prematuro espontâneo nessas gestações, além de avaliar o efeito anti-inflamatório do uso da progesterona. Concluíram que o risco de parto prematuro abaixo de 34 semanas esteve aumentado nas gestantes com altos níveis de IL-8, porém, o tratamento com a progesterona não afetou esses níveis de IL-8, isto é, não houve diferença nos níveis de IL-8, entre as amostras das gestantes tratadas com a progesterona daquelas tratadas com o placebo.

Apesar de não se ter encontrado interação entre a frequência das contrações uterinas e a medida do comprimento do colo uterino nas gestantes em uso da progesterona, observou-se na avaliação de toda a população do estudo, isto é, independente dos grupos, uma importante correlação negativa entre o comprimento do colo uterino e a frequência das

contrações uterinas. Esses achados foram concordantes com aqueles encontrados por Newman et al. ⁽⁶⁵⁾, em 1997, que realizaram estudo envolvendo 40 gestações gemelares, buscando determinar a possível correlação entre medidas quantitativas da atividade uterina e mudanças no colo uterino. Entre 20 e 37 semanas, as gestantes realizaram a medida do colo uterino semanalmente e a monitorização das contrações uterinas por uma média de sete horas semanais. Os achados do estudo mostraram uma significativa correlação negativa entre o aumento das contrações uterinas e a diminuição do comprimento do colo uterino, concluindo, então, que, nas gestações gemelares, o aumento na frequência das contrações uterinas encontrou-se fortemente correlacionado com alterações cervicais mensuráveis entre 20 e 37 semanas de gestação.

As gestações monócóricas apresentaram maior frequência de contrações uterinas em relação às dicóricas, mesmo com a ausência de casos de síndrome de transfusão feto-fetal na população do estudo. As placentas de gestações monócóricas apresentam anastomoses vasculares que podem promover desequilíbrio no volume de líquido amniótico, e isso pode estar relacionado a uma maior distensão uterina, e, conseqüentemente, maior frequência de contrações ⁽⁹²⁾. Também observamos uma diferença significativa ($P = 0,004$) entre a idade gestacional média no parto entre as gestações monócóricas ($35,12 \pm 1,76$) e dicóricas. ($35,87 \pm 2,41$).

Como as gestações monócóricas estão associadas a maiores taxas de complicações fetais, como a restrição de crescimento, a idade

gestacional do parto nessas gestações estaria mais relacionada com indicações de resolução antecipada da gestação do que com partos prematuros espontâneos. Hack et al.⁽⁹³⁾, em 2006, em estudo que compara o curso natural entre gestações gemelares monócóricas e dicóricas, observaram que a idade gestacional no parto foi uma semana menor nas gestações monócóricas. Além disso, o protocolo do setor de gemelidade da Clínica Obstétrica indica a resolução das gestações monócóricas com 36 semanas e as dicóricas com 38 semanas, o que determina diferença entre as idades gestacionais nos partos entre as duas gestações.

Como no presente estudo observou-se que a frequência das contrações uterinas não diferiu significativamente entre o grupo progesterona e o placebo, refletindo ausência de ação direta desse hormônio sobre o útero, especulamos então, se a ineficácia da ação da progesterona no útero, nas gestações gemelares, seria devido a esse contínuo e importante processo inflamatório, sobre o qual a progesterona não conseguiria agir com superação.

Levantamos, ainda, outros questionamentos: (1) Haveria um "nível de corte" ou um momento a partir do qual a distensão uterina iniciaria um bloqueio à ação da progesterona sobre a latência ou quiescência do músculo uterino? (2) Seria essa a razão da frequência das contrações uterinas diferir entre as gestações únicas e as gemelares sob o uso da progesterona natural? (3) Se a sobredistensão uterina estivesse realmente envolvida na resposta da ação da progesterona, não deveríamos então observar alguma diferença entre a frequência das contrações entre os dois

grupos, em semanas gestacionais mais precoces, como 24, 25 ou 26 semanas, fato esse não observado?

