



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Natália Prearo Moço

**Expressão gênica e proteica de receptores *Toll-like* em
células do sangue periférico materno de gestações
normais e complicadas por prematuridade.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

**Botucatu
2015**

Natália Prearo Moço

Expressão gênica e proteica de receptores *Toll-like* em células do sangue periférico materno de gestações normais e complicadas por prematuridade.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Botucatu
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Moço, Natalia Prearo.

Expressão gênica e proteica de receptores Toll-like em células do sangue periférico materno de gestações normais e complicadas por prematuridade. / Natalia Prearo Moço. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Márcia Guimarães da Silva
Capes: 40103005

1. Citometria de fluxo. 2. Imunidade natural. 3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Receptores Toll-like. 5. Expressão gênica. 6. Gravidez. 7. Parto (Obstetrícia).

Palavras-chave: Citometria de fluxo; Imunidade inata; PCR em tempo real; Parto pré-termo; TLRs.

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Washington e Terezinha.***

Agradecimentos

Foram muitas as pessoas que passaram pela minha vida ao longo desses quatro anos e que, de algum modo, tiveram participação nesse trabalho de Doutorado. Portanto, a missão de deixar aqui meus agradecimentos é uma tarefa árdua.

*Primeiramente agradeço a **Deus** pelo dom da Vida e por guiar meus passos e cuidar de mim em todos os momentos. Obrigada por ser minha força, minha luz e meu abrigo.*

*Agradeço de modo especial ao casal mais lindo desse mundo - meus pais **Washington e Terezinha** - pelo apoio incondicional, pela confiança e pelo amor infinito. Não estaria aqui se não fosse por vocês.*

*Agradeço às minhas irmãs **Ana Carolina e Bruna**, minhas amigas de mais longa data. Cada uma tem de mim um pedaço do coração. Ana, obrigada também por ter me dado um cunhado tão incrível como o **Ruberci** e por vocês dois serem um ponto de apoio sempre que preciso.*

*Agradeço aos meus sobrinhos **João Pedro e João Victor** por terem me ensinado ao longo dos anos a amar de uma maneira imensa e indescritível. Depois que vocês nasceram tive certeza de que meu coração não mora mais em mim. Obrigada pela amizade, pelas alegrias e pelo carinho.*

*E não posso deixar de falar do nosso pequeno **Francisco** que vem chegando e já é tão amado pela tia coruja e por todos dessa família.*

*Agradeço ao **Carlos Guilherme**, que entrou na minha vida ainda no final do Mestrado e acompanhou tão de perto esses quatro anos de experimentos, relatórios, artigos e muito estresse do Doutorado. O seu amor e a sua companhia tornaram tudo mais fácil. Obrigada por tudo.*

*Agradeço ao melhor trio de amigas que alguém poderia ter: **Elisângela, Joice e Juliana**. São tantos anos de amizade e companheirismo que já não imagino meus dias sem vocês.*

*Agradeço ao eterno quinteto dos distantes anos de graduação formado pelos amigos especiais **Jumbo, K-vux, Dizcobre e Urutau**. Amo vocês. Para sempre. E não posso deixar de agradecer também a amizade de pessoas tão queridas que encontrei nos anos de Botucatu como **E-coli, Kimera, Chandelle, Hã, K-lúnia, Mukeka, Kuíka, Caracas** e tantos outros!*

*Agradeço a todos do **Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal** pela convivência nesses últimos sete anos! Obrigada pelo conhecimento compartilhado, pelo amadurecimento profissional e pela ajuda em tantos momentos importantes dessa caminhada.*

*Agradeço de maneira especial aos queridos companheiros de vida e de trabalho **Ana Carolina, Gabriel e Laura**. Cada um de vocês sabe a importância que têm dentro e fora dessas paredes laboratoriais. Jamais esquecerei as conversas, o companheirismo, as risadas e o apoio de cada um de vocês. Obrigada por tudo.*

*Agradeço também à professora **Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio** e suas alunas **Amanda, Juliana e Luciana**, por terem me acolhido em seu laboratório e por terem ajudado em tantos experimentos. Obrigada pelas conversas e pela companhia de sempre.*

*Agradeço de modo especial à minha orientadora **Márcia Guimarães da Silva**. Suas aulas ainda na graduação foram o início da minha vontade de ser o que sou hoje. Obrigada pelo exemplo de determinação, dedicação e imenso amor pelo que faz. Obrigada por me fazer amar a pesquisa científica e por acreditar em mim durante todos esses anos.*

*Agradeço a **Secretaria da Saúde do Município de Botucatu** por ter permitido a realização desse trabalho. Obrigada pela confiança.*

*Agradeço também as **enfermeiras das Unidades Básicas de Saúde** onde parte das coletas foi realizada. A ajuda de vocês foi de extrema importância para a conclusão desse trabalho.*

*Agradeço aos docentes, residentes e funcionários do **Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu** e aos residentes e enfermeiras do **Departamento Ginecologia e Obstetrícia** pela colaboração com o nosso intuito e pela ajuda durante as coletas.*

*Agradeço a todas as **gestantes** que entenderam o valor desse trabalho e aceitaram participar dele com muita boa vontade. Vocês são a razão de nossos esforços.*

*Finalmente, agradeço a **FAPESP** pelo Auxílio de Pesquisa e pela bolsa de Doutorado que tornaram esse trabalho possível.*

Resumo

Introdução: A prematuridade é a principal causa de mortalidade neonatal e os riscos de complicações decorrentes são inversamente proporcionais à idade gestacional na qual o parto ocorre. Diversos estudos na literatura demonstram o papel da resposta imune inata e dos receptores *Toll-like* (TLRs) durante a gestação normal e na presença de complicações gestacionais. A expressão de TLRs vem sendo avaliada principalmente nos tecidos da interface materno-fetal e os resultados de tais estudos são conflitantes. A investigação da expressão de TLRs em tecidos gestacionais é de grande importância para o entendimento da participação da imunidade inata em gestações normais e com desfechos gestacionais adversos, porém tais tecidos permitem análise somente após a resolução da gestação. Nesse contexto, uma possível fonte de estudo para análise de TLRs no decorrer da gestação em curso são as células do sangue periférico materno, uma vez são facilmente obtidas por punção venosa, além de possuírem papel fundamental na resposta imune inata e expressarem diversos tipos de TLRs. **Objetivo:** Traçar o perfil de expressão gênica e proteica de receptores *Toll-like* 1, -2, -4 e -6 em células mononucleares (PBMCs) e em neutrófilos do sangue periférico materno ao longo da gestação normal e na prematuridade. **Materias e métodos:** Foram incluídas no estudo 119 gestantes normais, as quais foram subdivididas em trimestres de acordo com sua idade gestacional. Além disso, foram avaliadas 20 gestantes em trabalho de parto pré-termo e 18 gestantes de termo. A análise de expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real e a avaliação da expressão proteica por citometria de fluxo. Para a análise dos dados foram empregados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney através do software SigmaStat 3.1. **Resultados:** Em relação às PBMCs, não foram observadas diferenças significativas nas expressões gênica e proteica de TLR-1, TLR-2, TLR-4 e TLR-6 entre os trimestres gestacionais. O mesmo foi observado comparando-se PBMCs de gestantes pré-termo e de termo. Em relação aos neutrófilos, as expressões gênica e proteica de TLR-1, TLR-2, TLR-4 e TLR-6 não se alteraram ao longo da gestação normal. Comparando-se neutrófilos de gestações pré-termo e de termo, a expressão gênica de TLR-1 ($p < 0,001$), TLR-2 ($p = 0,004$) e TLR-4 ($p = 0,004$) foi significativamente superior no grupo pré-termo. Entretanto, a expressão proteica desses receptores não diferiu entre os grupos. Em relação ao TLR-6,

não foram observadas diferenças significativas nas expressões gênica e proteica entre neutrófilos de gestações pré-termo e de termo. **Discussão:** Os resultados demonstram que as expressões gênica e proteica de TLRs em PBMCs e neutrófilos maternos não são temporalmente reguladas ao longo da gestação normal. Além disso, os dados sugerem que a análise da expressão de TLRs em células do sangue periférico materno não é um parâmetro útil como biomarcador molecular para risco de parto pré-termo.

Abstract

Introduction: Prematurity is the leading cause of neonatal mortality and serious neonatal morbidity worldwide and the risk is inversely proportional to gestational age at birth. Several studies demonstrate the role of innate immune response and Toll-like receptors (TLRs) in normal and complicated pregnancies, however most studies have focused on the tissues of the maternal-fetal interface. Research of the expression of TLRs in gestational tissues is of great importance for understanding the involvement of innate immunity in normal pregnancies and adverse pregnancy outcomes, but the analysis of these tissues allows for results only after the complete resolution of gestation. In this scenario, a potential biological sample of interest for analysis of TLRs in the ongoing gestation are maternal peripheral blood cells, since they play a crucial role in the immune system and express high levels of many of the TLRs. **Main:** Evaluate the profile of gene expression of TLR-1, -2, -4 and -6 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and polymorphonuclear cells (PMNs) and compare these expressions between preterm and term pregnancies. **Materials and methods:** 119 normal pregnant women were included in the study, subdivided into three groups according to the gestational trimester. In addition, 20 pregnant women in preterm labor and 18 pregnant women at term were evaluated. Gene expression analysis was performed by real-time PCR and protein expression evaluation by flow cytometry. Statistical analyses were performed using the nonparametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests by SigmaStat 3.1 software. **Results:** Regarding PBMCs, there were no significant differences in gene and protein expressions of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and TLR-6 among the trimesters. The same was observed when comparing PBMCs of preterm and term pregnancies. In relation to neutrophils, gene and protein expressions of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and TLR-6 remained unchanged throughout normal gestation. Comparing neutrophils of pre-term and term pregnancies, the gene expression of TLR-1 ($p < 0.001$), TLR-2 ($p = 0.004$) and TLR-4 ($p = 0.004$) was significantly higher in the preterm group. However, the protein expression of these receptors did not differ between the groups. Regarding TLR-6, there were no significant differences in gene and protein expressions between neutrophils of preterm and term pregnancies. **Discussion:** Our results suggest that TLRs expression in maternal PBMCs and PMNs is not temporally regulated over the

course of normal pregnancy. Moreover, the evaluation of gene and protein expression of TLRs in neutrophils and PBMCs from peripheral maternal blood is not useful as molecular biomarkers of preterm labor.

Lista de abreviações

ASC:	Proteína associada a apoptose contendo domínio CARD
CARD:	Domínio de recrutamento de caspase (<i>Caspase recruitment domain</i>)
DAMP:	Padrão molecular associado ao dano (<i>Damage-associated molecular pattern</i>)
ERO:	<i>Espécie reativa do oxigênio</i>
HMGB1:	<i>High-mobility group protein B1</i>
HSP:	Proteína de choque térmico (<i>Heat shock protein</i>)
IE-DAP:	Ácido gama-D-glutamil meso-diaminopilémico
IFN:	Interferon
IRAK:	Quinase associada ao receptor de IL-1 (<i>IL-1 receptor-associated kinase</i>)
IRF3:	Fator regulador de Interferon 3 (<i>Interferon regulatory factor 3</i>)
IRF7:	Fator regulador de Interferon 7 (<i>interferon regulatory factor 7</i>)
LBP:	Proteína ligante de LPS (<i>LPS-binding protein</i>)
LPS:	Lipopolissacarídeo
LRR:	Repetições ricas em leucina (<i>Leucine-rich repeats</i>)
MAPK:	Proteína quinases associadas à mitógeno (<i>Mitogen-activated protein kinases</i>)
MDA5:	Gene de melanoma associado à diferenciação 5
MDP:	Muramil dipeptídeo
MMP:	Matrix metaloproteinase
MyD88:	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NET:	<i>Neutrophil extracellular trap</i>
NF-kB:	Fator nuclear kB
NLR:	Receptor semelhante a NOD (<i>Nod-like receptor</i>)
NOD:	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OMS:	Organização Mundial da Saúde
PAMP:	Padrões moleculares associados a patógenos (<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBMCs:	Células mononucleares do sangue periférico (<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR:	Reação em cadeia da polimerase
PDLIM2:	<i>PDZ and LIM domain protein 2</i>
PG:	Peptideoglicano
PMNs:	Células polimorfonucleares (<i>Polymorphonuclear cells</i>)
PRR:	Receptor de reconhecimento de padrão (<i>Pattern recognition receptor</i>)
RIG-I:	Gene indutível por ácido retinóico I
RLR:	Receptor semelhante a RIG (<i>RIG-like receptor</i>)
RP105:	<i>Radioprotective 105</i>
RPM-PT:	Rotura prematura de membranas pré-termo
S100A8:	<i>S100 calcium binding protein A8</i>
SHP:	<i>Small heterodimer partner</i>
ST2I:	<i>Single immunoglobulin IL-1R-related molecule</i>
TAG:	<i>TRAM adaptor with GOLD domain</i>
TANK:	Proteína ligadora de TRAF (<i>TRAF family member-associated NF-kappa-B</i>)
TIR:	Domínio receptor Toll/IL-1 (<i>Toll/Interleukin-1 receptor domain</i>)
TLR:	Receptor <i>Toll-like</i> (<i>Toll-like receptor</i>)
TPP:	Trabalho de parto pré-termo com bolsa íntegra
TRAF-6	Fator 6 associado ao TNF-R (<i>TNF receptor-associated factor 6</i>)
TRAM:	Molécula adaptadora associada ao TRIF (<i>TRIF-related adaptor molecule</i>)
TRIF:	Proteína adaptadora contendo o domínio TIR (<i>TIR-domain-contain adapter-inducing interferon β</i>)

Sumário

SUMÁRIO

Capítulo I

Revisão da literatura.....	2
Referências bibliográficas.....	25

Capítulo II

“Evaluation of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and TLR-6 gene and protein expression in maternal PBMCs and PMNs during normal pregnancy and preterm labor”	38
Abstract.....	39
Introduction.....	40
Material and Methods.....	42
Results.....	47
Discussion.....	61
References.....	65
Conclusão.....	72
Anexos.....	73

Revisão bibliográfica

Imunidade inata e receptores de reconhecimento de padrão (PRRs)

A resposta imune inata constitui mecanismo de defesa primordial contra a invasão de patógenos, contribuindo na identificação e na erradicação de agentes infecciosos. A imunidade inata tem como uma das principais funções responder rapidamente aos microrganismos, prevenindo, controlando ou eliminando infecções causadas por diversos patógenos, além de reconhecer produtos de células danificadas e mortas, atuando na eliminação das mesmas e de estimular os mecanismos de imunidade adaptativa, podendo influenciar as respostas de natureza mais específicas¹.

A ação do sistema imune inato na detecção de microrganismos invasores baseia-se no reconhecimento de estruturas moleculares que são características de patógenos microbianos, as quais são denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs)¹. Diferentes classes de microrganismos apresentam diferentes PAMPs em sua estrutura. Dentre esses PAMPs destacam-se ácidos nucleicos como RNA de fita dupla e de fita simples encontrados em vírus, proteínas como pilina e flagelina encontradas em bactérias, lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas e ácido lipoteicoico de bactérias Gram-positivas, além de carboidratos como mananas e glucanas encontrados em fungos e bactérias^{1,2}. Adicionalmente ao reconhecimento microbiano, a imunidade inata atua no reconhecimento de moléculas endógenas que são liberadas por células danificadas ou mortas, as quais são denominadas de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs)^{1,2}. A presença de DAMPs pode ser resultante de processos infecciosos, porém eles são produzidos também em situações de lesões celulares assépticas que podem ser causadas por toxinas químicas, queimaduras, traumas mecânicos e redução do suprimento de oxigênio³.

O reconhecimento de PAMPs e DAMPs pelo sistema imune inato ocorre através de receptores especiais denominados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs)^{1,2}. Esses receptores são expressos por diversos tipos celulares e encontram-se na membrana plasmática, na membranas dos endossomos e no citoplasma dessas células^{1,2}. A localização privilegiada dos PRRs permite que o sistema imune inato reconheça microrganismos presentes tanto fora quanto no interior de diferentes compartimentos celulares. Diferentes PRRs interagem com diferentes PAMPs,

ativando vias de sinalização específicas². Dentre as principais funções dos PRRs destacam-se opsonização, ativação do sistema complemento, fagocitose, indução de apoptose e ativação de vias de sinalização de citocinas pró-inflamatórias².

Dentre os PRRs citosólicos, ou seja, receptores que detectam PAMPs ou DAMPs no citoplasma das células, merecem destaque os receptores semelhantes ao NOD (*NLRs*) e os receptores semelhantes a RIG (*RLRs*)¹.

A família NLR é uma classe de receptores intracelulares composta por mais de 20 diferentes proteínas citosólicas. Essas proteínas são capazes de reconhecer PAMPs e DAMPs, desencadeando o recrutamento de outras proteínas, o que culmina na formação de complexos de sinalização intracelulares relacionados com a inflamação¹. Os membros da família NLR são caracterizados pela presença de pelo menos três domínios com estruturas e funções diferentes. O primeiro é o domínio rico em repetições de leucina (LRR), o qual é responsável pelo reconhecimento do ligante em si, o segundo é um domínio NACHT, que permite a formação de oligômeros entre os NLRs e o terceiro é um domínio efetor, geralmente um domínio de recrutamento de caspase (CARD) ou de pirina, responsável pelo recrutamento de proteínas acessórias⁴.

Os primeiros NLRs associados a reconhecimento bacteriano foram as proteínas NOD-1 (NLRC1) e NOD-2 (NLRC2)⁵. NOD-1 e NOD-2 reconhecem peptídeos derivados da degradação de peptidoglicanos (PG), a qual ocorre durante o crescimento e a destruição de bactérias. Os PGs são o principal componente da parede celular de bactérias Gram-positivas, já nas Gram-negativas eles estão presentes como fina camada no espaço periplasmático^{6,7}. Especificamente, NOD-2 é capaz de detectar e se ligar de maneira direta ao muramyl dipeptídeo (MDP) dos PGs presentes tanto na parede celular de bactérias Gram-positivas quanto negativas. Diferentemente, a ligação do NOD-1 aos PGs é dependente do ácido gama-D-glutamyl meso-diaminopilémico (iE-DAP), o qual está presente na parede celular da maioria das bactérias Gram-negativas e em apenas algumas bactérias Gram-positivas. O reconhecimento de PGs por NOD-1 e NOD-2 culmina na ativação da via de

sinalização intracelular que ativa o fator de transcrição NF- κ B, o que resulta na produção de diversas citocinas inflamatórias⁸⁻¹⁰.

Alguns membros da família NLR, conhecidos como subfamília NLRP, são capazes de responder a PAMPs e DAMPs citoplasmáticos através da formação de complexos de sinalização intracelular multiproteicos denominados inflamassomos¹. Os inflamassomos atuam na ativação de enzimas da família cisteína-aspartato proteases (caspases) durante a regulação da imunidade em condições fisiológicas, patogênicas e na presença de sinais de perigo^{11,12}. A estrutura típica de um inflamassomo é formada por um NLRP, uma proteína adaptadora denominada ASC (proteína associada a apoptose contendo domínio CARD) e a pró-caspase¹³. Uma vez montada, essa plataforma proteica transitória permite a ocorrência de uma sequência de eventos enzimáticos que resulta na ativação da caspase-1 e, conseqüentemente, na produção de IL-1 β ^{14,15} e IL-18 ativos¹⁶. Dentre os NLRPs capazes de formar inflamassomos, o NLRP3 (NALP3 ou criopirina) tem sido o mais estudado e caracterizado (Figura 1).