Na verdade, permanecemos com muitos questionamentos, suposições e hipóteses. Já sabemos que, assim como nas gestações únicas, a frequência das contrações uterinas não é importante como fator preditor para o parto prematuro, existindo uma variação individual significativa da contratilidade uterina entre as gestantes. Não podemos esquecer ainda que, na população do presente estudo, 31,8% das gestações gemelares ultrapassaram as 37 semanas gestacionais.

Reforçamos, então, que não é somente a sobredistensão uterina, mas outros fatores maternos, como o colo, o tônus uterino, as infecções, o stress e outros, que interagem e/ou se sobrepõem, culminando com a prematuridade nessas gestações.

Ressaltem-se, como pontos fortes do nosso estudo, o seguimento pré-natal completo e padrão de todas as gestantes, o fato de a totalidade das gestações serem naturalmente concebidas e não apresentarem antecedente de prematuridade, além das gestantes encontrarem-se assintomáticas em relação a queixas dolorosas na ocasião da realização das tocografias. Uma importante limitação que podemos referir foi a ausência de coleta de sangue das gestantes, a fim de associarmos no estudo a avaliação de alguns marcadores de processo inflamatório, como as citocinas, e, dessa forma, melhor contemplar nossa hipótese ou argumento sobre a possível razão da ausência de ação da progesterona sobre a frequência das contrações uterinas nas gestações gemelares, o que foi comentado na

nossa discussão. Resta-nos, dessa forma, o estímulo para continuar trilhando o caminho obscuro e desafiador nessa busca por tão importantes e desejadas respostas.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo em gestações gemelares concluiu que:

- 1 - O uso da progesterona natural em gestações gemelares não interferiu na frequência das contrações uterinas.
- 2 - Não houve interação entre a frequência das contrações uterinas e a medida do comprimento do colo uterino em gestações gemelares em uso de progesterona natural.
- 3 - Não houve interação entre a frequência das contrações uterinas e a corionicidade em gestações gemelares em uso de progesterona natural.

ANEXO 1

010/2012

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0418/04

Título: Administração profilática de progesterona natural micronizada em pacientes com gestação gemelar na prevenção do trabalho de parto prematuro: Estudo Randomizado, Duplo-Cego, Placebo Controlado.

Pesquisador Responsável: Maria de Lourdes Brizot

Pesquisador Executante: Aline Girotto Ricci

Departamento: Obstetrícia e Ginecologia

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA ad-referendum** em 15/05/2012, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

• **Carta datada de 26/04/12 – Relatório Parcial do Estudo; Carta de Solicitação para análise de divulgação de recrutamento de pacientes; Texto para divulgação**

CAPPesq, 17 de Maio de 2012

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

São Paulo, 06 de março de 2012.

Ilmo. Sr. Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Re: Sub Projeto 418/04:

Avaliação da Atividade Uterina em Gestação Gemelar em uso Profilático de Progesterona Natural Micronizada: Estudo Randomizado, Duplo Cego, Placebo Controlado.

Envio em anexo relatório parcial do projeto de pesquisa 418/04:

“Administração profilática de progesterona natural micronizada em pacientes com gestação gemelar na prevenção do trabalho de parto prematuro: Estudo randomizado, duplo-cego, placebo controlado”.

Em anexo também encontra-se resumo de sub-projeto do projeto 418/04, para aprovação.

Atenciosamente,

Maria de Lourdes Brizot
Pesquisadora responsável

São Paulo 06 de fevereiro de 2012.

RELATÓRIO PARCIAL

Re: Projeto no 0418/04

Administração profilática de progesterona natural micronizada em pacientes com gestação gemelar na prevenção do trabalho de parto prematuro: Estudo randomizado, duplo-cego, placebo controlado.

Registro no Clínical Trials: NCT 01031017

O projeto encontra-se em andamento, teve seu início em junho de 2007. Até o momento foram randomizadas 311 mulheres do total necessário de 424. A coleta de dados tem sido aquém do desejado, uma vez que os critérios de inclusão são rigorosos e o evento da gestação gemelar espontaneamente concebida também ser rara (1 /89). Portanto estamos cientes da necessidade de prorrogação do prazo do estudo e estimamos término de inclusão de casos em março de 2013, e finalização da pesquisa em março de 2014.

Até o momento não observamos efeitos adversos ou complicações adversas em nenhum caso.

Três estudos randomizados investigando o efeito da progesterona na prevenção da prematuridade em gestação gemelar foram publicados. Nenhum deles demonstrou diferença nos grupos placebos e progesterona em relação à idade gestacional no parto. A importância de continuarmos o estudo, é que ele é realizado em centro único, iniciamos a progesterona em idade gestacional mais precoce e não incluímos gestações gemelares provenientes de técnicas de reprodução assistida.

Nenhuma análise parcial do estudo foi realizada, uma vez que se trata de estudo duplo cego e que não foram observados efeitos adversos. Portanto, a análise somente está prevista para o final do estudo a não ser que haja publicação demonstrando benefício ou algum tipo de intercorrência ou dano, no grupo em uso de progesterona.

Incluimos entrada de dois novos pesquisadores Prof. Rossana Pulcinelli Vieira Francisco e Dra. Lília Araújo Moura Lima de Oliveira.

Atenciosamente,

Maria de Lourdes Brizot

Pesquisadora responsável

ANEXO 2**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Todas as gestações de gêmeos têm risco aumentado do parto ocorrer antes dos 9 meses. Como você já sabe, o parto prematuro pode causar problemas ao recém-nascido, como pouco peso ao nascimento dificuldade para respirar sozinho, manter a temperatura do corpo estável e pegar infecções. Existe um hormônio que as mulheres produzem na gestação, ele se chama progesterona, e é responsável pela manutenção da gravidez. Hoje esse hormônio já pode ser usado por meio de óvulos vaginais. Não sabemos se esse óvulo de progesterona ajudaria a diminuir o número de gêmeos que nascem antes de 9 meses. O que se sabe é que esta medicação já foi usada em gestações com um único bebê com bons resultados. Para que nós possamos ter certeza de que não haverá diferença entre usar e não usar estes óvulos, nós precisamos que haja um grupo utilizando a progesterona e outro grupo utilizando placebo, que também é um óvulo, só que sem nenhuma medicação, a qual não fará mal nenhum a você ou ao seu bebê. Só assim poderemos, ao final desse estudo, ter a certeza de que todas as pacientes que participaram foram tratadas da mesma maneira, sem diferença pelo uso ou não da progesterona, sendo, por tanto, nosso resultado final muito fiel. Durante a sua gestação você pode desistir de participar desse estudo há qualquer momento, sem que isso traga prejuízo ao seu tratamento nesse hospital.

Eu, _____, declaro que após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e Ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente protocolo de pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

assinatura da paciente

assinatura do pesquisador

9 REFERÊNCIAS

1. Blickstein I. Definition of multiple pregnancy. In: Blickstein I and Keith L. *Multiple pregnancy: epidemiology, gestation & perinatal outcome*, United Kingdom: Informa Healthcare, editor; 2006. Second edition. p. 85-6.
2. DATASUS. Disponível em:
<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205>.
3. Ghai V, Vidyasagar D. Morbidity and mortality factors in twins: an epidemiologic approach. *Clin Perinatol*. 1988;15:123-40.
4. Gardner MO, Goldenberg RL, Cliver SP, Tucker JM, Nelson KG, Copper RL. The origin and outcome of preterm twin pregnancies. *Obstet Gynecol*. 1995;85:553-7.
5. Silva JLP. Prematuridade: Aspectos Obstétricos. In: *Neme Obstetrícia Básica*. São Paulo: Sarvier; 2000. cap.65, p.561-73.
6. Confidential Enquiry into Maternal and Child Health. *Perinatal Mortality 2007: United Kingdom*. London: CEMACH; 2009.
7. Fujita MM, Brizot ML, Liao AW, Bernath T, Cury L, Banduki NJD, Zugaib M. Reference range for cervical length in twin pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2002; 81(9):856-9.
8. Bland RD, Bressack MA, McMillan DD. Labor decreases the lung water content of newborn rabbits. *Am J Obstet Gynecol*. 1979;135:364-7.