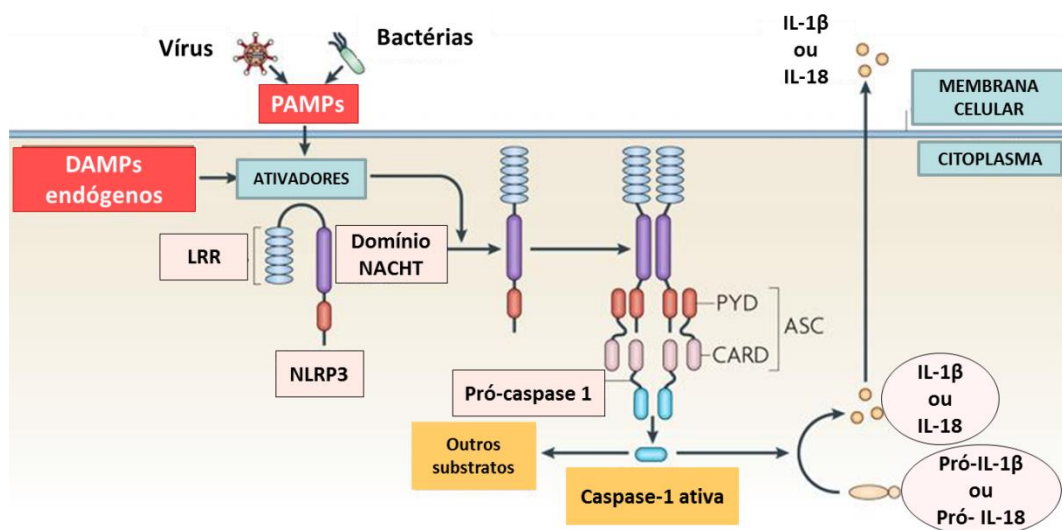


Figura 1. Formação do inflamassomo NLRP3: Na ausência de patógenos, o inflamassomo NLRP3 é auto-reprimido devido à interação entre os domínios NACHT e LRR. Essa auto-repressão é removida na presença de PAMPs ou DAMPs, o que resulta na exposição do domínio NACHT. Após a exposição, o NLRP3 se oligomeriza e recruta a proteína adaptadora ASC (também conhecida como PYCARD) e a pró-caspase 1. Após o recrutamento, ocorre a ativação da caspase-1 e, conseqüentemente, a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-18. (Adaptado de Tschoep J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? Nat Rev Immunol 2010 Mar; 10(3): 210-5).

O inflamassomo NLRP3 responde a diversos PAMPs, dentre eles moléculas bacterianas como flagelina, dipeptídeo muramil, LPS e toxinas formadoras de poros¹. Além disso, esse complexo responde a uma diversidade de sinais endógenos (DAMPs e espécies reativas do oxigênio) e ambientais, como irradiação ultravioleta, sílica, asbestos e nanopartículas^{11,17,18}. A resposta imune desencadeada pela ativação dos inflamassomos tem sido associada a um amplo espectro de processos fisiológicos e patológicos, dentre eles a defesa contra patógenos invasores, manutenção da homeostasia intestinal e desenvolvimento de desordens de origem inflamatória¹⁷.

A segunda classe que mais se destaca dentre os PRRs citosólicos são os RLRs. Esses PRRs reconhecem ácidos nucleicos virais, incluindo RNA de fita simples e de fita dupla, e induzem a produção de interferons antivirais do tipo I¹. Os membros mais bem estudados dessa família são o RIG-I (gene indutível por ácido retinóico I) e o MDA5 (gene de melanoma associado à diferenciação 5). Ambos os receptores possuem um domínio RNA-helicase (que se liga ao RNA viral) e um domínio CARD na região N-terminal². A ligação dos RLRs ao RNA viral desencadeia uma cascata de eventos de sinalização intracelular que resulta na ativação de fatores de transcrição IRF3 (fator regulador de interferon 3) e IRF7 (fator regulador de interferon 7), os quais induzem a produção de interferons do tipo I. Adicionalmente, a sinalização por RLRs pode também estar envolvida na ativação da via intracelular do fator de transcrição NF- κ B, resultando na produção de citocinas inflamatórias^{1,2} (Figura 2).

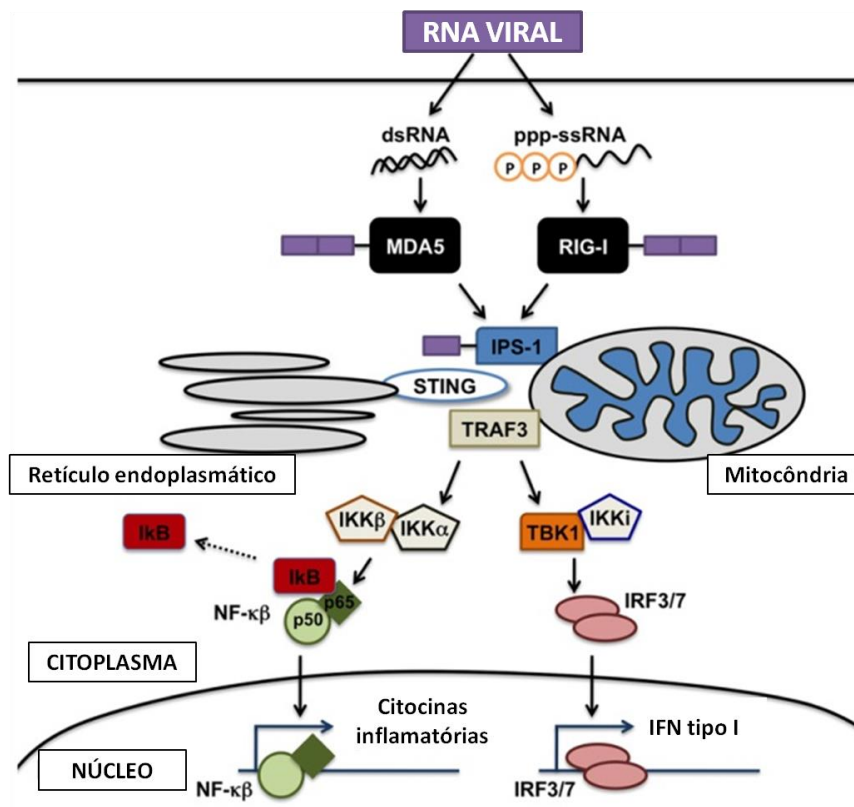


Figura 2. Atuação dos receptores RIG-I e MDA5: O RLRs atuam como sensores citosólicos para RNA viral, podendo desencadear respostas celulares anti-virais e inflamatórias. O RIG-I reconhece RNA de fita simples, enquanto o MDA5 reconhece RNA de fita dupla. Enzimas helicases interagem com os RLRs, desencadeando o recrutamento de moléculas efetoras como IPS-1 (peroxisomal-associated interferon promoter stimulator), TRAF-3 (TNF receptor associated factor 3) e/ou STING (stimulator of interferon genes). O recrutamento dessas moléculas leva à ativação de quinases (IKKα, IKKβ, TBK1 e IKKi), as quais ativam os fatores de transcrição NF-κB e IRF-3/7. (Adaptado de Furr SR, Marriott I. Viral CNS infections: role of glial pattern recognition receptors in neuroinflammation. *Front Microbiol* 2012; 3: 201).

Em relação aos PRRs acoplados à membrana celular, a classe mais bem caracterizada é a família de receptores *Toll-like* (TLR), os quais merecem destaque devido a seu papel crucial contra a invasão microbiana, tendo em vista sua capacidade de reconhecer amplo espectro de padrões moleculares^{19,20}.

A descoberta dos TLRs, em meados da década de 1990, alterou o conceito de que a imunidade inata era responsável apenas pelo reconhecimento inespecífico de microrganismos^{2,21}. O primeiro membro da família TLR a ser descoberto foi a proteína *Toll*, inicialmente identificada como produto gênico essencial para o desenvolvimento embrionário de drosófilas, sendo responsável pelo estabelecimento do eixo dorsoventral do inseto, porém, posteriormente descobriu-se que tal

proteína desempenha papel essencial na resposta anti-fúngica das moscas^{1,22}. Foram descritas na literatura dez isoformas de TLRs em tecidos humanos, as quais são denominadas TLR-1 a TLR-10¹⁹. Os genes responsáveis pela expressão de TLRs estão dispersos pelo genoma humano, sendo que os genes para TLR-1 e TLR-6 são encontrados no cromossomo 4p14, o gene para TLR-2 no cromossomo 4q31.3-q35 e o gene para TLR-4 no cromossomo 9q32-q33²³.

Especificamente, os TLRs são glicoproteínas do tipo I integrais de membrana, que possuem uma estrutura básica constituída por três domínios: um ectodomínio que contém repetições ricas em leucina (LRR) flanqueadas por motivos característicos ricos em cisteína; um domínio intracitoplasmático (endodomínio) denominado domínio receptor Toll/IL-1 (TIR), o qual compartilha uma região conservada de cerca de 200 aminoácidos com o receptor de IL-1 e de IL-18 e um domínio transmembrana muito curto que conecta o ectodomínio ao endodomínio^{1,24}. Enquanto o ectodomínio é responsável pelo reconhecimento dos PAMPs específicos, o domínio intracitoplasmático permite o recrutamento de moléculas adaptadoras necessárias para o desencadeamento da sinalização intracelular²⁰.

Os receptores *Toll-like* são classicamente divididos em dois grupos. O primeiro grupo, composto por receptores expressos na superfície das células, inclui TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 e TLR-11. Esse grupo é responsável pelo reconhecimento da maior parte dos patógenos, visto que são capazes de reconhecer componentes das membranas dos microrganismos, como lipídios, proteínas e lipoproteínas¹⁹. O segundo grupo, que inclui receptores expressos exclusivamente em vesículas intracelulares como endossomos e lisossomos, é composto por TLR-3, TLR-7 e TLR-9, os quais reconhecem apenas ácidos nucleicos de origem microbiana^{19,24}.

O reconhecimento dos PAMPs pelos TLRs ativa diversas vias de sinalização intracelulares, as quais culminam na ativação de fatores de transcrição responsáveis pela expressão de genes envolvidos nas respostas inflamatórias e anti-virais^{1,20,23}. Todas essas vias são iniciadas pela interação do TLR com seu ligante específico na superfície da célula ou nos compartimentos celulares, o que leva a dimerização dos TLRs. Essa dimerização resulta da aproximação dos domínios TIR de um TLR

com o domínio TIR do outro. Em seguida são recrutadas moléculas adaptadoras que participam do recrutamento de outras proteínas e da ativação de diversas quinases¹. Dentre os fatores de transcrição ativados pelas vias de sinalização dos TLRs destacam-se o NF- κ B, a proteína ativadora 1 (AP-1), o IRF3 e o IRF7¹. A ativação de NF- κ B e AP-1 resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão endotelial, enquanto que a ativação de IRF3 e IRF7 resulta na produção de interferons do tipo I (IFN- α e IFN- β), os quais atuam nas respostas anti-virais^{1,2}.

A via de sinalização do NF- κ B é uma das mais bem caracterizadas vias de sinalização dos TLRs (Figura 3). Nessa via, após o reconhecimento do PAMP pelo TLR na superfície celular, a primeira molécula recrutada é a proteína MyD88, a qual possui um domínio TIR que se liga ao domínio TIR do TLR. Uma segunda proteína a ser recrutada dentro do complexo de sinalização é a quinase associada ao receptor de IL-1 (IRAK). A IRAK contém um domínio de morte que medeia as interações com o domínio de morte da MyD88. Quando ocorre o recrutamento da IRAK, ela sofre autofosforilação, dissociando-se da MyD88 e ativando o fator 6 associado ao TNF-R (TRAF-6). O TRAF-6 ativa a cascata de quinase I κ B, levando à ativação do NF- κ B. Os genes que são expressos em resposta à ativação do NF- κ B codificam proteínas importantes para a resposta imune inata, como citocinas e moléculas de adesão endotelial¹. Em alguns tipos celulares os TLRs acoplam-se a outras vias de sinalização intracelular, levando à ativação do fator de transcrição AP-1, porém, os mecanismos envolvidos nessas vias ainda são pouco conhecidos²⁵. A ativação do fator de transcrição AP-1, diferentemente da via do NF- κ B, está envolvida com a transdução de sinais intracelulares através de proteínas quinases associadas à mitógeno (MAPKs). Modelo proposto por Chi et al.²⁵ sugere que as MAPKs desempenham papel tanto na regulação de citocinas pró quanto antiinflamatórias. Na fase inicial da ativação de macrófagos há rápida síntese de citocinas pró-inflamatórias, parcialmente mediadas pelas MAPKs. Em um segundo momento, a atividade das MAPKs é reduzida pela ação de fosfatases, o que leva ao aumento gradual da produção de citocinas antiinflamatórias, como a IL-10²⁵.

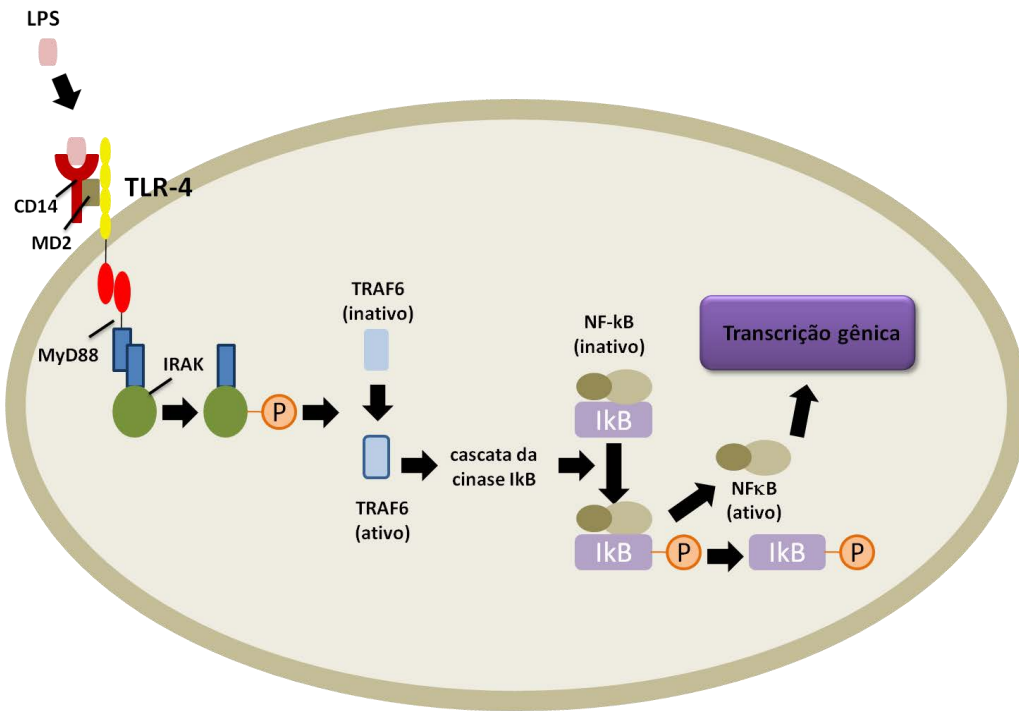


Figura 3. Visão geral da via de sinalização dos TLRs: A via de sinalização intracelular pode ser desencadeada por vários PAMPs. A ligação do PAMP ao TLR na superfície da célula desencadeia uma via de sinalização intracelular, através da interação de diversas moléculas adaptadoras, culminando na ativação de NF-κB, o que resulta na transcrição de diversos genes associados à resposta inflamatória. (Adaptado de Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005).

Adicionalmente, os TLRs participam da opsonização de microrganismos e da otimização da defesa do hospedeiro contra patógenos invasores através da regulação da liberação de radicais peróxido e óxido nítrico^{26,27}. Estudos recentes demonstram também que os TLRs são capazes de induzir apoptose através da produção de diversos fatores pró-apoptóticos, como caspase 8 e proteína kinase R²⁸.

Após a ativação dos TLRs e o estabelecimento da resposta inflamatória, é necessário que a sinalização seja negativamente regulada para que a homeostasia seja retomada, uma vez que a ativação prolongada pode gerar efeitos deletérios ao hospedeiro²⁰. A regulação negativa da sinalização de TLRs é obtida por diversos mecanismos, sendo que os principais podem ser categorizados em mecanismos de dissociação dos complexos adaptadores e mecanismos de degradação de proteínas sinalizadoras²⁹.

Em relação aos mecanismos de dissociação dos complexos adaptadores, proteínas adaptadoras da via de sinalização de TLRs possuem formas variantes que atuam como antagonistas

para evitar a associação entre as formas intactas de adaptadores, impedindo que a cascata de sinalização tenha continuidade^{20,29}. A proteína TAG (TRAM adaptor with GOLD domain) é uma forma variante de TRAM (molécula adaptadora associada ao TRIF) que compete com a forma original para ligação com a molécula adaptadora TRIF (proteína adaptadora contendo o domínio TIR), inibindo a via de sinalização dependente de TRIF³⁰. Outro exemplo de dissociação é a proteína IRF4 que compete com a proteína IRF5, a qual interage diretamente com MyD88 durante a sinalização intracelular^{31,32}. Algumas modificações pós-transcricionais nas proteínas adaptadoras, como fosforilação e ubiquitinação, podem atuar como mecanismos reguladores da interação entre moléculas adaptadoras. A molécula denominada TANK, identificada como uma proteína ligadora de TRAF parece estar envolvida na inibição da ubiquitinação do fator TRAF-6²⁹. Outro fator recentemente descrito como regulador da sinalização de TLRs é o receptor SHP (small heterodimer partner), o qual também atua inibindo a ubiquitinação do fator TRAF-6³³. A proteína SHP-1 é uma enzima com atividade de fosfatase que inibe a atividade das proteínas adaptadoras IRAK1 e IRAK2, culminando na redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e no amento da produção de IFNs do tipo I.

Algumas proteínas associadas à membrana, como ST2I (single immunoglobulin IL-1R-related molecule) e RP105 (radioprotective 105) regulam negativamente a sinalização por TLRs na medida em que dificultam o recrutamento das moléculas adaptadoras necessárias²⁰. ST2I previne a superativação de TLR-2, TLR-4 e TLR-9 através da inibição da formação do complexo receptor-adaptador^{34,35}, enquanto que a RP105 liga-se ao ectodomínio do TLR-4, evitando a ligação do ligante específico³⁶.

A dissociação dos complexos adaptadores também ocorre através de fatores solúveis. Estudos demonstram que a forma solúvel de TLR-2, geralmente encontrada no sangue periférico, interage com a proteína CD14, a qual atua como co-receptor de TLR-2 e TLR-4, inibindo a sinalização³⁷. Outro fator solúvel que atua inibindo a via de sinalização dos TLRs é o T1/ST2, o qual sequestra moléculas adaptadoras, impedindo que a sinalização tenha continuidade³⁴. Estudos

demonstram também que a proteína ST2 solúvel é capaz de inibir a superexpressão de TLR-1 e TLR-4, levando a redução da produção de mediadores inflamatórios²⁰.

Em relação aos mecanismos de degradação de proteínas sinalizadoras, um bom exemplo é regulação de IRF3 e IRF7 por ubiquitinação. A degradação de IRF3 após ubiquitinação pela isomerase Pin1 resulta na supressão da resposta anti-viral por IFNs do tipo I³⁸. Outro exemplo é a proteína PDLIM2 (PDZ and LIM domain protein 2), que inibe a sinalização de TLRs através da degradação do componente p65 da via NF- κ B³⁹. A integrina CD11b ativa uma kinase denominada Syk, a qual fosforila as proteínas MyD88 and TRIF, resultando na ligação da ubiquitina E3 ligase, a qual promove a degradação dessas proteínas através do sistema ubiquitina-proteassoma⁴⁰.

Os diferentes membros da família TLR reconhecem diferentes PAMPs e DAMPs. O TLR-4, primeiro TLR descrito na literatura⁴¹, atua no reconhecimento de LPS de bactérias Gram-negativas, que atua como importante ativador de macrófagos e desencadeador de choque séptico⁴². A ligação do TLR-4 ao LPS depende dos co-receptores CD14 e MD2. O LPS liga-se à proteína ligante de LPS (LBP) presente na corrente sanguínea, em seguida a LBP transfere o LPS para o co-receptor CD14, o qual permite, então, a formação do complexo TLR4-MD2-LPS⁴³. O complexo formado leva à ativação do NF- κ B e, conseqüentemente, à produção de citocinas como IL-1 e IL-6. Outros possíveis PAMPs para o TLR-4 são mananas presentes em *Candida albicans* e glucuronoxilomanana de *Cryptococcus neoformans*^{44,45}.

Em relação ao reconhecimento microbiano, o TLR-2 está envolvido no reconhecimento de amplo espectro de PAMPs derivados de bactérias, fungos, parasitas e vírus²³. Dentre esses PAMPs estão lipoproteínas de diversas bactérias, peptideoglicanos e ácido lipoteicóico de bactérias Gram-positivas, lipoarabinomanana de micobactérias, zimozan de fungos e hemaglutinina de vírus do sarampo²³. A grande capacidade de reconhecimento do TLR-2 deve-se, em parte, a sua capacidade de formar heterodímeros com TLR-1 e TLR-6. O heterodímero TLR-1/TLR-2 participa do reconhecimento de lipopeptídeos triacetilados, enquanto o heterodímero TLR-2/TLR-6 atua no reconhecimento de zimozan e lipopeptídeos diacetilados^{23,46}.