9. Gotsch F, Gotsch F, Romero R, Erez O, Vaisbuch E, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, Kim SK, Hassan S, Yeo L. The preterm parturition syndrome and its implications for understanding the biology, risk assessment, diagnosis, treatment and prevention of preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009; 22(S2): 5-23.
10. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, Chaiworapongsa T, Mazor M. The preterm parturition syndrome. *BJOG.* 2006;113(Suppl.3):17-42.
11. Romero R, Gomez R, Mazor M, Ghezzi F, Yoon BH. The preterm labor syndrome. In: Elder MG, Romero R, Lamont RF, editors. Preterm labor. New York, NY: Churchill Livingstone; 1997. p.29-49.
12. Rezende J, Montenegro CAB. Obstetrícia fundamental. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.
13. Zugaib M. Zugaib Obstetrícia. Barueri, SP: Manole; 2012.
14. Yoshizaki CT, Bittar RE, Francisco RPV, Zugaib M. Progesterona para prevenção do parto prematuro. *Femina.* 2012;40(2):79-86
15. Mendelson CR. Minireview: fetal-maternal hormonal signaling in pregnancy and labor. *Molec Endocrinol.* 2009;23:947-54.
16. Stock S, Norman J. Preterm and term labour in multiple pregnancies. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010;15(6):336-341.
17. Tibbetts TA, Conneely OM, O'Malley BW. Progesterone via its receptor antagonizes the pro-inflammatory activity of estrogen in the mouse uterus. *Biol Reprod.* 1999; 60:1158-1165.

18. Chwalisz K. The use of progesterone antagonists for cervical ripening and adjunct to labour and delivery. *Hum Reprod.* 1994;9(Suppl 1):131-61.
19. Ruddock N, Shi SQ, Jain S, Moore G, Hankins G, Romero R, Garfield R. Progesterone (P4) inhibits human myometrial contractions during pregnancy by action on membrane receptors (mPR). *Reprod Sci.* 2008;15:186A.
20. Anderson L, Martin W, Higgins C, Nelson SM, Norman JE. The effect of progesterone on myometrial contractility, potassium channels and tocolytic efficacy. *Reprod Sci.* 2009;16(11):1052-1061.
21. Yemini M, Borestein R, Dreazen E, Aelman Z, Molginer BM, Kessler I, Lancet M. Prevention of premature labor by 17- α -hydroxyprogesterone caproate. *Am J Obstet Gynecol.* 1985;151(5):547-7.
22. Johnson JWC, Austin KL, Jones GS, Davis GH, King TM. Efficacy of 17- α -hydroxiprogesterone caproate in the prevention of premature labor. *N Engl J Med.* 1975;293:675-80.
23. Fonseca EB, Bittar RE, Carvalho MH, Zugaib M. Prophylatic administration of progesterone by vaginal suppository to reduce the incidence of spontaneous preterm birth in women at increased risk? A randomized placebo-controlled double-blind study. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:419-424.
24. Noblot G, Audra P, Dargent D, Faguer B, Mellier G. The use of micronized progesterone in the treatment of menace of preterm delivery. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1991;40(3):203-9.
25. Keirse MJN. Progestogen administration in pregnancy may prevent preterm delivery. *Br J Obstet Gynecol.* 1990;97:149-54.

26. Eddama O, Ptrou S, Regier D, Norrie J, MacLennan G, Mackenzie F, Norman JE. Study of progesterone for the prevention of preterm birth in twins (STOPPIT): findings from a trial-based cost-effectiveness analysis. *Int J Technol Assess Health Care*. 2010;26(2):141-148.
27. Klein K, Rode L, Nicolaides KH, Krampfl-Bettelheim E, Tabor A; PREDICT Group. Vaginal micronized progesterone and risk of preterm delivery in high-risk twin pregnancies: secondary analysis of a placebo-controlled randomized trial and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2011;38(3):281-287.
28. Norman JE, Mackenzie F, Owen P, Mactier H, Hanretty K, Cooper S, Calder A, Mires G, Danielian P, Sturgiss S, MacLennan G, Tydeman G, Thornton S, Martin B, Thornton JG, Neilson JP, Norrie J. Progesterone for the prevention of preterm birth in twin pregnancy (STOPPIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled study and meta-analysis. *Lancet*. 2009 Jun 13;373 (9680):2034-40.
29. Rode L, Klein K, Nicolaides KH, Krampfl-Bettelheim E, Tabor A; PREDICT Group. Prevention of preterm delivery in twin gestations (PREDICT): a multicenter, randomized, placebo-controlled trial on the effect of vaginal micronized progesterone. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011 Sep;38(3):272-80.
30. Brizot ML, Hernandez W, Liao AW, Bittar RE, Francisco RP, Krebs VL, Zugaib M. Vaginal progesterone for the prevention of preterm birth in twin gestations: a randomized placebo-controlled double-blind study. *Am J Obstet Gynecol* 2015 Feb 27. pii:S0002-9378(15)00157-X. doi: 10.1016/j.ajog.2015.02.021.
31. Turton P, Arrowsmith, Prescott J, Ballard C, Bricker L, Neilson J, Wray S. A comparison of the contractile properties of myometrium from singleton and twin pregnancies. *PLoS One*. 2013;8(5):e63800.

32. Newman RB, Gill PJ, Campion S, Katz M. The influence of fetal number on antepartum uterine activity. *Obstet Gynecol.* 1989;73:695-9.
33. Newman RB, Gill PJ, Katz M. Uterine activity during pregnancy in ambulatory patients: Comparison of singleton and twin gestations. *Am J Obstet Gynecol.* 1986;154:530-1.
34. Garite TJ, Bentley DL, Hamer CA, Porto ML. Uterine activity characteristics in multiple gestations. *Obstet Gynecol.* 1990 jul;76(1 Suppl):565-95.
35. Neme B. *Obstetrícia básica*. São Paulo: Sarvier; 2000.
36. Alvarez H, Caldeyro-Barcia R. Contractility of the human recorded by new methods. *Surg Gynecol Obstet.* 1950;91:1-11.
37. Reynolds SRM, Harris JS, Kaiser IH. Clinical measurement of uterine forces in pregnancy and labor. Springfield (IL): Charles C Thomas; 1954.
38. Zahn V. Uterine contractions during pregnancy. *J Perinatal Med.* 1984; 12:107-13.
39. Moore TR, Iams JD, Creasy RK, Burau KD, Davidson AL. Diurnal and gestational patterns of uterine activity in normal human pregnancy. The Uterine Activity in Pregnancy Working Group. *Obstet Gynecol.* 1994; 83(4):517-23.
40. Schwenzer TH, Schumann R, Halberstald E. The importance of 24 hour cardiotocographic monitoring during tocolytic therapy. In: Jung H, Lambert J, editors. Beta-mimetic drugs in obstetrics and perinatology. New York: Thieme-Stratton; 1982. p.60-4.

41. Bruns PD, Taylor ES, Anker RM, Droese VE. Uterine contractility, circulation and urinary steroids in premature delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 1957;73(3):579-88.
42. Aubry RH, Pennington JC. Identification and evaluation of high risk pregnancy: the perinatal concept. *Clin Obstet Gynecol.* 1973;16:3-13.
43. Katz M, Gill PJ, Newman RB. Detection of preterm labor by ambulatory monitoring of uterine activity: a preliminary report. *Obstet Gynecol.* 1986;68:773-89.
44. Katz M, Newman RB, Gill PJ. Assessment of uterine activity in ambulatory patients at high risk for preterm labor and delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 1986;154:44-7.
45. Morrison JC, Martin Jr JN, Martin RW, Gookin KS, Wiser WL. Prevention of preterm birth by ambulatory assessment of uterine activity: a randomized study. *Am J Obstet Gynecol.* 1987;156(3):536-43.
46. Committee on Obstetric Practice. Home uterine activity monitoring. ACOG Committee Opinion #172. Washington: *American College of Obstetricians and Gynecologists*; 1989.
47. Knuppel RA, Lake MF, Watson DL, Welch RA, Hill WC, Fleming AD, Martin RW, Bentley DL, Moenning RK, Morrison JC. Preventing preterm birth in twin gestation: home uterine activity monitoring and perinatal nursing support. *Obstet Gynecol.* 1990;76(1 Suppl):24S-27S.
48. Mou SM, Sunjerji SG, Gall S, How H, Patel V, Gray M, Kayne HL, Corwin M. Multicenter randomized clinical trial of home uterine activity monitoring for detection of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 165 (4 Pt 1):858-66.