Embora um dos maiores estímulos da inflamação seja a infecção, a inflamação pode ser desencadeada por estímulos não infecciosos⁴⁷ e assim como a inflamação induzida por agentes microbianos, a inflamação estéril é caracterizada pela infiltração de neutrófilos e macrófagos e pela produção de citocinas⁴⁸. Assim como os PAMPs são importantes para a defesa imune inata contra agentes infecciosos, os DAMPs são os componentes reconhecidos pelos receptores da imunidade inata durante a inflamação estéril. DAMPs são normalmente fatores endógenos que, em condições normais, se mantêm protegidos do reconhecimento de receptores presentes nas células imunes. Na situação em que ocorre injúria tecidual, essas moléculas são liberadas pelas células mortas e passam a ser reconhecidas por tais receptores⁴⁸.

A participação dos DAMPs na ativação da imunidade inata por TLRs começou a ser investigada em meados do ano 2000, quando Ohashi et al.⁴⁹ demonstraram que a proteína de choque térmico (HSP) 60, que é uma chaperona produzida em resposta ao estresse celular, induzia a produção de citocinas através de TLR-4. No mesmo ano, pesquisadores demonstraram que células necróticas induziam a expressão de genes relacionados à citocinas pró-inflamatórias e ao reparo tecidual através de TLR-2^{50,51}. Após essas descobertas iniciais, a lista de DAMPs reconhecidos por TLRs específicos aumentou rapidamente e atualmente fazem parte dessa lista diversas proteínas e peptídeos^{49,52-70}, lipoproteínas e ácidos graxos⁷¹⁻⁷⁷, proteoglicanos e glicosaminoglicanos⁷⁸⁻⁸¹ e ácidos nucleicos^{82,83,84}, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Ativadores endógenos (DAMPs) de receptores *Toll-like*

CATEGORIA	DAMP	RECEPTOR
Proteínas e peptídeos	β-defensina 3	TLR-1, TLR-2
	HSP60, HSP70	TLR-2, TLR-4
	HMGB-1	TLR-2, TLR-4
	Proteína surfactante A e D	TLR-2, TLR-4
	Neurotoxina derivada de eosinófilo	TLR-2
	Fibronectina EDA	TLR-4
	Fibrinogênio	TLR-4
	S100A8 (MRP8)	TLR-4
	Elastase neutrofílica	TLR-4
	Lactoferrina	TLR-4
	Anticorpos antifosfolipídicos	TLR-2, TLR-4, TLR-7, TLR-8
Ácidos graxos e lipoproteínas	Amilóide sérica A	TLR-2, TLR-4
	Lipoproteína LDL oxidada	TLR-4
	Ácidos graxos saturados	TLR-4
Proteoglicanos e glicosaminoglicanos	Versicano	TLR-2
	Biglicano	TLR-2, TLR-4
	Fragmentos de ácido hialurônico	TLR-2, TLR-4
Ácidos nucleicos	RNA _m	TLR-3
	RNA fita simples	TLR-7, TLR-8
	Complexos IgG-cromatina	TLR-9

Existe um crescente corpo de evidências de que PAMPs e DAMPs agem de maneiras diferentes para estimular a resposta imune inata. Segundo Lee & Seong⁸⁵ células apresentadoras de antígenos que não são responsivas ao LPS podem ser ativadas por células necróticas indicando que a ativação do TLR-4, independente de LPS, ocorre em resposta a ligantes endógenos. De forma similar, TLR-3 reconhece células que sofrem necrose durante eventos inflamatórios agudos, independentes da presença de PAMPs viral⁸⁶. Existem evidências que DAMPs e PAMPs podem ocupar o mesmo sítio de ligação ou sítios próximos nos TLRs. Entretanto, alguns DAMPs podem utilizar diferentes sítios, enquanto as mutações D299G e T3991 do TLR-4 impede sua ativação por LPS, esses polimorfismos conferem notável habilidade ao TLR4 para responder ao fibrinogênio⁸⁷.

Gestação, imunidade materna e estresse oxidativo

Durante a gestação, a regulação precisa do sistema imune materno permite a sobrevivência e o desenvolvimento adequado do feto, o qual é considerado um aloenxerto em relação ao organismo da gestante devido à expressão de antígenos de origem paterna⁸⁸. A sobrevivência do aloenxerto fetal desencadeou a elaboração da teoria de que o sistema reprodutor feminino tem privilégio imunológico durante a gestação, ou seja, nesse período específico o sistema imune materno mantém um estado de tolerância por período de tempo programado⁸⁹. Dentre as diversas alterações do sistema imunológico materno que visam garantir o privilégio imunológico no útero durante a gestação destaca-se a regulação precisa dos perfis de citocinas e outros mediadores inflamatórios na interface materno-fetal.

Diversos estudos na literatura apoiam a ideia de que o sistema imune inato e, em particular a resposta inflamatória, desempenham papel importante em diversas etapas da gestação, incluindo a implantação e a placentação, além de serem essenciais para a manutenção da gestação e o desencadeamento do trabalho de parto⁹⁰.

Durantes muitos anos a comunidade científica aceitou o paradigma de que o sucesso da gestação era um “fenômeno Th2”, com predomínio de citocinas com atividade anti-inflamatória e que a resposta imune de perfil Th1, com predomínio de citocinas com atividade pró-inflamatória, era associada a resultados gestacionais adversos^{91,92}. Atualmente, estudos demonstram que na verdade o sucesso da gestação depende de um complexo e dinâmico balanço entre citocinas com atividade anti e pró-inflamatórias, o qual se modifica ao longo da gestação normal^{93,94}. O primeiro trimestre da gestação é marcado por predomínio de resposta imune de perfil Th1, visto que nesse primeiro estágio o microambiente inflamatório torna-se necessário tanto para permitir o correto reparo do epitélio uterino, o qual sofre danos consequentes da implantação do feto, quanto para remoção de debris celulares⁹⁵. No segundo trimestre o predomínio passa a ser de resposta imune de perfil Th2^{91,96,97}, com aumento de citocinas com atividade anti-inflamatórias importantes para a

manutenção da gestação. No terceiro trimestre e no momento do parto, o predomínio volta a ser de perfil Th1, tanto sistemicamente⁹⁸, quanto no tecido placentário e no líquido amniótico⁹⁹⁻¹⁰¹.

Nesse sentido, o avanço da idade gestacional e mais precisamente o final do terceiro trimestre de gestação é caracterizado por um aumento da resposta inflamatória, com influxo maciço de células imunes na interface materno-fetal e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias^{102,103}. Esse cenário pró-inflamatório é essencial para o desencadeamento dos processos fisiológicos de remodelamento da cérvix, enfraquecimento e rotura das membranas fetais e início das contrações uterinas, que culminam no trabalho de parto^{104,107}.

Estudos recentes demonstram também que a gestação normal é caracterizada pelo aumento do estresse oxidativo, devido ao aumento do consumo e do metabolismo do oxigênio ou em resposta ao estresse oxidativo placentário^{108,109}. O estresse oxidativo é decorrente da produção exacerbada de espécies reativas do oxigênio (EROs) e/ou devido a deficiência no mecanismo antioxidante, o que pode acarretar em peroxidação lipídica e proteica e dano ao DNA^{110,111}. No contexto gestacional o aumento do estresse oxidativo tem sido descrito no terceiro trimestre da gestação normal e no trabalho de parto¹⁰⁹.

Prematuridade, resposta inflamatória e estresse oxidativo

A prematuridade é a principal causa de mortalidade neonatal e é responsável por sérias morbidades na infância, tanto a curto quanto a longo prazo, sendo que os riscos de complicações decorrentes são inversamente proporcionais à idade gestacional na qual o parto ocorre¹¹²⁻¹¹⁶. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a incidência mundial de parto pré-termo em gestações únicas é de 9,6%¹¹⁷.

O parto pré-termo é definido como o nascimento ocorrido anteriormente a 37ª semana de gestação completa, podendo ser medicamente induzido ou espontâneo. A prematuridade induzida pode ser consequente de indicação fetal ou materna, podendo ser iniciada através de medicação indutora de trabalho de parto ou por cesárea. O parto pré-termo espontâneo pode ser subdividido em duas categorias: precedido por trabalho de parto pré-termo com bolsa íntegra (TPP) ou precedido por rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT)^{115,118}. Dentre os partos pré-termo espontâneos, a incidência de TPP é de cerca de 60% e a de RPM-PT é de 30-40%^{115,118-124}.

A etiologia da prematuridade é multifatorial e inclui fatores de riscos maternos, paternos e genéticos¹²⁵⁻¹²⁸, como sumarizado na Tabela 2. Apesar dessa multifatorialidade, estudos demonstram que a infecção intra-amniótica acomete de 25% a 40% das gestações pré-termo, entretanto, essa porcentagem provavelmente é subestimada, visto que a infecção intra-amniótica nem sempre é diagnosticada pelos métodos de cultura comumente empregados^{115,129}.

Tabela 2. Fatores de risco para prematuridade

Maternos		
	Características sociodemográficas	Etnia afro-americana Idades maternas extremas Baixo índice sócio-ecomônico Hábito tabagista Uso de drogas e álcool
	Histórico médico e gestacional	Prematuridade anterior Diabetes Hipertensão Biópsia cônica da cérvix
	Características gestacionais	Gestação múltipla Placenta prévia Placenta abrupta Pré-eclâmpsia Oligodrâmnio e polidrâmnio Anomalias uterinas e cervicais Concepção assistida Infecções <i>Vaginose bacteriana</i> <i>Infecção peridontal</i> <i>Infecção clamidiana</i> <i>Infecção intra-uterina</i>
Paterno	Idade paterna elevada	
Genéticos	Polimorfismos	IL-1R, IL-1 β , IL-6, IL-10, MMP-1, MMP-9, TLR-4, TNF- α , HPS47

A principal rota da infecção da cavidade amniótica é a ascensão de bactérias presentes no trato genital inferior através do canal endocervical, as quais atravessam uma pequena região das membranas e invadem a cavidade amniótica, proliferando-se no líquido amniótico. Quando presentes na cavidade amniótica, esses microrganismos podem invadir o âmnio, o tecido conjuntivo e em casos mais severos, o cório e a decídua¹³⁰. Outras possíveis rotas de infecção incluem a via hematogênica ou transplacentária, infecção retrógrada da pelve e infecção transuterina causada por procedimentos como a amniocentese¹³¹.

Quando a resposta inflamatória é instalada em função da infecção bacteriana tem-se o diagnóstico de corioamnionite, que pode se apresentar nas condições clínica e histológica. A corioamnionite clínica, frequentemente denominada de infecção intra-amniótica ou amnionite, acomete de 1% a 2% dos partos de termo e 5% a 10% dos partos pré-termo, havendo aumento dessa incidência quando há RPM por tempo prolongado¹³². Seu diagnóstico é geralmente definido como presença de temperatura $\geq 37,8^{\circ}\text{C}$ e pelo menos dois dos seguintes achados: taquicardia materna (acima de 120 bpm), leucocitose materna (acima de 18.000 células/mm³), presença de sensibilidade uterina, líquido amniótico purulento ou de odor fétido ou taquicardia fetal (acima de 160 bpm)¹³³. A corioamnionite histológica é definida pela presença de leucócitos polimorfonucleares nas estratificações das membranas corioamnióticas, podendo também ser avaliada a densidade e a degeneração tecidual para se estimar a intensidade e a progressão da resposta inflamatória materna¹³⁴⁻¹³⁶.

Os principais microrganismos presentes na cavidade amniótica de gestantes com infecção intra-amniótica são *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* e espécies de *Fusobacterium*; ocasionalmente também são encontrados bacilos Gram-negativos, como os do gênero *Bacteroides* e *Prevotella*, ambos encontrados na vaginose bacteriana; além de coliformes como *Escherichia coli* e *Streptococcus* do grupo B¹³⁷⁻¹³⁹.

O principal mecanismo pelo qual a infecção intra-amniótica é causa direta de prematuridade é a indução de síntese de prostaglandinas, responsável pelo início das contrações uterinas¹⁰³. As bactérias presentes no líquido amniótico produzem fosfolipases, as quais ativam a liberação de ácido aracdônico, que com a metabolização, via ciclooxigenase, culmina na amplificação da produção de prostaglandinas. Além disso, a ativação de TLRs e NLRs por PAMPs presentes nessas bactérias desencadeia a produção e a liberação de citocinas inflamatórias, as quais provocam liberação adicional de prostaglandinas pelas células amnióticas, deciduais e pelos macrófagos¹⁴⁰⁻¹⁴³.

Existe similaridade na etiologia associada a RPM-PT e ao TPP, mas segundo Menon et al.¹⁴⁴, um dos principais diferenciadores entre as duas manifestações clínicas da prematuridade é a

presença de certos fatores moleculares associados à infecção, como as metaloproteinases e fatores pró-apoptóticos, que em gestantes com RPM-PT seriam responsáveis por modificações estruturais e pelo enfraquecimento das membranas fetais. Esses mesmos fatores moleculares são ausentes ou minimamente expressos em casos de TPP com bolsa íntegra. Além disso, outros diferenciadores entre a RPM-PT e o TPP com bolsa íntegra seriam a maneira distinta com a qual as membranas fetais respondem aos diferentes tipos de microrganismos presentes na cavidade amniótica¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ e a intensidade da resposta inflamatória considerando cada manifestação¹⁴⁸.

Mais recentemente, estudos têm demonstrado a participação do estresse oxidativo na fisiopatologia do RPM-PT^{149,150}, sugerindo haver similaridade entre a RPM-PT e a gestação de termo quanto à degradação, sinais apoptóticos, danos oxidativos e envelhecimento das membranas fetais^{151,152,153}. Esses resultados não são surpreendentes já que a gestação normal é caracterizada pelo aumento do estresse oxidativo^{108,109}. Na gestação, além do aumento de estresse oxidativo observado no terceiro trimestre da gestação normal e no trabalho de parto¹⁰⁹, níveis aumentados de marcadores de estresse oxidativo no segundo trimestre têm sido associados com complicações gestacionais como pré-eclâmpsia e baixo peso ao nascimento¹⁵⁴. Assim, a semelhança entre gestações de termo e gestações com RPM-PT quanto à degradação, sinais apoptóticos, danos oxidativos e envelhecimento das membranas fetais sugere que a senescência precoce é característica da RPM-PT.

TLRs na interface-materno fetal e complicações gestacionais

Diversos estudos na literatura relatam o papel da resposta imune inata e dos TLRs durante a gestação normal e na presença de complicações gestacionais¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. A expressão desses receptores vem sendo investigada principalmente na placenta e nas membranas corioamnióticas e os resultados de tais estudos são conflitantes. Rindsjö et al.¹⁵⁷, empregando a técnica de imunoistoquímica, demonstraram significativa redução da expressão de TLR-2 em placentas na presença de corioamnionite histológica, justificando que a expressão de TLR-2 pelo trofoblasto deve ser afetada pelo processo inflamatório nas membranas corioamnióticas. Esses resultados diferem dos achados de Kim et al.¹⁵⁸ que demonstraram aumento na expressão de TLR-2 em membranas que apresentavam corioamnionite histológica. Para Kumazaki et al.¹⁵⁹ as células de Hofbauer das placentas pré-termo complicadas por corioamnionite demonstraram aumento da imunorreatividade ao TLR-4, quando comparadas com aquelas sem infiltrado inflamatório, ou com placentas de termo. Em estudo recente, Moço et al.¹⁶⁰ demonstraram, pela primeira vez na literatura, aumento de RNAm de TLR-1 e TLR-2 em membranas corioamnióticas de gestações pré-termo complicadas por corioamnionite histológica, quando comparadas com membranas corioamnióticas de gestações pré-termo na ausência de infiltrado inflamatório. Adicionalmente, Kacerovsky et al.^{161,162} demonstraram que gestantes com RPM-PT e invasão microbiana da cavidade amniótica apresentam aumento significativo das formas solúveis de TLR-1 (sTLR-1), TLR-2 (sTLR-2), TLR-4 (sTLR-4) e TLR-6 (sTLR-6) no líquido amniótico.

A expressão de TLR-2 e TLR-4 pelo epitélio amniótico sugere que esse epitélio não funciona apenas como barreira mecânica aos microrganismos, mas que também é requerido na ativação do sistema imune inato¹⁵⁸. Segundo Kim et al.¹⁵⁸ o aumento na expressão de ambos os receptores, em membranas corioamnióticas de termo, corrobora a associação do parto espontâneo, ainda que modestamente, à resposta inflamatória dos tecidos gestacionais, com produção de citocinas pró-inflamatórias, conforme descrito por Keelan et al.¹⁶³. Segundo Muzio et al.¹⁶⁴ citocinas inflamatórias têm mostrado regulação positiva na expressão de TLR-2 e TLR-4 e a possível explicação para esses

achados é que a expressão aumentada dos TLRs nos tecidos gestacionais no momento do trabalho de parto pode servir para aumento da proteção materna e fetal à invasão microbiana da cavidade amniótica.

Holmlund et al.¹⁵⁵, utilizando as técnicas de imunistoquímica e reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, não observaram diferença na expressão de TLR-2 e de TLR-4 entre trofoblastos estimulados, respectivamente, com zimozan e LPS, e trofoblastos não estimulados. De acordo com esses pesquisadores, a possível explicação para tal resultado é que ambos os receptores estejam normalmente super expressos nos tecidos uterinos como mecanismo de defesa, o qual pode rapidamente ser mobilizado e proteger o feto contra infecções durante a gestação e o parto.

Em estudo experimental, realizados com camundongos, Gonzalez et al.¹⁶⁵ avaliaram a expressão de TLRs pela técnica PCR em tempo real e demonstraram que a expressão desses receptores é substancialmente diferente no tecido uterino de fêmeas prenhes e não prenhes e que a expressão dos receptores TLR-2, -3, -4 e -9 aumenta ao longo da prenhez. Esses dados estão de acordo com Beijar et al.¹⁶⁶ que relataram que as vilosidades placentárias de primeiro trimestre demonstraram menor expressão de TLR-4 quando comparado com as vilosidades de termo.

Há de se considerar que possíveis discordâncias entre esses estudos podem refletir diferenças da resposta à infecção nas diferentes partes da placenta e seus anexos.

Células do sangue periférico materno e análise de TLRs na gestação

A investigação da expressão de TLRs em tecidos gestacionais é de grande importância para o entendimento da participação da imunidade inata em gestações normais e com desfechos gestacionais adversos, porém tais tecidos permitem análise somente após a resolução da gestação, quando a cinética da expressão desses receptores pode sofrer modificações. Nesse contexto, uma possível fonte de estudo para análise de TLRs durante a gestação em curso são as células do sangue periférico materno, uma vez são facilmente obtidas por punção venosa, além de possuírem papel fundamental na reposta imune inata e expressarem diversos tipos de TLRs¹⁶⁷⁻¹⁷².

Os neutrófilos, também chamados de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) ou granulócitos neutrofílicos, são os leucócitos mais abundante na circulação e medeiam as fases iniciais da resposta inflamatória^{1,173}. Morfologicamente, essas células circulantes geralmente são esféricas, com diâmetro de 12-15µm e possuem o núcleo segmentado em três a cinco lóbulos conectados¹. No citoplasma dos neutrófilos encontram-se diversos grânulos específicos, os quais contêm enzimas líticas como lisozima, collagenase e elastase¹. A migração dos neutrófilos para os locais de infecção pode ser bastante rápida, ocorrendo poucas horas depois da invasão dos patógenos. Após o recrutamento, essas células atuam por algumas horas e morrem. Quando os neutrófilos circulantes não são recrutados nesse período, eles sofrem processo apoptótico e são fagocitados por macrófagos do fígado ou do baço¹.

Classicamente, os neutrófilos são descritos como células que possuem capacidade fagocítica, além de liberarem enzimas líticas através de seus grânulos e de serem capazes de produzir EROs com potencial antimicrobiano^{168,173}. Porém, uma abordagem mais recente de suas funções e habilidades demonstra que essas células codificam a expressão de mediadores inflamatórios, como componentes do sistema complemento, PRRs, citocinas inflamatórias e quimiocinas^{168,173}. Além disso, mais recentemente demonstrou-se que os neutrófilos são capazes de expelir seu conteúdo nuclear através das chamadas NETs (neutrophil extracellular traps), as quais atuam como

“armadilhas” para os patógenos invasores, permitindo a interação dos microrganismos com proteínas derivadas dos grânulos neutrofílicos^{168,173}.