49. Committee on Obstetrics Practice. Home uterine activity monitoring. ACOG Committee Opinion#172. Washington: *American College of Obstetricians and Gynecologists*; 1992.
50. Newman RB. Uterine contraction assessment. *Obstet Gynecol Clin N Am*. 2005;32:341-367.
51. Stock S, Norman J. Preterm and term labour in multiple pregnancies. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2010;15:336-341.
52. Rouse DJ, Caritis SN, Peaceman AM, Sciscione A, Thom EA, Spong CY, Varner M, Malone F, Iams JD, Mercer BM, Thorp J, Sorokin Y, Carpenter M, Lo J, Ramin S, Harper M, Anderson G; National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network, National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. A trial of 17 alpha-hydroxyprogesterone caproate to prevent prematurity in twins. *N Engl J Med*. 2007;357(5):454-61.
53. Norman JE, Mackenzie F, Owen P, Mactier H, Hanretty K, Cooper S, Calder A, Mires G, Danielian P, Sturgiss S, MacLennan G, Tydeman G, Thornton S, Martin B, Thornton JG, Neilson JP, Norrie J. Progesterone for the prevention of preterm birth in twin pregnancy (STOPPIT): a randomized, double-blind, placebo-controlled study and meta-analysis. *Lancet*. 2009;373(9680):2034-40.
54. Klein K, Rode L, Nicolaides KH, Krampfl-Bettelheim E, Tabor A. Vaginal micronized progesterone and risk of preterm delivery in high-risk twin pregnancies: secondary analysis of a placebo-controlled randomized trial and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2011;38:281-287.

-
55. Rode L, Klein K, Nicolaides KH, Krampfl-Bettelheim E, Tabor A. Prevention of preterm delivery in twin gestations (PREDICT): a multicenter, randomized, placebo-controlled trial on the effect of vaginal micronized progesterone. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;38:272-280.
 56. Serra V, Perales A, Meseguer J, Parilla JJ, Lara C, Bellver J, Grifol R, Alcover I, Sala M, Martinez-Escoriza JC, Pellicer A. Increased doses of vaginal progesterone for the prevention of preterm birth in twin pregnancies: a randomized controlled double-blind multicenter trial. *BJOG.* 2013;120:50-57.
 57. Schuit E, Stock S, Groenwold RHH, Maurel K, Combs CA, Garite T, Spong CY, Thom EA, Rouse DJ, Caritis SN, Saade GR, Zachary JM, Norman JE, Rode L, Klein K, Tabor A, Cetingöz E, Morrison JC, Magann EF, Briery CM, Serra V, Perales A, Meseguer J, Nassar AH, Lim AC, Moons KG, Kwee A, Mol BW. Progestogens to prevent birth in twin pregnancies: an individual participant data meta-analysis of randomized trials. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2012;12:13.
 58. Newman RB, Gill PJ, Champion S, Katz M. Antepartum ambulatory tocodynamometry: The significance of low-amplitude, high-frequency contractions. *Obstet Gynecol.* 1987;70:701-5.
 59. Newman RB, Iams JD, Das A, Goldenberg RL, Meis P, Moawad A, Sibai BM, Caritis SN, Miodovnik M, Paul RH, Dombrowski MP, Fischer M; National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. A prospective masked observational study of uterine contraction frequency in twins. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195(6):1564-70.