As células mononucleares do sangue periférico são células que participam tanto da imunidade inata quanto da imunidade adaptativa e cuja principal função é a fagocitose. O monócito é a célula mononuclear circulante, que sai da medula onde é produzido em direção ao sangue periférico. Morfologicamente, os monócitos são células circulares com 10-15 µm de diâmetro, possuindo núcleo único com forma clássica de feijão e um citoplasma finamente granular contendo lisossomos e vacúolos fagocíticos¹. Quando os monócitos circulantes atingem os tecidos eles são capazes de se diferenciar em macrófagos tissulares. Os macrófagos são células fagocíticas que recebem nomes distintos dependendo do tecido nos quais se originam¹. Monócitos e macrófagos participam da iniciação e da resolução da inflamação através da fagocitose de microrganismos, liberação de citocinas inflamatórias e de EROs, além de atuarem na ativação da imunidade adaptativa¹⁷⁴.

Diferentemente do que ocorre na interface materno-fetal, poucos estudos na literatura avaliam a expressão de TLRs em células do sangue periférico materno durante complicações gestacionais como a prematuridade. Recentemente Nitsche et al.¹⁷⁵, pela primeira vez investigaram, empregando a técnica de PCR em tempo real, se a expressão de TLR-2 e TLR-4 nos neutrófilos maternos é alterada com a progressão da gestação e no momento do parto. Segundo esses autores, embora a expressão desses receptores esteja aumentada nos tecidos gestacionais, a expressão nos neutrófilos maternos tem mínima alteração ao longo da gestação normal e durante o parto. Entretanto, este estudo foi realizado com pequeno número de amostras, podendo apresentar limitações na acurácia dos dados apresentados. Pawelczyk et al.¹⁷⁶ demonstraram que a expressão gênica de TLR-4 foi significativamente superior nos leucócitos totais de gestantes em trabalho de parto pré-termo, quando comparado com o grupo controle. Não houve diferença na expressão gênica de TLR-4 em leucócitos totais entre gestantes de termo em trabalho de parto e fora de trabalho de parto. Os mesmos pesquisadores avaliaram a expressão proteica de TLR-4 através de

citometria de fluxo e observaram que não houve diferença na expressão de TLR-4 na população de granulócitos, porém, entre os monócitos a expressão proteica de TLR-4 foi significativamente superior em gestantes em trabalho de parto pré-termo¹⁷⁶. No mesmo sentido, recentemente Kim et al.¹⁷⁷ demonstraram aumento da expressão proteica de TLR-4 na população de monócitos de gestantes em trabalho de parto pré-termo.

Considerando a escassez de dados na literatura em relação à expressão de TLRs em neutrófilos e em monócitos maternos ao longo da gestação normal e os poucos trabalhos com esse mesmo enfoque na presença de complicações gestacionais como pré-eclâmpsia, infecções da cavidade amniótica, TPP e RPM-PT, trabalhos nesse contexto se justificam, pois poderão demonstrar o envolvimento da resposta imune inata no cenário das complicações gestacionais.

Referências Bibliográficas

1. Abbas AK, Lichtman AH. Imunologia celular e molecular. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
2. Murphy K, Travers P, Walport M. Imunologia de Janeway. 7ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2010.
3. Heil M, Land WG. Danger signals - damaged-self recognition across the tree of life. *Front Plant Sci* 2014; 5: 578.
4. Mathews RJ, Sprakes MB, McDermott MF. NOD-like receptors and inflammation. *Arthritis Res Ther* 2008; 10(6): 228.
5. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from Gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 2003; 300: 1584-7.
6. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. NOD2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003; 278: 8869-72.
7. Mo J, Boyle JP, Howard CB, Monie TP, Davis BK, Duncan JA. Pathogen sensing by nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2) is mediated by direct binding to muramyl dipeptide and ATP. *J Biol Chem* 2012; 287: 23057-67.
8. Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, et al. An essential role for nod1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 2003; 4: 702-7.
9. Uehara A, Yang S, Fujimoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Shibata K, et al. Muramyl dipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramyl peptides in combination with chemically synthesized toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a nod2- and nod1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cell Microbiol* 2005; 7: 53-61.
10. Opitz B, Puschel A, Beermann W, Hocke AC, Forster S, Schmeck B, et al. *Listeria monocytogenes* activated p38 mapk and induced il-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. *J Immunol* 2006; 176: 484-90.
11. Paiva-Oliveira EL, Silva AC, Silva RM. Inflamassoma e sua repercussão clínica: revisão da literatura. *R Ci Med Biol* 2012; 11: 96-102.
12. Khan RN, Hay DP. A clear and present danger: inflammasomes DAMPING down disorders of pregnancy. *Hum Reprod Update* 2014 [Epub ahead of print].
13. Srinivasula SM, Poyet JL, Razmara M, Datta P, Zhang Z, Alnemri ES. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem* 2002; 277: 21119-22.
14. Hazuda DJ, Lee JC, Young PR. The kinetics of interleukin 1 secretion from activated monocytes. Differences between interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta. *J Biol Chem* 1988; 263: 8473-9.
15. Black RA, Kronheim SR, Cantrell M, Deeley MC, March CJ, Prickett KS, et al. Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor. *J Biol Chem* 1988; 263: 9437-42.
16. Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, Butler D, Herzog L, Carter A, et al. Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* 1997; 386: 619-23.

17. Tsuchiya K, Hara H. The inflammasome and its regulation. *Crit Rev Immunol* 2014; 34(1): 41-80.
18. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 2010; 11: 136-40.
19. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 2014; 5: 461.
20. Anwar MA, Basith S, Choi S. Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. *Exp Mol Med* 2013; 45: e11.
21. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2: 675-80.
22. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann, JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86: 973-83.
23. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptor in innate immunity: update of Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373-84.
24. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
25. Chi H, Barry SP, Roth RJ, Wu JJ, Jones EA, Bennett AM, et al. Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2274-9.
26. Doyle SE, O'Connell RM, Miranda GA, Vaidya SA, Chow EK, Liu PT, et al. Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J Exp Med* 2004; 199: 81-90.
27. Werling D, Hope JC, Howard CJ, Jungi TW. Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology* 2004; 111: 41-52.
28. Salaun B, Romero P, Lebecque S. Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *Eur J Immunol* 2007; 37: 3311-8.
29. Kondo T, Kawai T, Akira S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol* 2012; 33(9): 449-58.
30. Palsson-McDermott EM, Doyle SL, McGettrick AF, Hardy M, Husebye H, Banahan K, et al. TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway. *Nat Immunol* 2009; 10: 579-86.
31. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 2005; 434, 243-9.
32. Negishi H, Ohba Y, Yanai H, Takaoka A, Honma K, Yui K, et al. Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102, 15989-94.
33. Yuk JM, Shin DM, Lee HM, Kim JJ, Kim SW, Jin HS, et al. The orphan nuclear receptor SHP acts as a negative regulator in inflammatory signaling triggered by Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2011; 12(8): 742-51.

34. Brint EK, Xu D, Liu H, Dunne A, McKenzie AN, O'Neill LA, et al. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol* 2004; 5: 373-9.
35. Basith S, Manavalan B, Govindaraj RG, Choi S. In silico approach to inhibition of signaling pathways of Toll-like receptors 2 and 4 by ST2L. *PLoS One* 2011; 6: e23989.
36. Divanovic S, Trompette A, Atabani SF, Madan R, Golenbock DT, Visintin A, et al. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nat Immunol* 2005; 6: 571-8.
37. LeBouder E, Rey-Nores JE, Rushmere NK, Grigorov M, Lawn SD, Affolter M, et al. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol* 2003; 171: 6680-9.
38. Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, Yamamoto M, Finn G, Fujita T, et al. Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol* 2006; 7(6): 598-605.
39. Tanaka T, Grusby MJ, Kaisho T. PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF-kappaB activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit. *Nat Immunol* 2007; 8, 584-91.
40. Han C, Jin J, Xu S, Liu H, Li N, Cao X. Integrin CD11b negatively regulates TLR triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nat Immunol* 2010; 11, 734-42.
41. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-7.
42. Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 5-11.
43. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-76.
44. Shoham S, Huang C, Chen JM, Golenbock DT, Levitz SM. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J Immunol* 2001; 166: 4620-6.
45. Netea MG, van der Graaf C, van der Meer JW, Kullberg BJ. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 672-6.
46. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002; 169: 10-4.
47. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu. Rev Immunol* 2010; 28: 321-42.
48. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 827-37.
49. Ohashi K, Burkart V, Flohé S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000; 164(2): 558-61.
50. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 2000; 12(11): 1539-46.

51. Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouaz F, et al. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol* 2001; 166(12): 7128-35.
52. Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, Drage MG, Jadowsky J, Harding CV, et al. Human α -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(47): 18631-5.
53. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 2002; 277(17): 15028-34.
54. Vabulas RM, Braedel S, Hilf N, Singh-Jasuja H, Herter S, Ahmad-Nejad P, et al. The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J Biol Chem* 2002; 277(23): 20847-53.
55. Sato M, Sano H, Iwaki D, Kudo K, Konishi M, Takahashi H, et al. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *J Immunol* 2003; 171(1): 417-25.
56. Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest* 2005; 115(2): 407-17.
57. Murakami S, Iwaki D, Mitsuzawa H, Sano H, Takahashi H, Voelker DR, et al. Surfactant protein A inhibits peptidoglycan-induced tumor necrosis factor-alpha secretion in U937 cells and alveolar macrophages by direct interaction with toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 2002; 277(9): 6830-7.
58. Ohya M, Nishitani C, Sano H, Yamada C, Mitsuzawa H, Shimizu T, et al. Human pulmonary surfactant protein D binds the extracellular domains of Toll-like receptors 2 and 4 through the carbohydrate recognition domain by a mechanism different from its binding to phosphatidylinositol and lipopolysaccharide. *Biochemistry* 2006; 45(28): 8657-64.
59. Yang D, Chen Q, Su SB, Zhang P, Kurosaka K, Caspi RR, et al. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. *J Exp Med* 2008; 205(1): 79-90.
60. Satta N, Dunoyer-Geindre S, Reber G, Fish RJ, Boehlen F, Kruithof EK, et al. The role of TLR2 in the inflammatory activation of mouse fibroblasts by human antiphospholipid antibodies. *Blood* 2007; 109(4): 1507-14.
61. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 2004; 279(9): 7370-7.
62. Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A. HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med* 2008; 14(7-8): 476-84.
63. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; 276(13): 10229-33.
64. Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001; 167(5): 2887-94.

65. Midwood K, Sacre S, Piccinini AM, Inglis J, Trebault A, Chan E, et al. Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat Med* 2009; 15(7): 774-80.
66. Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* 2002; 298(5595): 1025-9.
67. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 2007; 81(1): 28-37.
68. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med* 2007; 13(9): 1042-9.
69. Devaney JM, Greene CM, Taggart CC, Carroll TP, O'Neill SJ, McElvaney NG. Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. *FEBS Lett* 2003; 544(1-3): 129-32.
70. Hurst J, Prinz N, Lorenz M, Bauer S, Chapman J, Lackner KJ, et al. TLR7 and TLR8 ligands and antiphospholipid antibodies show synergistic effects on the induction of IL-1beta and caspase-1 in monocytes and dendritic cells. *Immunobiology* 2009; 214(8): 683-91.
71. He RL, Zhou J, Hanson CZ, Chen J, Cheng N, Ye RD. Serum amyloid A induces G-CSF expression and neutrophilia via Toll-like receptor 2. *Blood* 2009; 113(2): 429-37.
72. Cheng N, He R, Tian J, Ye PP, Ye RD. Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. *J Immunol* 2008; 181(1): 22-6.
73. Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, Akashi-Takamura S, Ishibashi S, Miyake K, et al. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol* 2008; 10(11): 1349-55.
74. Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* 2001; 104(25): 3103-8.
75. Miller YI, Viriyakosol S, Binder CJ, Feramisco JR, Kirkland TN, Witztum JL. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *J Biol Chem* 2003; 278(3): 1561-8.
76. Bae YS, Lee JH, Choi SH, Kim S, Almazan F, Witztum JL, et al. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2. *Circ Res* 2009; 104(2): 210-8.
77. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116(11): 3015-25.
78. Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, et al. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest* 2005; 115(8): 2223-33.
79. Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 2009; 457(7225): 102-6.

80. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, et al. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002; 195(1): 99-111.
81. Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 2002; 168(10): 5233-9.
82. Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* 2004; 279(13): 12542-50.
83. Vollmer J, Tluk S, Schmitz C, Hamm S, Jurk M, Forsbach A, et al. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med* 2005; 202(11): 1575-85.
84. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002; 416(6881): 603-7.
85. Lee KM, Seong SY. Partial role of TLR4 as a receptor responding to damage-associated molecular pattern. *Immunol Let* 2009; 125: 31-39.
86. Cavassani KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, et al. TLR3 in an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J Exp Med* 2008; 205: 2609-21.
87. Hodgkinson CP, Patel K, Ye S. Funcional Toll-like receptor 4 mutations modulate the response to fibrinogen. *Trombosis and Haemostasis* 2008; 100: 301-7.
88. Mohan AR, Loudon JA, Bennett PR. Molecular and biochemical mechanisms of preterm labour. *Semin Fetal Neonatal Med* 2004; 9: 437-44.
89. Clark GF, Schust D. Manifestations of immune tolerance in human female reproductive tract. *Front Immunol* 2013; 4: 26.
90. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann NY Acad Sci* 2011; 1221: 80-7.
91. Raghupathy R. Maternal anti-placental cell-mediated reactivity and spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 478-84.
92. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14: 353-6.
93. Chaouat G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol* 2007; 29: 95-113.
94. Wilczyński JR. Th1/Th2 cytokines balance yin and yang of reproductive immunology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 122: 136-43.
95. Mor G. Inflammation and pregnancy: the role of Toll-like receptors in trophoblast-immune interaction. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127: 121-8.
96. Makhseed M, Raghupathy R, El-Shazly S, Azizieh F, Al-Harmi JA, Al-Azemi MM. Pro-inflammatory maternal cytokine profile in preterm delivery. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49: 308-18.

97. El-Shazly S, Makheed M, Azizieh F, Raghupathy R. Increased expression of pro-inflammatory cytokines in placentas of women undergoing spontaneous preterm delivery or premature rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52: 45-52.
98. Arntzen KJ, Lien E, Austgulen R. Maternal serum levels of interleukin-6 and clinical characteristics of normal delivery at term. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 76: 55-60.
99. Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. *Hum Pathol* 2004; 35: 47-54.
100. Patni S, Flynn P, Wynen L, Seager A, Morgan G, While J. An introduction to Toll-like receptors and their possible role in the initiation of labour. *BJOG* 2007; 114: 1326-34.
101. Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. Cutting edge: recognition of gram-positive bacterial wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 1999; 163: 1-5.
102. Thomson AJ, Telfer JF, Young A, Campbell S, Stewart CJ, Cameron IT, et al. Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process. *Hum Reprod* 1999; 14: 229-36.
103. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006; 11: 317-26.
104. Osman I, Young A, Ledingham MA, Thomson AJ, Jordan F, Greer IA, et al. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 41-5.
105. Young A, Thomson AJ, Ledingham M, Jordan F, Greer IA, Norman JE. Immunolocalization of proinflammatory cytokines in myometrium, cervix, and fetal membranes during human parturition at term. *Biol Reprod* 2002; 66: 445-9.
106. King AE, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR. Innate immune defences in the human uterus during pregnancy. *Placenta* 2007; 28: 1099-106.
107. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1221: 80-7.
108. Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reprod Toxicol* 1999; 13: 347-52.
109. Hung TH, Lo LM, Chiu TH, Li MJ, Yeh YL, Chen SF et al. A longitudinal study of oxidative stress and antioxidant status in women with uncomplicated pregnancies throughout gestation. *Reprod Sci* 2010; 17: 401-9.
110. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40.
111. Chang D, Wang F, Zhao YS, Pan HZ. Evaluation of oxidative stress in colorectal cancer patients. *Biomed Environ Sci* 2008; 21: 286-9.

112. Moura EA, Daher S, Souza E, Mattar R, Rocha D, Leite APL, et al. Aspectos imunogenéticos do parto pré-termoespontâneo. FEMINA 2009; 37(9): 499-503.
113. Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, Fanaroff AA, Hintz SR, Vohr B, et al. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. JAMA 2004; 292(19): 2357-65.
114. Rosenbaum P, Paneth N, Leviton A, Goldstein M, Bax M, Damiano D, et al. A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. Dev Med Child Neurol Suppl 2007; 109: 8-14.
115. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. Lancet 2008; 371(9606): 75-84.
116. Liew G, Wang JJ, Mitchell P. Preterm birth, long-term survival, and fertility. JAMA 2008; 300(2): 167, author reply 167-168.
117. Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH, et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. Bull World Health Organ. 2010; 88(1): 31-8.
118. Goldenberg RL, Gravett MG, Iams J, Papageorghiou AT, Waller SA, Kramer M, Culhane J, et al. The preterm birth syndrome: issues to consider in creating a classification system. Am J Obstet Gynecol 2012; 206(2): 113-8.
119. Gomez R, Romero R, Edwin SS, David C. Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. Infect Dis Clin North Am 1997; 11(1): 135-76.
120. Menon R. Spontaneous preterm birth, a clinical dilemma: etiologic, pathophysiologic and genetic heterogeneities and racial disparity. Acta Obstet Gynecol Scand 2008; 87(6): 590-600.
121. Mercer BM, Lewis R. Preterm labor and preterm premature rupture of the membranes. Diagnosis and management. Infect Dis Clin North Am 1997; 11(1): 177-201.
122. Romero R, Sirtori M, Oyarzun E, Avila C, Mazor M, Callahan R, et al. Infection and labor V. Prevalence, microbiology, and clinical significance of intraamniotic infection in women with preterm labor and intact membranes. Am J Obstet Gynecol 1989; 161(3): 817-24.
123. Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. Semin Fetal Neonatal Med 2006; 11(5): 317-26.
124. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. BJOG 2006; 113(Suppl3): 17-42.
125. Sayres WG Jr. Preterm labor. Am Fam Physician 2010; 81(4): 477-84.
126. Murphy DJ. Epidemiology and environmental factors in preterm labour. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2007; 21(5): 773-89.
127. Anum EA, Springel EH, Shriver MD, Strauss JF 3rd. Genetic contributions to disparities in preterm birth. Pediatr Res 2009; 65(1): 1-9.
128. Holst D, Garnier Y. Preterm birth and inflammation -The role of genetic polymorphisms. EJOGRB 2008; 141: 3-9.

129. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000; 342: 1500-7.
130. Kim MJ, Romero R, Gervasi MT, Kim JS, Yoo W, Lee DC, et al. Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection. *Lab Invest* 2009; 89: 924-36.
131. Fahey JO. Clinical management of intra-amniotic infection and chorioamnionitis: a review of the literature. *J Midwifery Womens Health* 2008; 53: 227-35.
132. Gibbs RS, Duff P. Progress in pathogenesis and management of clinical intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 1317-26.
133. Ramsey PS, Lieman JM, Brumfield CG, Carlo W. Chorioamnionitis increases neonatal morbidity in pregnancies complicated by preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 1162-6.
134. Van Hoven KH, Anyaegbunam A, Hochster H, Whitty JE, Distant J, Crawford C, et al. Clinical significance of increasing histologic severity of acute inflammation in the fetal membranes and umbilical cord. *Pediatr Pathol Lab Med* 1996; 16: 731-44.
135. Edwards RK. Chorioamnionitis and labor. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2005; 32: 287-96.
136. Redline RW. Placental inflammation. *Sem Neonatol* 2004; 9: 265-74.
137. Sperling RS, Newton E, Gibbs RS. Intra-amniotic infection in low-birth-weight infants. *J Infect Dis* 1988; 157: 113-7.
138. Romero R, Mator M, Munoz H, Gomez R, Galasso M, Sherer DM. The preterm labor syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 734: 414-29.
139. Gibbs RS, Blanco JD, St Clair PJ, Castaneda YS. Quantitative bacteriology of amniotic fluid from women with clinical intraamniotic infection at term. *J Infect Dis* 1982; 145: 1-8.
140. Challis JRG. Mechanism of parturition and preterm labor. *Obstet Gynecol Surv* 2000; 55: 650-60.
141. Abrahams VM. The role of the Nod-like receptor family in trophoblast innate immune responses. *J Reprod Immunol* 2011; 88(2): 112-7.
142. Opitz B, Püschel A, Beermann W, Hocke AC, Förster S, Schmeck B, et al. *Listeria monocytogenes* activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. *J Immunol* 2006; 176(1): 484-90.
143. Uehara A, Yang S, Fujimoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Shibata K, et al. Muramyl dipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramyl peptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cell Microbiol* 2005; 7(1): 53-61.
144. Menon R, Fortunato SJ. Infection and the role of inflammation in preterm premature rupture of the membranes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; 21: 467-78.
145. DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. *Semin Fetal Neonatal Med* 2012; 17: 2-11.

146. Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera H, Espejel-Nuñez A, Flores-Pliego A, Soriano-Becerril D, et al. In vitro secretion profiles of interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF alpha after selective infection with *Escherichia coli* in human fetal membranes. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; 5: 46.
147. Menon R, Peltier MR, Eckardt J, Fortunato SJ. Diversity in cytokine response to bacteria associated with preterm birth by fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201(3): 306.e1-6.
148. Park CW, Yoon BH, Park JS, Jun JK. A fetal and an intra-amniotic inflammatory response is more severe in preterm labor than in preterm PROM in the context of funisitis: unexpected observation in human gestations. *PLoS One* 2013; 8(5): e62521.
149. Menon R, Yu J, Basanta-Henry P, Brou L, Berga SL, Fortunato SJ, et al. Short fetal leukocyte telomere length and preterm prelabor rupture of the membranes. *PLoS One* 2012; 7: e31136.
150. Chai M, Barker G, Menon R, Lappas M. Increased oxidative stress in human fetal membranes overlying the cervix from term non-labouring and post labour deliveries. *Placenta* 2012; 33: 604-10.
151. Lappas M, Riley C, Lim R, Barker G, Rice GE, Menon R, et al. MAPK and AP-1 proteins are increased in term pre-labour fetal membranes overlying the cervix: regulation of enzymes involved in the degradation of fetal membranes. *Placenta* 2011; 32: 1016-25.
152. Menon R, Fortunato SJ. The role of matrix degrading enzymes and apoptosis in rupture of membranes. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11: 427-37.
153. Menon R, Boldogh I, Hawkins HK, Woodson M, Poletti J, Syed TA, et al. Histological evidence of oxidative stress and premature senescence in preterm premature rupture of the human fetal membranes recapitulated in vitro. *Am J Pathol* 2014; 184: 1740-51.
154. Hsieh TT, Chen SF, Lo LM, Li MJ, Yeh YL, Hung TH. The association between maternal oxidative stress at mid-gestation and subsequent pregnancy complications. *Reprod Sci* 2012; 19: 505-12.
155. Holmlund U, Cebers G, Dahlfors AR, Sandstedt B, Bremme K, Ekström ES, et al. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. *Immunology* 2002; 107: 145-51.
156. Wang H, Hirsch E. Bacterially-induced preterm labor and regulation of prostaglandin-metabolizing enzyme expression in mice: the role of toll-like receptor 4. *Biol Reprod* 2003; 69: 1957-63.
157. Rindsjö E, Holmlund U, Sverremark-Ekström E, Papadogiannakis N, Scheynius A. Toll-like receptor -2 expression in normal and pathologic human placenta. *Hum Pathol* 2007; 38: 468-73.
158. Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, Kim GJ, Kim MR, Kuivaniemi H, et al. Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 1346-55.
159. Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. *Hum Pathol* 2004; 35: 47-54.
160. Moço NP, Martin LF, Pereira AC, Poletti J, Peraçoli JC, Coelho KI, et al. Gene expression and protein localization of TLR-1, -2, -4 and -6 in amniochorion membranes of pregnancies complicated by histologic chorioamnionitis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013; 171: 12-7.

161. Kacerovsky M, Andrys C, Drahosova M, Musilova I, Hornychova H, Lesko D, et al. Soluble Toll-like receptor 1 family members in the amniotic fluid of women with preterm prelabor rupture of the membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25(9): 1699-704.
162. Kacerovsky M, Andrys C, Hornychova H, Pliskova L, Lancz K, Musilova I, et al. Amniotic fluid soluble Toll-like receptor 4 in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of the membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25(7): 1148-55.
163. Keelan JA, Marvin KW, Sato TA, Coleman M, McCowan LM, Mitchell MD. Cytokine abundance in placental tissues: evidence of inflammatory activation in gestational membranes with term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181: 1530-6.
164. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, et al. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164(11): 5998-6004.
165. Gonzalez JM, Xu H, Ofori E, Elovitz MA. Toll-like receptors in the uterus, cervix and placenta: is pregnancy an immunosuppressed state? *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197: 296.e1-e6.
166. Beijar EC, Mallard C, Powell TL. Expression and subcellular localization of TLR-4 in term and first trimester human placenta. *Placenta* 2006; 27: 322-6.
167. Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptors mRNA in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 2002; 168: 554-61.
168. Mantovani A, Cassatella MA, Constantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(8): 519-31.
169. Parihar A, Eubank TD, Doseff AI. Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. *J Innate Immun* 2010; 2(3): 204-15.
170. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003; 102: 2660-9.
171. Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MKB, Dower SK. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *Immunol* 2002; 168: 4701-10.
172. Kurt-Jones EA, Mandell L, Whitney C, Padgett A, Gosselin K, Newburger PE, et al. Role of Toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood* 2002; 100: 1860-8.
173. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med* 2013; 210(7): 1283-99.
174. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 669-92.
175. Nitsche JF, Jiang SW, Brost BC. Toll-like receptor-2 and toll-like receptor-4 expression on maternal neutrophils during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; 64(6): 427-34.

176. Pawelczyk E, Nowicki BJ, Izban MG, Pratap S, Sashti NA, Sanderson M, et al. Spontaneous preterm labor is associated with an increase in the proinflammatory signal transducer TLR4 receptor on maternal blood monocytes. *BMC Pregnancy Childbirth*; 10: 66.
177. Kim J, Ko Y, Kwon K, Koo S, Rhee Y, Kang B, et al. Analysis of monocyte subsets and toll-like receptor 4 expression in peripheral blood monocytes of women in preterm labor. *J Reprod Immunol* 2012; 94(2): 190-5.

Artigo científico

Evaluation of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and TLR-6 gene and protein expression in maternal PBMCs and PMNs during normal pregnancy and preterm labor.

Natália P. Moço^a, Renata A. C. Batista^a, Laura F. Martin^a, Luciane A. Dias-Melício^a, Marjorie A. Golim^b, Márcia G. Silva^{a*}

^a. Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

^b. Flow Cytometry Laboratory, Blood Center, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author

Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University – UNESP

Distrito de Rubião Júnior, Zip Code 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Phone: +55 (14) 3880 1580 Fax: +55 (14) 3815-2348

E-mail: mgsilva@fmb.unesp.br

Abstract

Problem: The inflammation response triggered by Toll-like receptors (TLRs) has become the focus of investigations to predict preterm labor. **Aim:** Evaluate TLR-1, -2, -4 and -6 expression in maternal neutrophils and PBMCs in normal and preterm pregnancies. **Method of study:** We included 139 pregnant women and TLR expression was performed by real-time PCR and flow cytometry. **Results:** There were no differences in gene and protein expression of TLRs in PBMCs between trimesters and between preterm and term pregnancies. Regarding neutrophils, there were no differences in the expressions of TLRs between trimesters, however preterm pregnancies showed higher TLR-1, TLR-2 and TLR-4 gene expression. Nevertheless, the protein expression of these TLRs did not differ between these groups. **Conclusion:** TLR-1, TLR-2, TLR-4 and TLR-6 expression in maternal neutrophils and PBMCs are not temporally regulated in normal pregnancy and this expression in maternal blood cells is not useful as a biomarker of preterm labor.

Keywords: Innate immunity, Pregnancy, Prematurity, Real-time PCR, Flow Cytometry

Introduction

Pregnancy constitutes distinctive challenges for the maternal immune system^{1,2}. During this period, the immune system of pregnant women is tightly controlled to promote tolerance to the allogeneic fetus, and to protect the mother and the growing fetus against possible pathogens²⁻⁶. Dysregulation of this immune control may lead to pregnancy complications, such as implantation failure, pregnancy loss, intrauterine fetal growth restriction and preterm birth⁶.

Preterm birth (PTB), defined as delivery before 37 weeks of gestation, is the major cause of neonatal mortality and serious neonatal morbidity worldwide and the risk is inversely proportional to gestational age at birth⁷⁻¹¹. The overall prevalence of prematurity is approximately 12% in developed countries¹²⁻¹⁴ and 9.6% worldwide¹⁵.

It has been currently postulated that early activation of the pro-inflammatory pathway is the major cause of induction of preterm labor and delivery¹⁶⁻¹⁹ and compelling evidence supports the association between intrauterine infection, maternal inflammatory response and early activation of the parturition pathway, which results in preterm birth²⁰⁻²³. Predisposing factors for infection-related PTB are diverse and include subclinical intrauterine infection²⁴, intrauterine infection²⁵⁻²⁶ and pyelonephritis²⁷.

The innate immune system is the first line of defense²⁸⁻³⁰ that provides an immediate response against invading pathogens through its ability to distinguish between a “non-self” and a “self”^{29,31}. Special sentries of the immune system named pattern recognition receptors (PRRs) recognize conserved pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) present in microorganisms^{28,32-34}. In addition to microbial ligands, PRRs have been shown to respond to endogenous molecules released by tissue or immune cells in response to injury or inflammation, referred to as damage-associated molecular patterns (DAMPs)³⁵⁻³⁷.

Toll-like receptors (TLRs) form an important class of PRRs^{29,32,34,38}. They are transmembrane proteins characterized by an extracellular leucine-rich domain (LRR) and a cytoplasmic domain homologous to the interleukin-1 receptor (IL-1R), called the Toll/IL-1 receptor (TIR) domain^{16,30,39}.

Thirteen mammalian TLRs have been identified to date, however, only ten are functional in humans (TLR-1-TLR-10)^{17,30,38}. Each receptor differs in its specificity. Regarding microbial ligands, TLR-4 is crucial for effective host cell responses to lipopolysaccharide (LPS) from gram-negative bacteria. TLR-2 has the widest specificity, recognizing lipoproteins, peptidoglycan (PDG) from gram-positive bacteria, lipoteichoic acid (LTA) and fungal zymosan. TLR-2 is able to recognize a large spectrum of PAMPs because it can form heterodimers with TLR-1 and TLR-6. It has been suggested that the heterodimer of TLR-1/TLR-2 recognizes triacylated lipoproteins, while TLR-2/TLR-6 recognizes diacylated lipoproteins^{17,18,33,34,40}. Activation of TLRs by specific PAMPs and DAMPs leads to a downstream cascade orchestrated by the transcription factor NF- κ B^{35,41,42}, which results in the production of effector molecules, such as pro-inflammatory cytokines, chemokines, prostaglandins, proteases and other enzymes^{1,35,43,44}.

Since TLRs are involved in the inflammatory response associated with preterm birth^{16,42}, these innate immune receptors have become the focus of investigations to understand risk factors for the induction of preterm labor and to predict this complication.

Most studies that outline the expression levels of TLRs during normal and complicated pregnancies have focused on the tissues of the maternal-fetal interface, such as the placenta and the amniochorion membranes⁴⁵⁻⁴⁸.

Changes in TLR expression at the maternal-fetal interface throughout gestation appear to parallel the shifts between pro- and anti-inflammatory states during pregnancy. If it is proven that the same pattern is observed systemically, it could help explain a woman's increased susceptibility to certain infections during pregnancy and it may determine, with further investigation, a higher risk of certain pregnancy complications - pre-eclampsia, preterm premature rupture of membranes (PPROM) and preterm labor (PTL) - without having to wait until the resolution of gestation.

Considering the scarcity of research that discusses the expression of these receptors from a systemic view point during normal pregnancy and in preterm labor, a potential biological sample of interest are peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and polymorphonuclear cells (PMNs), since

they play a crucial role in the immune system and express high levels of many of the TLRs⁴⁹⁻⁵². More importantly, these cells are easily retrievable during pregnancy and allow for the assessment of TLRs prior to delivery, when the information could influence the management of an ongoing pregnancy.

Thus, the study aimed to evaluate the profile of gene expression of TLR-1, -2, -4 and -6 in PMBCs and PMNs from maternal peripheral blood longitudinally throughout normal pregnancy and to compare these expressions between preterm and term pregnancies.

Materials and Methods

Study design

This work was composed of two separated cross-sectional studies. For the normal pregnancy analyses, between 5 and 40 weeks of pregnancy, a total of 119 normal pregnant women were enrolled in the first cross-sectional study, which consisted of three groups, according to the gestational trimester. We included 27 women in the first trimester (5 to 14 weeks), 49 in the second (14 weeks and 1 day to 28 weeks) and 43 in the third trimester (28 weeks and 1 day to 40 weeks). These women were attended at Primary Health Care Units in the city of Botucatu, São Paulo State, Brazil. Women were eligible if they were having a singleton term and uneventful pregnancy, defined as being free from any chronic or gestational medical conditions, including any condition that would require activity restrictions, intact membranes, and irrelevant obstetric history. After enrollment, the women were excluded from the study if they developed any of the following complications: multiple pregnancies, preeclampsia, diabetes, hypertension, fetal anomalies, placenta previa and prematurity.

The second cross-sectional study was conducted to analyze gene and protein expressions in the prematurity. We included twenty preterm women (12 with PTL and 8 with PPRM), who were referred to the Obstetrics Care Unit of Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil. The term group was constituted by the selection of all the pregnant women from third trimester group of the first cross-sectional study who carried for 37 or more weeks of gestation (n=18). Women were not eligible if they presented multiple pregnancies, diabetes, hypertension,

fetal anomalies, placental abruption, placenta previa, intrauterine growth restriction and urinary tract infection.

For all the pregnant women included in the study, the gestational age was calculated from the first day of the last menstrual period and/or by first-trimester ultrasound examination.

Sociodemographic and obstetric characterization of the study groups was performed by the review of medical records of all the women enrolled.

The Human Research Ethics Committee of the institution approved the study, under protocol 3752-2010, and written informed consent was obtained from all the participants.

Blood samples collection

The collection of blood samples of pregnant women from the first cross-sectional study was conducted during routine prenatal care at Primary Health Care Units. The blood samples of the second cross-sectional study were collected during the process of labor in the Obstetrics Care Unit of Botucatu Medical School.

A total of 20mL of peripheral blood was collected from each woman, which was stored in sterile heparinized tubes.

Cell isolation

The blood samples were submitted to centrifugation on a Ficoll-Hypaque gradient containing two different densities: 1119 and 1083 g/mL (Sigma–Aldrich, MO, USA) for 29 min, 460 g, 25 °C. This density gradient allows for the isolation of two halos of cells. The first halo contains predominantly PBMCs) and the second halo contains predominantly polymorphonuclear cells (PMNs). These two halos were collected separately and washed with culture medium RPMI 1640 supplemented with 2 mM l-glutamine, 40 µg/mL gentamycin (Sigma-Aldrich, MO, USA) for 10 min, 350 g, 4°C. After determining the total number of cells in each suspension (neutral red dye 1:10 for PBMCs and trypan blue stain 1:10 for PMNs), cell suspensions were purified from the pellet using microbeads.

Purification of PBMCs was performed using negative selection by Monocyte Isolation Kit II (MiltenyiBiotec, CA, USA) and purification of PMNs using positive selection by CD16 microbeads (MiltenyiBiotec). Purified PBMC and PMN suspensions were resuspended in freezing medium containing fetal bovine serum (Sigma-Aldrich) and 20% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich) at a concentration of 2×10^6 cells/mL, and stored at -80°C until use. Cells were thawed immediately before use using a water bath maintained at 37°C for 1 min. Cell viability after thawing was assessed with flow cytometry. PMBC viability was approximately 90.0% and PMN viability was 94.0%.

All the women included presented viable cells after thawing, however in some cases the amount of cells obtained was insufficient for both the techniques used in the study. Therefore, the gene expression analysis was performed in 100% of cases and analysis of protein expression in 86.7% of PBMCs and 96.6% of PMNs.

Real-time PCR

Total RNA was extracted automatically from the PMBCs and PMNs using the RNeasyMicro[®] kit (Qiagen, Germany), adapted for use in Qiacube[®] equipment (Qiagen). The quality and concentration of extracted total RNA were measured with Epoch (Biotek, VT, USA) by determining the absorbance ratio 260 nm/280 nm and absorbance at 260 nm, respectively. Ratios between 1.8 and 2.1 were considered acceptable.

Samples with a RNA concentration between 0.02 and $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ were processed to obtain cDNA using SuperScript[®] VILO cDNA kit (Invitrogen[™], CA, USA), following the manufacturer's instructions. Real-time quantitative PCR was used to quantify mRNA expression of TLRs, and TaqMan-validated primers and TaqMan MGB probes (Applied Biosystems, CA, USA) were used to amplify TLR-1, TLR-2, TLR-4 and TLR-6 (Hs00413978_m1, Hs00610101_m1, Hs00370853_m1 and Hs00271977_s1, respectively). The levels of expression of the TLRs in each sample were normalized with GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, Hs99999905_m1), which was used as the housekeeping gene.

Amplification was performed with a Line Gene K (Bioer®, Binjiang, China) using the ddCT method⁵³. The mean CT of pooled samples of women from the third trimester group was used as a calibrator. Thermal cycling was initiated with a denaturation step of 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. All reactions were performed in duplicate and negative controls were included in each run.

Flow cytometry

Protein expression of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and TLR-6, on the surface of PBMCs and PMNs was assessed using a FACSCalibur flow cytometer and CellQuest software (Becton Dickinson, NJ, USA).

A total of 4×10^5 cells from the frozen medium were resuspended in Isoton Diluent II (Beckman Coulter, IN, USA) and incubated with the following MAbs, in accordance with the manufacturer's instructions: 1 μ L of FITC-labeled anti-TLR1 (GD2.F4), 1 μ L of Alexa Fluor® 647-labeled anti-TLR2 (TL2.1), 3 μ L of PE-labeled anti-TLR4 (HTA125), and 1 μ L of PE-labeled anti-TLR6 (TLR6.127). All of these antibodies were purchased from BioLegend (CA, USA), except anti-TLR1, from Abcam (Cambridge, UK). Stained cells were incubated for 30 min in the dark at room temperature, then washed and fixed with 5% PFA in phosphate buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich). Background staining was determined from cells incubated with 1 μ L FITC-, 1 μ L Alexa fluor-, 3 μ L PE- and 1 μ L PE-labeled control isotype antibodies, for 30 min at room temperature in the dark. Then, the samples were analyzed by flow cytometry.

The population of interest was optimized by cell selection (gate) based on size (FSC) and granularity (SSC) parameters (Figure 1). Ten thousand PBMC and PMN events were acquired in the list mode file from each sample, and corresponding levels of fluorescence for TLR-1, TLR-2, TLR4, and TLR-6 were obtained for the gated cells. The results are presented as the percentage of cells that express the TLRs and the median fluorescence intensity of each TLR.