-
60. Hernandez AR, Gonzalez-Quintero VH, Istwan N, Rhea D, Vasquez-Vera E, Flick AA, Stanziano G. Antepartum uterine contraction patterns in twin pregnancies with and without preterm labor and delivering before or after 36 weeks. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198(5):e28-9.
 61. O'Brien JM, Ho SJ, Istwan NB, Stanziano GJ, Rhea DJ, Barton JR. Uterine activity in women receiving 17 α -hydroxyprogesterone caproate for the prevention of preterm birth: an observacional study. *Am J Perinatol*. 2010;27(2):157-162.
 62. Heath VCF, Southall TR, Souza AP, Novakov A, Nicolaides KH. Cervical length at 23 weeks of gestation: Relation to demographic characteristics and previous obstetric history. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1998;12(5):304-311.
 63. Scottish Perinatal and Infant Mortality and Morbidity Report, 2007. Edinburg: Information Sevices Division, NHS Scotland; 2008. Ref Type: Report.
 64. Turton P, Neilson JP, Quenby S, Burdyga T, Wray S. A short review of twin pregnancy and how oxytocin receptor expression may differ in multiple pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009;144 Suppl 1:S40-44.
 65. Newman RB, Ellings JM, O'Reilly MM, Brost BC, Miller MC 4rd, Gates D Jr. Correlation of antepartum uterine activity and cervical change in twin gestation. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)*. 1997;46(1):1-7.
 66. Norman JE, Yuan M, Anderson L, Howie F, Harold G, Young A, Jordan F, McInnes I, Harnett MM. Effect of prolonged in vivo administration of progesterone in pregnancy on myometrial gene expression, peripheral blood leukocyte activation, and circulating steroid hormone levels. *Reprod Sci*. 2011;18(5):435-446.

-
67. Moise J, Laor A, Armon Y, Gur I, Gale R. The outcome of twin pregnancies after IVF. *Hum Reprod*. 1998;13(6):1702-1705.
 68. Nassar AH, Usta IM, Rechdan JB, Harb TS, Adra AM, Abu-Musa AA. Pregnancy outcome in spontaneous twins versus twins who were conceived through in vitro fertilization. *Am J Obstet Gynecol*. 2003; 189(2):513-8.
 69. Germain AM, Valenzuela GJ, Ivankovic M, Ducsay CA, Gabella C, Seron-Ferre M. Relationship of circadian rhythms of uterine activity with term and preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*. 1993;168:1271-7.
 70. Maggio L, Rouse DJ. Progesterone. *Clin Obstet Gynecol*. 2014; 57(3):547-556.
 71. Garfield RE, Saade G, Buhimschi C, Buhimschi I, Shi L, Shi SQ, Chwalisz K. Control and assessment of the uterus and cervix during pregnancy and labour. *Hum Reprod Update*. 1998;4(5):673-695.
 72. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science*. 2014;345(6198):760-65.
 73. Luo G, Abrahams VM, Tadesse S, Funai EF, Hodgson EJ, Gao J, Norwitz ER. Progesterone inhibits basal and TNF-alpha-induced apoptosis in fetal membranes: a novel mechanism to explain progesterone-mediated prevention of preterm birth. *Reprod Sci*. 2010;17(6):532-9.
 74. Committee on Practice Bulletins-Obstetrics, The American College of Obstetricians and Gynecologists. Practice bulletin no. 130: prediction and prevention of preterm birth. *Obstet Gynecol*. 2012;120:964-973.