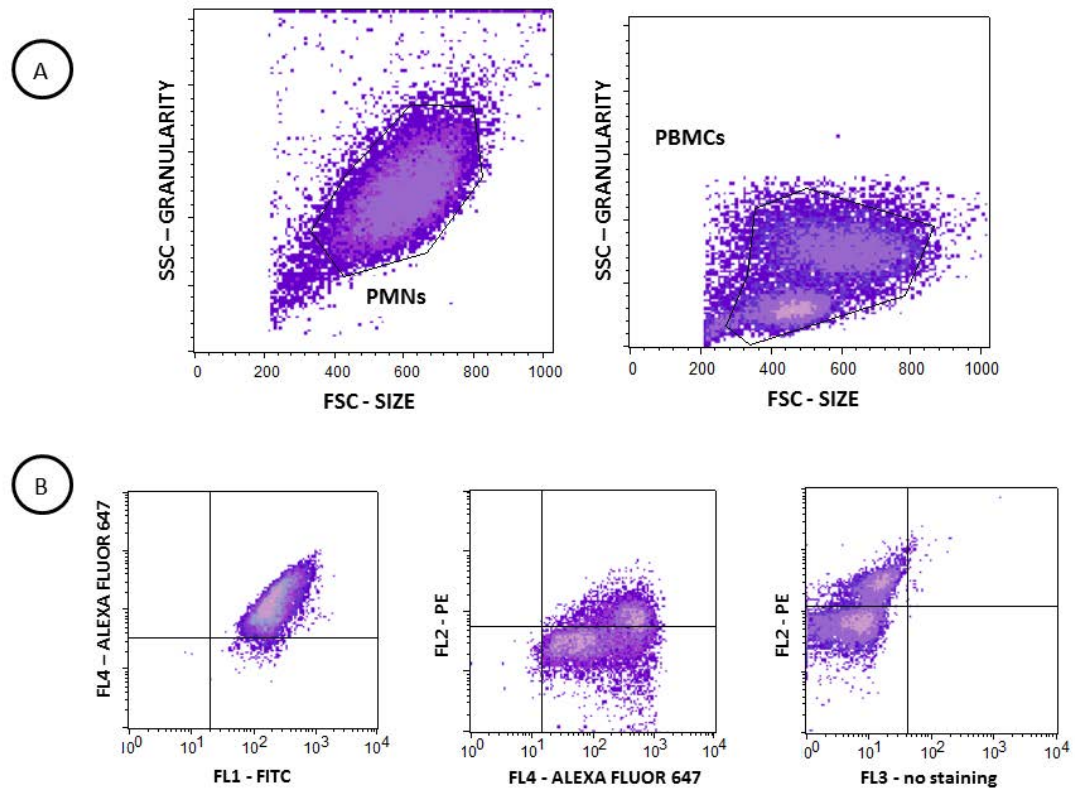


Figure 1. Gate strategy for optimization of the cell population. A. Gate in PMNs and PBMC using size (SSC) and granularity (FSC) parameters. B. Dot plots showing the filters and fluorochromes used for the analysis of TLRs of interest. PMN: polymorphonuclear cells; PBMCs: peripheral blood mononuclear cells; TLRs: Toll-like receptors.

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to check the normality of the data. Regarding sociodemographic and obstetrics variables, marital status, tobacco use, parity and prior gestational complications were compared between the groups using the Exact Fisher test, while the variable age and gestational age at the time of inclusion in the study were compared between trimesters using the nonparametric Kruskal-Wallis test and between the preterm and term groups using the nonparametric Mann-Whitney test.

Relative concentrations of mRNA of TLRs, percentage of cells with TLR expression and median fluorescence intensity of TLR were compared between trimesters using the nonparametric Kruskal-Wallis test and between the preterm and term groups using the nonparametric Mann-Whitney test. A p value < 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Sociodemographic and obstetrics characteristics

The obstetrics of the pregnant women and the sociodemographic characteristics of the all women included in the study are presented in Table 1. There were no statistically significant differences in the variables age, marital status, tobacco use, parity and prior gestational complications among the groups studied. Due to the study design, gestational age at the time of inclusion presented differences between the trimesters ($p < 0.001$) and between preterm and term pregnancies ($p < 0.001$).

Table 1. Sociodemographic and obstetric characteristics of the study population.

Characteristics	1 st trimester (n=27)	2 nd trimester (n=49)	3 rd trimester (n=43)	p-value ^a	Preterm (n=20)	Term (n=18)	p-value ^b
Age (years) *	22.5 (15-40)	19 (14-40)	22 (15-38)	NS	23 (15-44)	22(15-38)	NS
Marital status							
Single	22.2% (6/27)	30.6% (15/49)	23.3% (10/43)		20% (4/20)	5.6% (1/18)	
Married	77.8% (21/27)	69.4% (34/49)	76.7% (33/43)	NS	80% (16/20)	94.4% (17/18)	NS
Tobacco use							
Yes	25% (5/20)	15.2% (5/33)	13.3% (4/30)		30% (6/20)	6.67% (1/15)	
No	75% (15/20)	84.8% (28/33)	86.7% (26/30)	NS	70% (14/20)	93.3% (14/15)	NS
Gestational age on the time of inclusion (days)*	79 (46-96)	145 (100-189)	254 (198-285)	<0.001	239 (181-258)	266 (259-285)	<0.001
Parity							
Primiparous	42.3% (11/26)	63.3% (31/49)	48.8% (20/41)	NS	40% (8/20)	56.2% (9/16)	NS
Prior gestational complication							
Prematurity	0	16.7% (1/6)	23.1% (3/13)	NS	16.7% (2/12)	28.6% (2/7)	NS
Miscarriage	53.3% (8/15)	27.8% (5/18)	28.6% (6/21)	NS	33.3% (4/12)	42.8% (3/7)	NS

NS: not significant

Data not found in the medical records were not included

* values expressed as median (min - max)

^a Comparison between trimesters

^b Comparison between preterm and term pregnancies

Relative quantification of TLR mRNA in PBMCs

Regarding the relative quantification of mRNA of TLRs in maternal PBMCs during normal pregnancy (Figure 2), there were no statistically significant differences in the expressions of TLR-1 ($p=0.072$), TLR-2 ($p=0.303$), TLR-4 ($p=0.727$) and TLR-6 ($p=0.792$) when comparing the gestational trimesters. There were also no differences in the expression of TLR-1 ($p=0.931$), TLR-2 ($p=0.378$), TLR-4 ($p=0.399$) and TLR-6 ($p=0.163$) between preterm and term pregnancies (Figure 3).

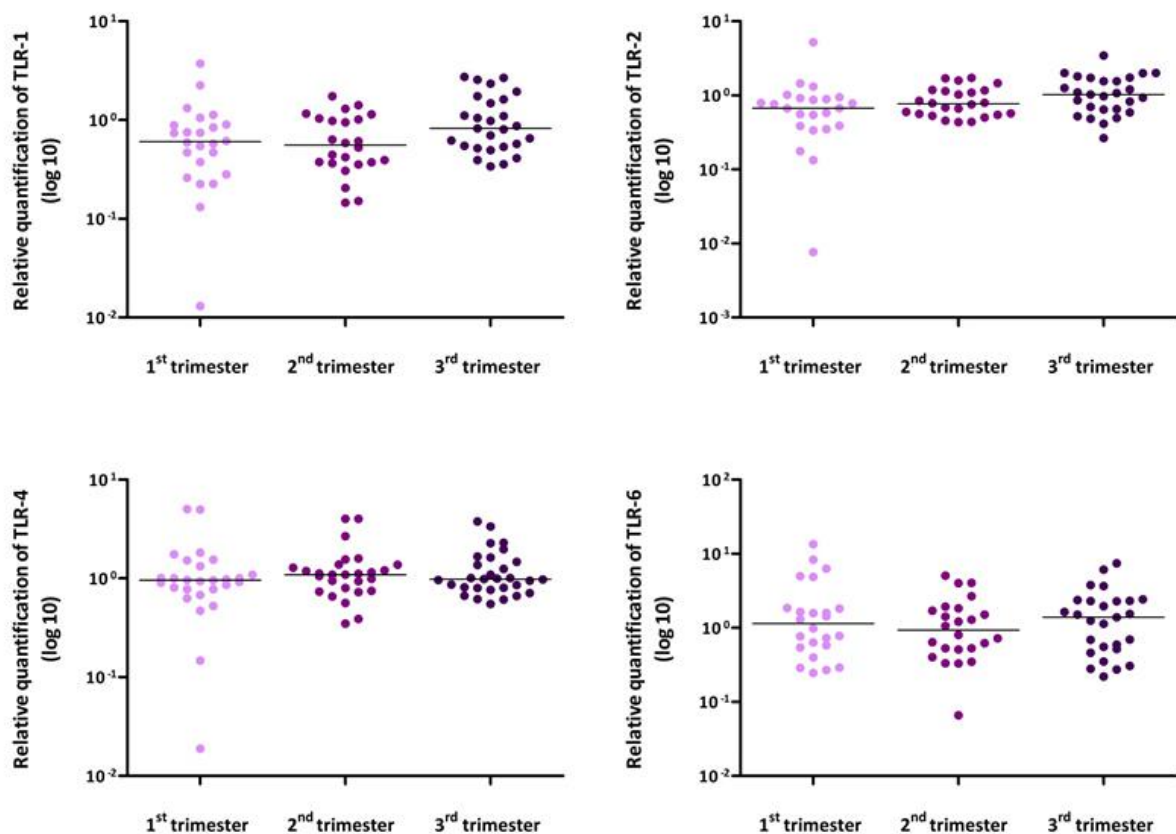


Figure 2. Relative quantification of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and TLR-6 gene expression in PBMCs from peripheral blood of normal pregnancies. Kruskal-Wallis test. TLR: Toll-like receptor.

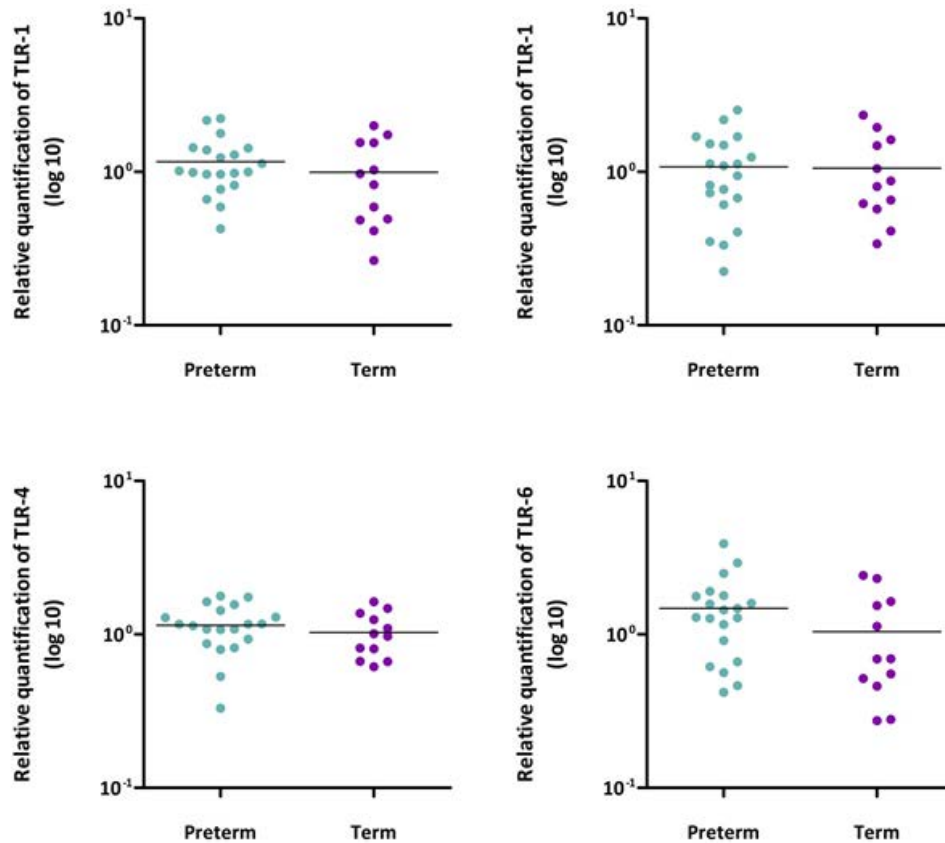


Figure 3. Relative quantification of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and TLR-6 gene expression in PBMCs from peripheral blood of preterm and term pregnancies. Mann-Whitney test. TLR: Toll-like receptor.

Relative quantification of TLR mRNA in PMNs

Regarding the relative quantification of mRNA of TLRs in maternal PMNs during normal pregnancy (Figure 4), there were no statistically significant differences in the expressions of TLR-1 ($p=0.858$), TLR-2 ($p=0.653$), TLR-4 ($p=0.852$) and TLR-6 ($p=0.704$) when comparing the gestational trimesters. The expressions of TLR-1 ($p<0.001$), TLR-2 ($p=0.004$) and TLR-4 ($p=0.004$) in PMNs from preterm pregnancies were statistically higher than PMNs from term pregnancies (Figure 5). TLR-6 expression did not differ between preterm and term pregnancies ($p=0.438$).

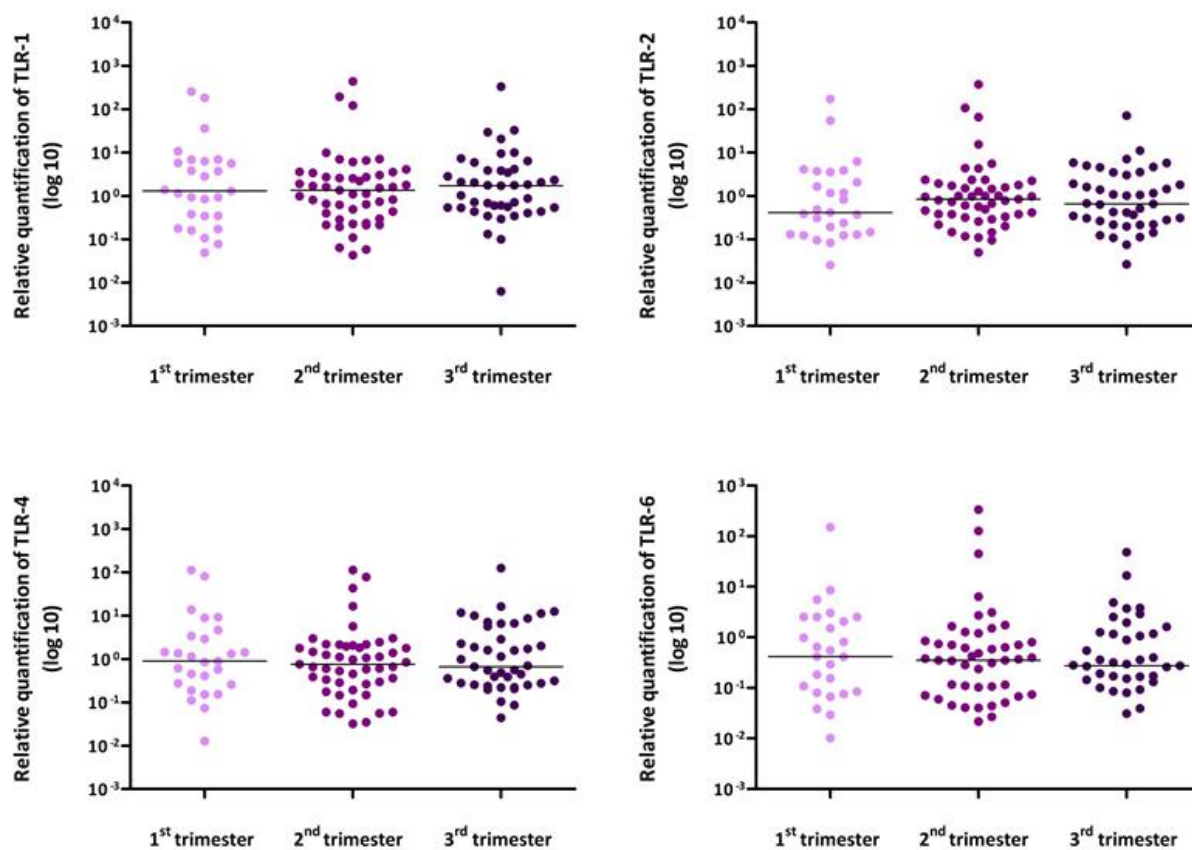


Figure 4. Relative quantification of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and TLR-6 gene expression in PMNs from peripheral blood of normal pregnancies. Kruskal-Wallis test. TLR: Toll-like receptor.

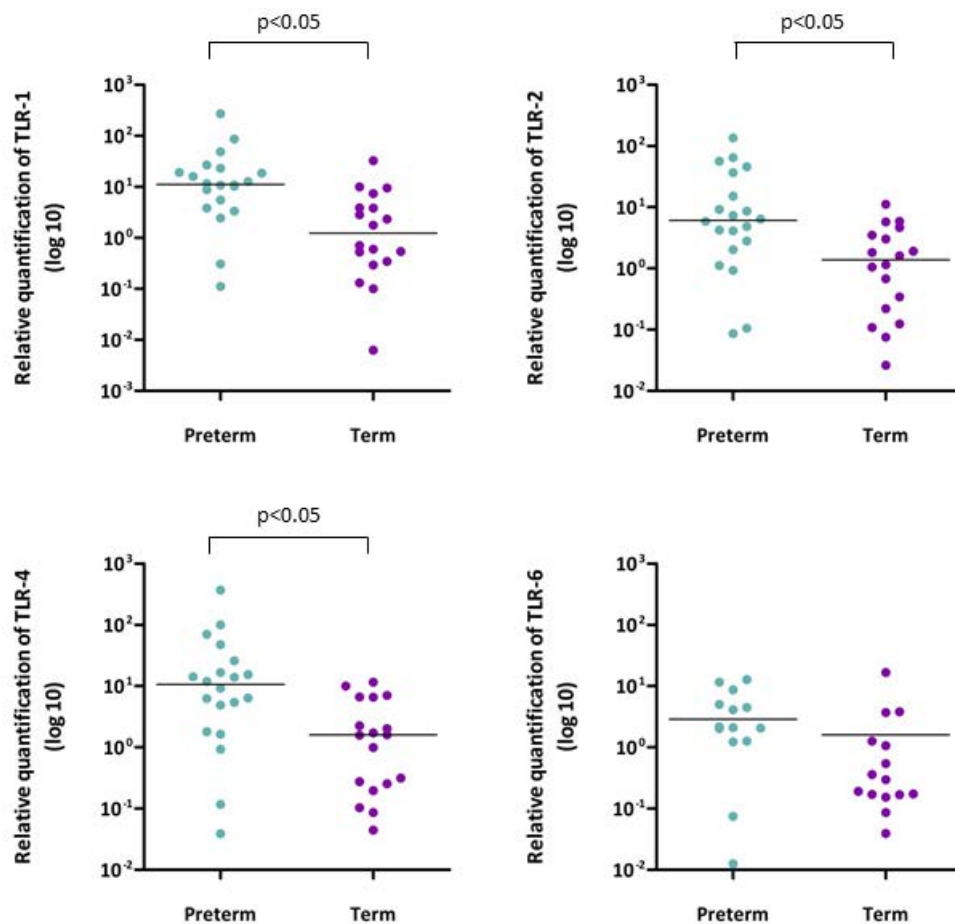


Figure 5. Relative quantification of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and TLR-6 gene expression in PMNs from peripheral blood of preterm and term pregnancies. Mann-Whitney test. TLR: Toll-like receptor.

Protein quantification of TLRs in PBMCs

Percentage of TLR⁺ PBMCs

There were no statistically significant differences in the percentage of PBMCs that expressed TLR-1/TLR-2 ($p=0.914$), TLR-2/TLR-6 ($p=0.944$), TLR-2 ($p=0.081$) and TLR-4 ($p=0.419$) between the trimesters (Figure 6). There were also no differences in the percentage of cells that expressed TLR-1/TLR-2 ($p=0.086$), TLR-2/TLR-6 ($p=0.300$), TLR-2 ($p=0.740$) and TLR-4 ($p=0.292$) between preterm and term pregnancies (Figure 7).