-
75. Waldorf KA, Sooranna S, Gravett M, Paoletta L, Ngo L, Tsai J, Bammler T, MacDonald J, Farin F, Rajagopal L, Jonhson M. Acute uterine stretch induces an inflammatory "pulse" in amniotic fluid and maternal plasma followed by preterm labor in nonhuman primates. *Reprod Sci.* 2014;21(3 Suppl): 96-A.
 76. Ou CW, Chen ZQ, Qi S, Lye SJ. Increased expression of the rat myometrial oxytocin receptor messenger ribonucleic acid during labor requires both mechanical and hormonal signals. *Biol Reprod.* 1998;59: 1055-61.
 77. Lei K, Chen L, Cryar BJ, Hua R, Sooranna SR, Brosens JJ, Bennett PR, Jonhson MR. Uterine stretch and progesterone action. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(6):E1013-24.
 78. Romero R, Espinosa J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med.* 2007;25:21-39.
 79. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000;118:503-8.
 80. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 2000;117: 1162-72.
 81. Ekelund CK, Vogel I, Skogstrand K, Thorsen P, Hougaard DM, Langhoff-Roos J, Jacobsson B. Interleukin-18 and interleukin-12 in maternal serum and spontaneous preterm delivery. *J Reprod Immunol* 2008;77(2):179-85.

-
82. Holst RM, Mattsby-Baltzer I, Wennerholm UB, Hagberg H, Jacobsson B. Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical fluid in a population of Swedish women in preterm labor: relationship to microbial invasion of the amniotic fluid, intra-amniotic inflammation, and preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005;84:551-7.
 83. Goepfert AR, Goldenberg RL, Andrews WW, Hault JC, Mercer B, Iams J, Meis P, Moawad A, Thom E, VanDorsten JP, Caritis SN, Thurnau G, Miodovnik M, Dombrowski M, Roberts J, McNellis D; National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. The Preterm Prediction Study: association between cervical interleukin 6 concentration and spontaneous preterm birth. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184(3):483-8.
 84. Hee L, Kirkegaard I, Vogel I, Thorsen P, Skogstrand K, Hougaard DM, Uldbjerg N, Sandager P. Low serum interleukin-17 is associated with preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2011;90(1):92-6.
 85. Winkler M. Role of cytokines and other inflammatory and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med.* 2007;25:21-39.
 86. Winkler M, Fisher DC, Ruck P, Marx T, Kaiserling E, Oberpichler A, Tschesche H, Rath W. Parturition at term: parallel increases in interleukin-8 and proteinase concentrations and neutrophil count in the lower uterine segment. *Hum Reprod.* 1999;14(4):1096-100.
 87. Schwartz N, Xue X, Elovitz MA, Dowling O, Metz CN. Progesterone suppresses the fetal inflammatory response ex vivo. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;201(2):211.e1-9.

88. Perni SC, Kalish RB, Hutson JM, Karasahin E, Bongiovanni AM, Ratushny V, Chasen ST, Witkin SS. Differential expression of immune system-related components in midtrimester amniotic fluid from singleton and twin pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;193:942-6.
89. Wennererholm UB, Holm B, Mattsby-Baltzer I, Nielsen T, Platz-Christensen JJ, Sundell G, Hagberg H. Interleukin-1 α , interleukin-6 and interleukin-8 in cervico/ vaginal secretion for screening of preterm birth in twin gestation. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1998;77:508-514.
90. Barclay C, Brennand J, Kelly R, Calder A. Interleukin-8 production by the human cervix. *Am J Obstet Gynecol*. 1993;169:625-32.
91. Rode L, Klein K, Larsen H, Holmskov A, Andreassen KR, Uldbjerg N, Ramb J, Bødker B, Skibsted L, Sperling L, Hinterberger S, Krebs L, Zingenberg H, Weiss EC, Strobl I, Laursen L, Christensen JT, Skogstrand K, Hougaard DM, Krampfl-Bettelheim E, Rosthøj S, Vogel I, Tabor A. Cytokines and the risk of preterm delivery in twin pregnancies. *Obstet Gynecol*. 2012;120(1):60-8.
92. Lewi L, Cannie M, Blickstein I, Jani J, Huber A, Hecher K, Dymarkowski S, Gratacós E, Lewi P, Deprest J. Placental sharing, birthweight discordance, and vascular anastomoses in monochorionic diamniotic twin placentas. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;197(6):587.e1-8.
93. Hack KE, Derks JB, de Visser VL, Elias SG, Visser GH. The natural course of monochorionic and dichorionic twin pregnancies: a historical cohort. *Twin Res Hum Genet*. 2006;9(3):450-5.