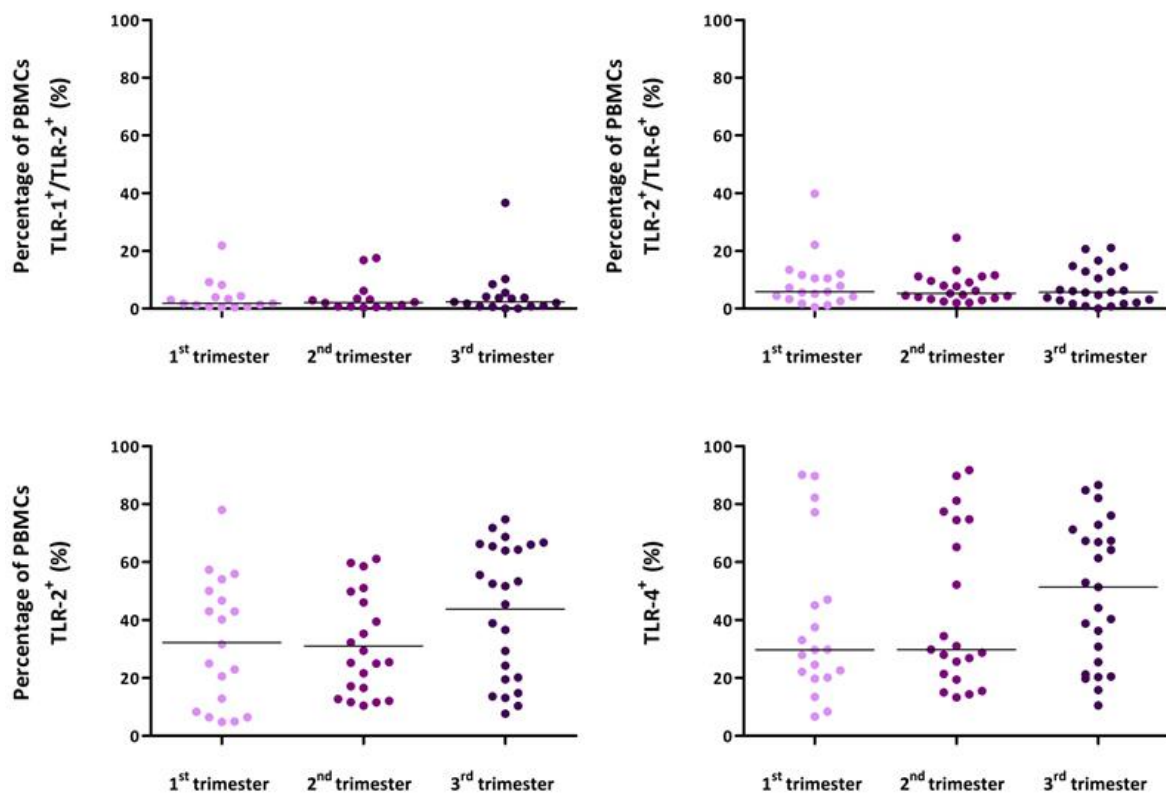


Figure 6. Percentage of TLR-1⁺/TLR-2⁺, TLR-2⁺/TLR-6, TLR-2 and TLR-4 in PBMCs from peripheral blood of normal pregnancies. Kruskal-Wallis test. TLR: Toll-like receptor.

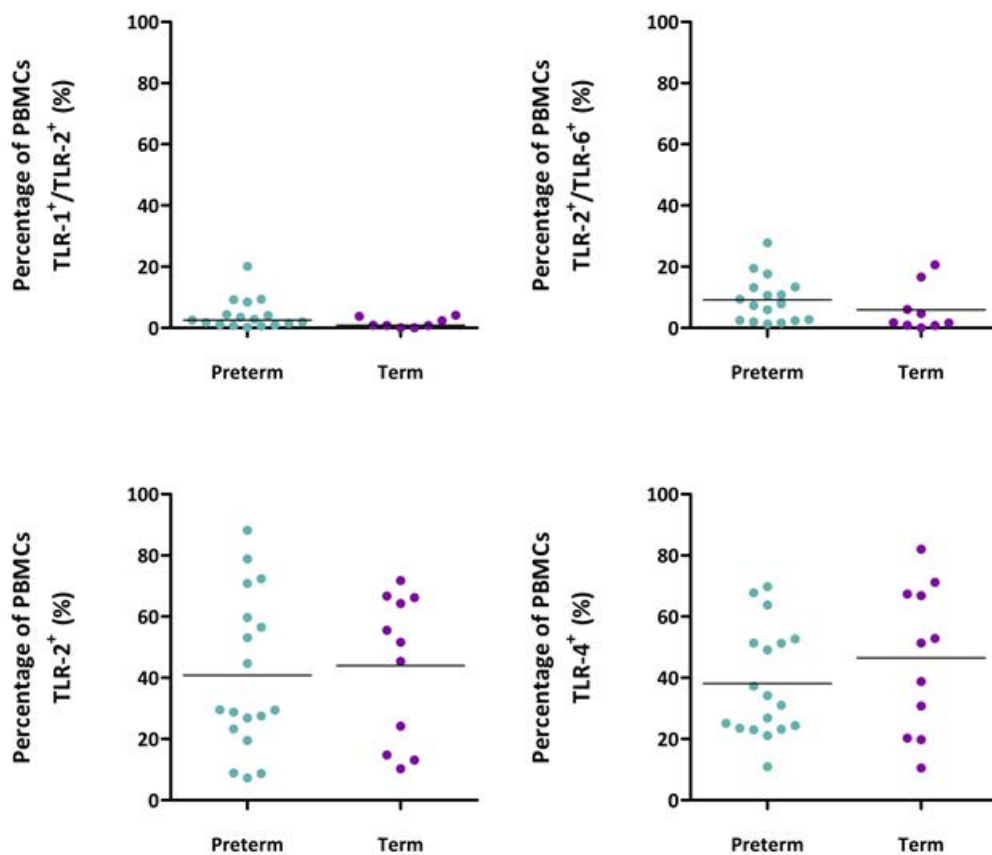


Figure 7. Percentage of TLR-1⁺/TLR-2⁺, TLR-2⁺/TLR-6, TLR-2 and TLR-4 in PBMCs from peripheral blood of preterm and term pregnancies. Mann-Whitney test. TLR: Toll-like receptor.

Median fluorescence intensity of TLRs in PBMCs

There were no statistically significant differences in the median fluorescence intensity of TLR-1 ($p=0.856$), TLR-2 ($p=0.269$), TLR-4 ($p=0.804$) and TLR-6 ($p=0.606$) between the trimesters (Figure 8). There were also no differences in the median fluorescence intensity of TLR-1 ($p=0.771$), TLR-2 ($p=0.111$), TLR-4 ($p=0.621$) and TLR-6 ($p=0.299$) between preterm and term pregnancies (Figure 9).

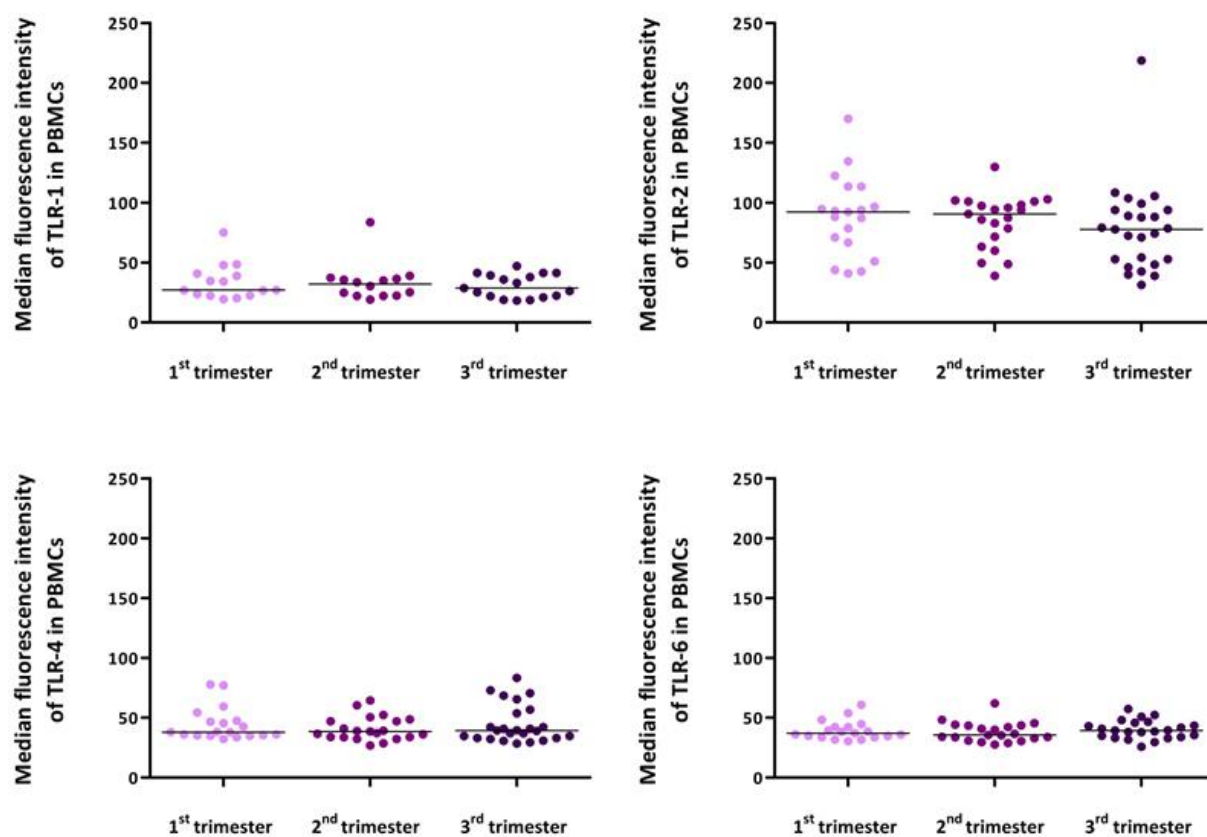


Figure 8. Median fluorescence intensity of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and TLR-6 in PBMCs from peripheral blood of normal pregnancies. Kruskal-Wallis test. TLR: Toll-like receptor.

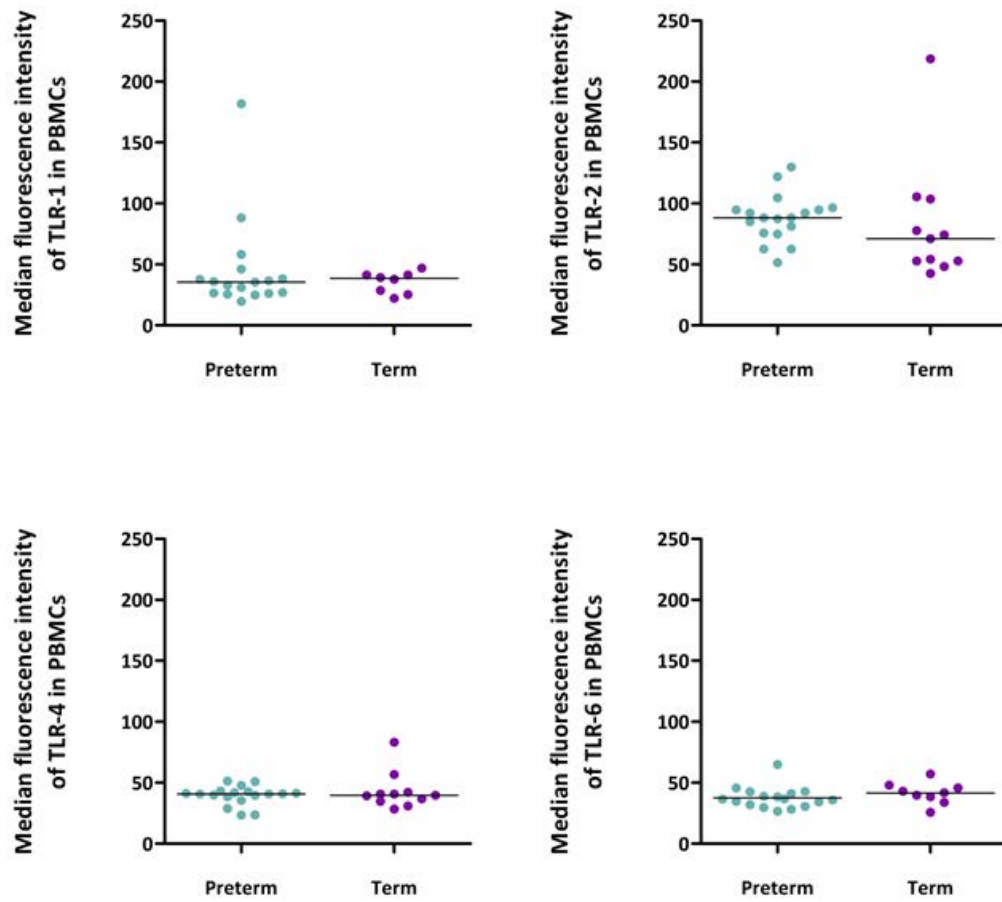


Figure 9. Median fluorescence intensity of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and TLR-6 in PBMCs from peripheral blood of preterm and term pregnancies. Mann-Whitney test. TLR: Toll-like receptor.

Protein quantification of TLRs in PMNs

Percentage of TLR⁺ PMNs

There were no statistically significant differences in the percentage of PMNs that expressed TLR-1/TLR-2 ($p=0.057$), TLR-2/TLR-6 ($p=0.071$), TLR-2 ($p=0.055$) and TLR-4 ($p=0.459$) between the trimesters (Figure 10). There were also no differences in the percentage of cells that expressed TLR-1/TLR-2 ($p=0.169$), TLR-2/TLR-6 ($p=0.460$), TLR-2 ($p=0.271$) and TLR-4 (0.229) between preterm and term pregnancies (Figure 11).

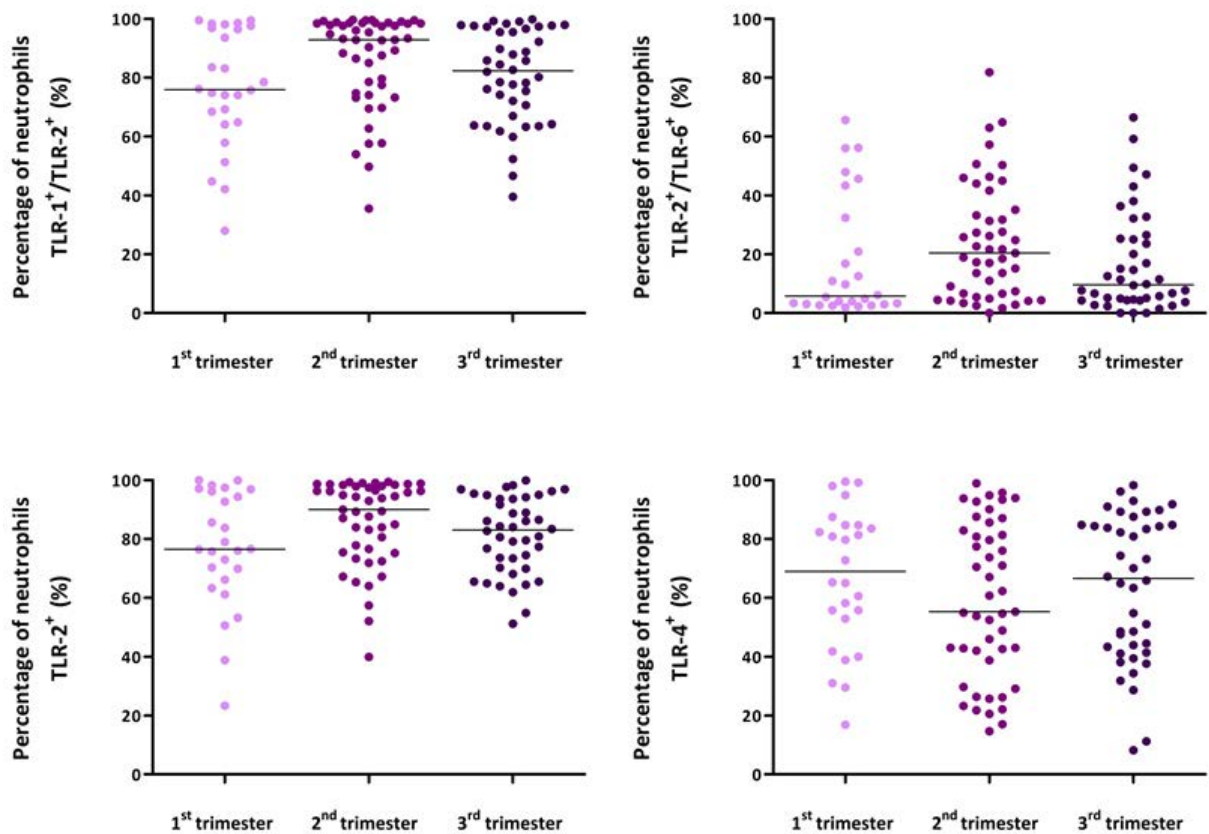


Figure 10. Median fluorescence intensity of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and TLR-6 in PMNs from peripheral blood of normal pregnancies. Kruskal-Wallis test. TLR: Toll-like receptor.

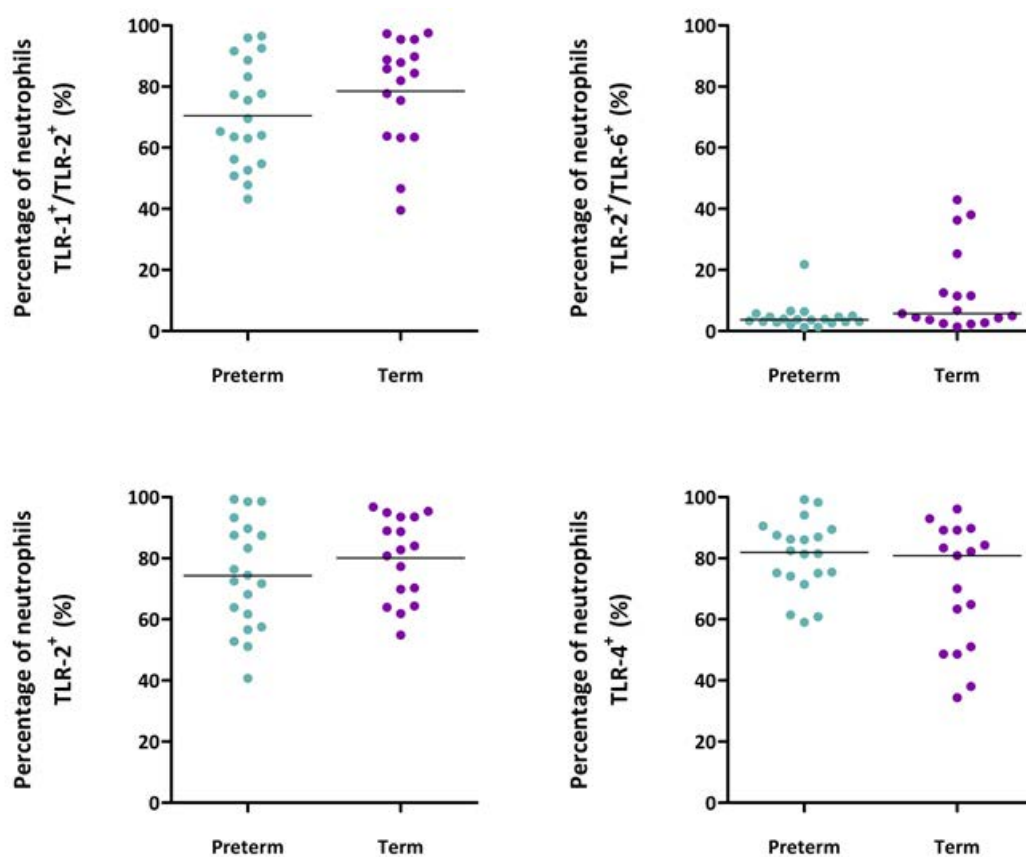


Figure 11. Percentage of TLR-1⁺/TLR-2⁺, TLR-2⁺/TLR-6, TLR-2 and TLR-4 in PMNs from peripheral blood of preterm and term pregnancies. Mann-Whitney test. TLR: Toll-like receptor.

Median fluorescence intensity of TLRs in PMNs

There were no statistically significant differences in the median fluorescence intensity of TLR-1 ($p=0.117$), TLR-2 ($p=0.439$), TLR-4 ($p=0.096$) and TLR-6 ($p=0.672$) between the trimesters (Figure 12). There were also no differences in the median fluorescence intensity of TLR-1 ($p=0.179$), TLR-2 ($p=0.648$), TLR-4 ($p=0.867$) and TLR-6 ($p=0.110$) between preterm and term pregnancies (Figure 13).

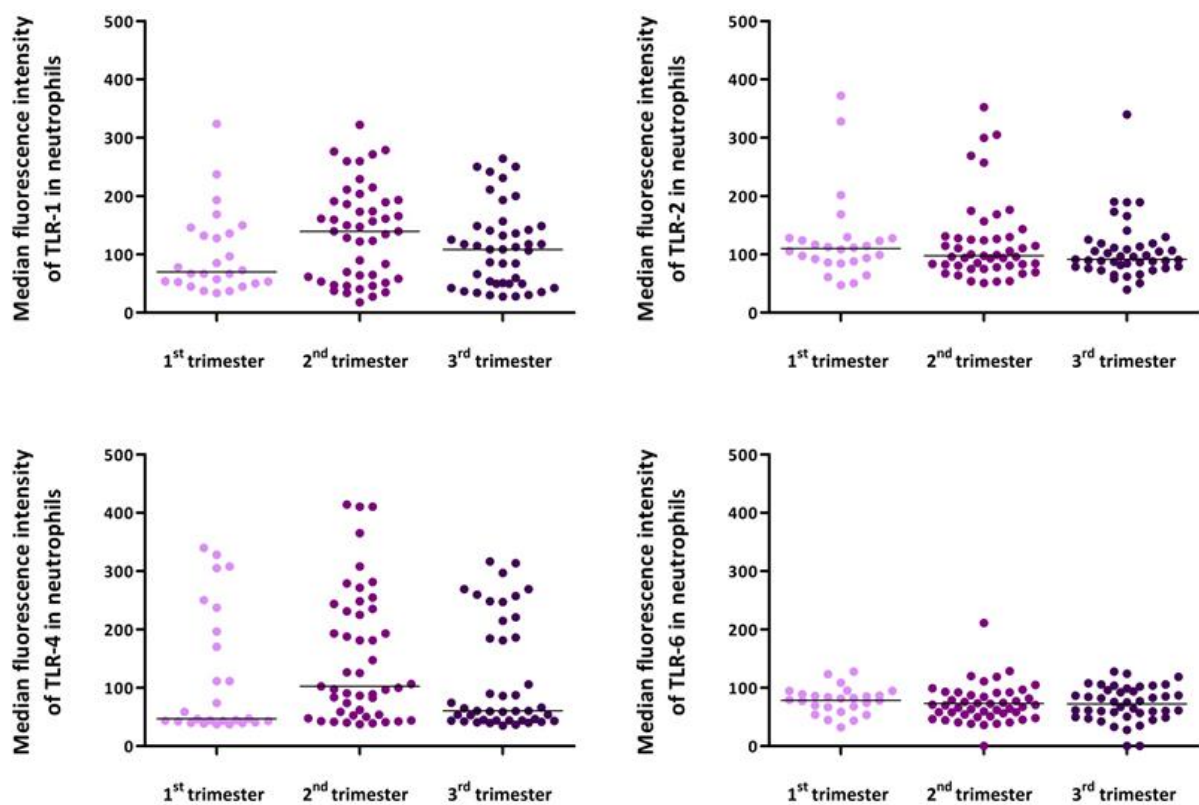


Figure 12. Median fluorescence intensity of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and TLR-6 in PMNs from peripheral blood of normal pregnancies. Kruskal-Wallis test. TLR: Toll-like receptor.

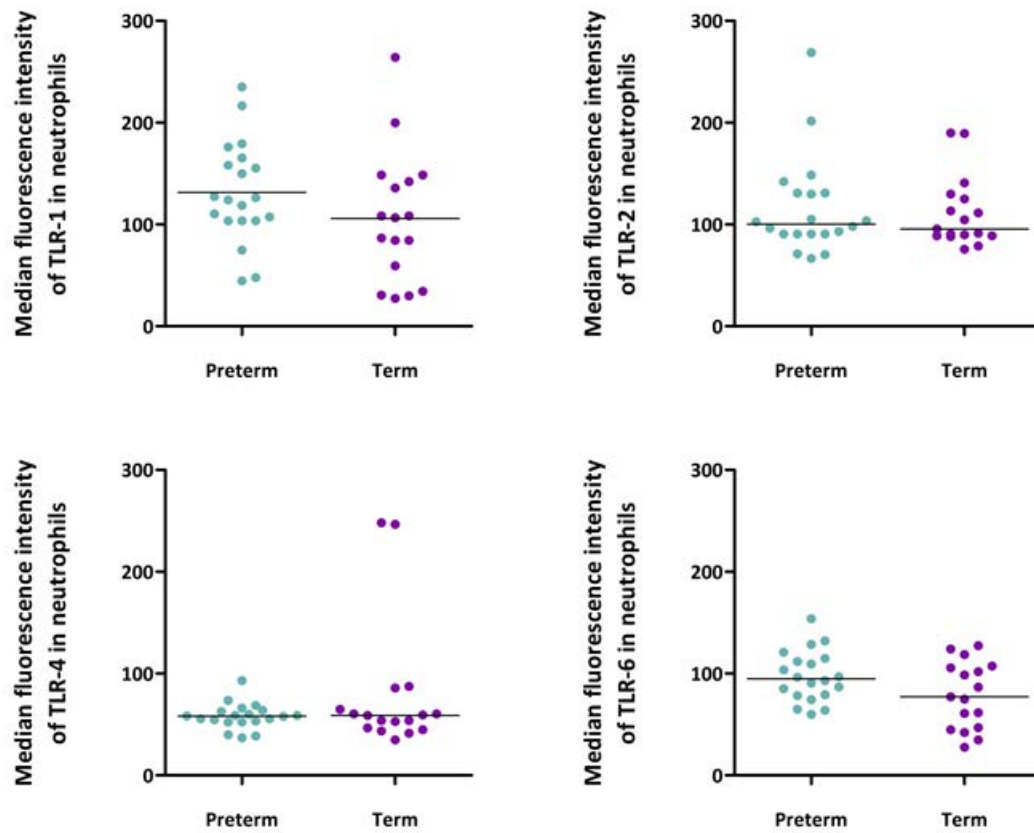


Figure 13. Median fluorescence intensity of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and TLR-6 in PMNs from peripheral blood of preterm and term pregnancies. Mann-Whitney test. TLR: Toll-like receptor.

Discussion

Given the importance of prematurity in maternal-fetal health, a great deal of research has been conducted to understand the mechanisms and the risk factors that are involved in this gestational complication. Since the pro-inflammatory cascade triggered after activation of TLRs in the interface is associated with the early activation of the parturition pathway^{16,42,54,55}, our study sought to assess the expression patterns of these receptors in maternal blood cells.

Our initial aim was to evaluate the gene and protein expression patterns of TLR-1, TLR-2, TLR-4 and TLR-6 throughout normal pregnancy. The results demonstrated that maternal PBMCs and PMNs express TLR-1, TLR-2, TLR-4 and TLR-6, but gene and protein expression did not differ significantly over the course of gestation. These findings corroborate the conclusions of Nitsche et al.⁵⁶, who, using a smaller sample and the same technique, investigated TLR-2 and TLR-4 gene expression in neutrophils and showed no significant trends over time across the gestational age. We suggest that it is not possible to detect temporal differences in the expression of these receptors because they might be upregulated in maternal circulation during pregnancy. The physiological events of normal pregnancy, such as implantation, placentation and trophoblastic replacement of the endothelium and vascular smooth muscle of the maternal blood vessels, generate an inflammatory environment with the presence of invading, dying and repairing cells⁵⁷⁻⁵⁹. In this scenario of tissue injury, a release of DAMPs occurs from tissue and immune cells^{36,37}. Recognition of DAMPs by TLRs has multiple effects in neutrophils, including cytokine production, generation of reactive oxygen species and phagocytosis^{35,49,60} and all these activities are important for the success of pregnancy. Thus, the possible up regulation of TLRs in the maternal circulation, even in the absence of infection, might be explained by the presence of DAMPs in normal pregnancy.

The second and main purpose of this study was to compare gene and protein expressions of these TLRs in maternal PBMCs and PMNs between preterm and term pregnancies. Our results show an upregulation of mRNA of TLR-1, TLR-2 and TLR-4 in PMNs during preterm labor, however there were no differences in the protein expression of these TLRs. On the other hand, we did not observed

an upregulation of gene and protein expression of TLRs in PBMCs in preterm pregnancies. This result does not corroborate the findings of Pawelczyk et al.⁶¹, who reported a higher percentage of TLR-4 in monocytes from preterm pregnancies. Despite using the same methodology, our study included all the peripheral blood mononuclear cells and Pawelczyk et al.⁶¹ analyzed only the population of monocytes.

The lack of correspondence between gene and protein results in our study can be explained by the absence of total correlation between mRNA and protein concentrations in mammalian cells. Vogel & Morcotte⁶² published a recent literature review in which they demonstrate that the cellular concentrations of proteins correlate with the abundance of their corresponding mRNA in approximately 40% of cases. Regulatory processes such as post-transcriptional, translational and protein degradation regulation have an important role in controlling steady-state protein abundances⁶².

Taken together, our results suggest that the expression of TLRs in maternal PBMCs and PMNs does not appear to be regulated temporally over the course of normal pregnancy. Thus, the higher expression of TLR-1, TLR-2 and TLR-4 in PMNs in the preterm pregnancies cannot be explained by the gestation age, though it might be associated with the presence of infection/inflammation of the amniotic cavity.

It is currently postulated that intra-amniotic infection is a major environmental factor leading to preterm delivery. PAMPs of microorganisms are recognized by TLRs and the activation of these receptors triggers an inflammatory cascade, resulting in the production and release of cytokines and prostaglandin by the maternal-fetal tissues^{35,63,64}. It is believed that this is the direct mechanism by which intra-amniotic infection causes preterm delivery. According to Menon et al.⁶⁵, despite the similarity between the etiologies of PTL and PPROM, the chronic oxidative stress in response to sustained exposure risk factors, such as infection, cigarette smoking, high body mass index and psychosocial stress, might be an inductor of premature senescence of fetal membranes and,

consequently, a cause of PPROM. On the other hand, PTL might result from acute oxidative stress, in which prolonged damage to the structure of membranes does not occur⁶⁵.

Numerous studies have demonstrated a regulation of TLR expression at the maternal-fetal interface in preterm pregnancies in the presence of infection^{45,46,66-70}. Kumazaki et al.⁴⁶ showed a higher TLR-4 immunoreactivity in preterm placentas with chorioamnionitis, compared with preterm placentas without this condition. Kim et al.⁴⁷ observed that preterm delivery in the presence of histologic chorioamnionitis is associated with increased expression of TLR-2 and TLR-4 in the amniochorion membranes. Similarly, in a previous study, we showed that increased gene expression of TLR-1 and TLR-2 is related to the presence of histologic chorioamnionitis in preterm pregnancies⁴⁵. Moreover, women with PPROM and microbial invasion of the amniotic cavity presented higher levels of soluble TLR (sTLR)-1, sTLR-2, sTLR-4 and sTLR-6 in the amniotic fluid^{66,67}.

One limitation of this study is in regard to the constitution of the term group. All pregnant women included in the term group were enrolled in the study during regular prenatal care and they were not in labor, in contrast with the preterm women. The influence of the process of labor in the regulation of TLR expression in maternal neutrophils requires further investigation.

Despite knowledge concerning the relationship between infections and prematurity, it is difficult to clinically diagnose an intrauterine infection. Studies show that most women with inflammatory infiltrate at the maternal-fetal interface do not demonstrate any signs of systemic inflammation, such as fever and an elevated white blood cell count^{23,71,72}. This lack of a direct relationship between colonization of the amniotic cavity and signs of infection can complicate the diagnosis of women at high risk of preterm labor and delay the initiation of appropriate interventions. Thus, there is a pressing need to describe molecular biomarkers that could be useful as predictors of early activation of the labor pathway.

In conclusion, our results suggest that TLR expression in maternal PBMCs and PMNs is not regulated temporally over the course of normal pregnancy. Moreover, the evaluation of gene and

protein expression of TLRs in neutrophils and PBMCs from peripheral maternal blood is not useful as molecular biomarkers of preterm labor.

Acknowledgments: This study was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP), which provided grants 2013/12624-9 and 2011/14195-2.

References

1. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S: The role of inflammation in preterm birth. *Semin Reprod Med* 2007;25:21-39.
2. Hsu P, Nanan Rk: Innate and adaptive immune interactions at the fetal-maternal interface in healthy human pregnancy and pre-eclampsia. *Front Immunol* 2014;5:125.
3. Aagaard-Tillery KM, Silver R, Dalton J: Immunology of normal pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11(5):279-295.
4. Kanellopoulos-Langevin C, Caucheteux SM, Verbeke P, Ojcius DM: Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the feto-maternal interface. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:121.
5. Gaunt G, Ramin K: Immunological tolerance of the human fetus. *Am J Perinatol* 2001;18(6):299-312.
6. Lee SK, Kim JY, Lee M, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J: Th17 and regulatory T cells in women with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2012;67(4):311-318.
7. Pratap S, Brown LE, Izban MG, Nowicki S, Nowicki BJ: Accurate preterm labor diagnosis using a CD55-TLR4 combination biomarker model. *J Biomed Sci Eng* 2013;6:253-257.
8. Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, Fanaroff AA, Hintz SR, Vohr B, Higgins RD: Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA* 2004;292(19):2357-2365.
9. Rosenbaum P, Paneth N, Leviton A, Goldstein M, Bax M, Damiano D, Dan B, Jacobsson B: A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. *Dev Med Child Neurol Suppl* 2007;109:8-14.
10. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R: Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008;371(9606):75-84.
11. Liew G, Wang JJ, Mitchell P: Preterm birth, long-term survival, and fertility. *JAMA* 2008;300(2):167, author reply 167-168.
12. Pretorius C, Jagatt A, Lamont RF: The relationship between periodontal disease, bacterial vaginosis, and preterm birth. *J Perinat Med* 2007;35(2):93-99.

13. Mysorekar IU, Cao B: Microbiome in parturition and preterm birth. *Semin Reprod Med* 2014;32(1):50-55.
14. Martin JA, Hamilton BE, Ventura SJ, Osterman MJ, Mathews TJ: Births: final data for 2011. *Natl Vital Stat Rep* 2013;62(1):1-69.
15. Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH, Rubens C, Menon R, Van Look PF: The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ* 2010;88(1):31-38.
16. Patni S, Flynn P, Wynen LP, Seager AL, Morgan G, White JO, Thornton CA: An Introduction to Toll-Like Receptors and their possible role in the initiation of labour. *BJOG* 2007;114(11):1326-1334.
17. Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S: Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-Like receptors. *J Intern Med* 2007;261(6):511-528.
18. Carpenter S, O'Neill LAJ: How important are Toll-Like receptors for antimicrobial responses? *Cell Microbiol* 2007;9(8):1891-1901.
19. Brodsky I, Medzhitov R: Two modes of ligand recognition by TLRs. *Cell* 2007;130(6):979-981.
20. DiGiulio DB, Gervasi MT, Romero R, Vaisbuch E, Mazaki-Tovi S, Kusanovic JP, Seok KS, Gómez R, Mittal P, Gotsch F, Chaiworapongsa T, Oyarzún E, Kim CJ, Relman DA: Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One* 2008;3(8):e3056.
21. Nguyen DP, Gerber S, Hohlfeld P, Sandrine G, Witkin SS: *Mycoplasma hominis* in mid-trimester amniotic fluid: relation to pregnancy outcome. *J Perinat Med* 2004;32(4):323-326.
22. Perni SC, Vardhana S, Korneeva I, Tuttle SL, Paraskevas LR, Chasen ST, Kalish RB, Witkin SS: *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in midtrimester amniotic fluid: association with amniotic fluid cytokine levels and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191(4):1382-1386.
23. Yoon BH, Romero R, Lim JH, Shim SS, Hong JS, Shim JY, Jun JK: The clinical significance of detecting *Ureaplasma urealyticum* by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189(4):919-924.
24. Gibbs RS, Romero R, Hillier SL, Eschenbach DA, Sweet RL: A review of premature birth and subclinical infection. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166(5):1515-1528.

25. Romero R, Sirtori M, Oyarzun E, Avila C, Mazor M, Callahan R, Sabo V, Athanassiadis AP, Hobbins JC: Infection and labor. V. Prevalence, microbiology, and clinical significance of intraamniotic infection in women with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161(3):817-824.
26. Romero R, Espinoza J, Rogers WT, Moser A, Nien JK, Kusanovic JP, Gotsch F, Erez O, Gomez R, Edwin S, Hassan SS: Proteomic analysis of amniotic fluid to identify women with preterm labor and intraamniotic inflammation/infection: the use of a novel computational method to analyze mass spectrometric profiling. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008;21(6):367-388.
27. Schieve LA, Handler A, Hershow R, Persky V, Davis F: Urinary tract infection during pregnancy: its association with maternal morbidity and perinatal outcome. *Am J Public Health* 1994;84(3):405-410.
28. Amirchaghmaghi E, Taghavi SA, Shapouri F, Saeidi S, Rezaei A, Aflatoonian R: The Role of Toll-Like receptors in pregnancy. *Int J Fertil Steril* 2013;7(3):147-154.
29. Kawai T, Akira S: The Roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 2009;21(4):317-337.
30. Kawai T, Akira S: TLR Signaling. *Cell Death Differ* 2006;13(5):816-825.
31. Medzhitov R, Janeway CA: Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002;296(5566):298-300.
32. Kumar H, Kawai T, Akira S: Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011;30(1):16-34.
33. Kawai T, Akira S: The Role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-Like receptors. *Nat Immunol* 2010;11(5):373-384.
34. Janeway CA, Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20(2):197-216.
35. Kawasaki T, Kawai T: Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 2014;5:461.
36. Piccinini AM, Midwood KS: DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm* 2010;2010.pii:672395.
37. Qian C, Cao X: Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 2013;1283:67-74.

38. Reuven EM, Fink A, Shai Y: Regulation of innate immune responses by transmembrane interactions: lessons from the TLR family. *Biochim Biophys Acta* 2014;1838(6):1586-1593.
39. Kang JY, Lee J-O: Structural biology of the Toll-Like receptor family. *Annu Rev Biochem* 2011;80:917-941.
40. Akira S: Mammalian Toll-Like receptors. *Curr Opin Immunol* 2003;15(1):5-11.
41. Lee Y, Allport V, Sykes A, Lindstrom T, Slater D, Bennett P: The effects of labour and of interleukin 1 beta upon the expression of nuclear factor kappa B related proteins in human amnion. *Mol Hum Reprod* 2003;9:213e8.
42. Thaxton JE, Nevers TA, Sharma S: TLR-mediated preterm birth in response to pathogenic agents. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2010;2010.pii:378472.
43. Patel FA, Challis JR: Prostaglandins and uterine activity. *Front Horm Res* 2001;27:31e56.
44. Phillippe M, Elovitz M, Saunders T: Thrombin-stimulated uterine contractions in the pregnant and nonpregnant rat. *J Soc Gynecol Invest* 2001;8:260e5.
45. Moço NP, Martin LF, Pereira AC, Polettini J, Peraçoli JC, Coelho KI, da Silva MG: Gene expression and protein localization of TLR-1, -2, -4 and -6 in amniochorion membranes of pregnancies complicated by histologic chorioamnionitis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;171(1):12-17.
46. Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y: Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. *Hum Pathol* 2004;35:47-54.
47. Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, Kim GJ, Kim MR, Kuivaniemi H, Tromp G, Espinoza J, Bujold E, Abrahams VM, Mor G: Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191(4):1346-1355.
48. Rindsjö E, Holmlund U, Sverremark-Ekström E, Papadogiannakis N, Scheynius A: Toll-like receptor -2 expression in normal and pathologic human placenta. *Hum Pathol* 2007; 38:468-473.
49. Prince LR, Whyte MK, Sabroe I, Parker LC: The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr Opin Pharmacol* 2011;11(4):397-403.

50. Zarembek KA, Godowski PJ: Tissue Expression of human Toll-Like receptors and differential regulation of Toll-Like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 2002;168(2):554-561.
51. Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MK, Dower SK: Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol* 2002;168(9):4701-4710.
52. Salomao R, Brunialti MK, Gomes NE, Mendes ME, Diaz RS, Komninakis S, Machado FR, da Silva ID, Rigato O: Toll-like receptor pathway signaling is differently regulated in neutrophils and peripheral mononuclear cells of patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Crit Care Med* 2009;37(1):132-139.
53. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001;25(4):402-408.
54. Agrawal V, Hirsch E: Intrauterine infection and preterm labor. *Semin Fetal Neonatal Med* 2012;17(1):12-19.
55. Christiaens I, Zaragoza DB, Guilbert L, Robertson SA, Mitchell BF, Olson DM: Inflammatory processes in preterm and term parturition. *J Reprod Immunol* 2008;79(1):50-57.
56. Nitsche JF, Jiang S-W, Brost BC: Toll-Like receptor-2 and Toll-Like receptor-4 expression on maternal neutrophils during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010;64(6):427-434.
57. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S: Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1221:80-87.
58. Munoz-Suano A, Hamilton AB, Betz AG: Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol Rev* 2011;241(1):20-38.
59. Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Mor G: Inflammation and Implantation. *Am J Reprod Immunol* 2010;63(1):17-21.
60. Hayashi F, Means TK, Luster AD: Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003;102:2660-2669.

61. Pawelczyk E, Nowicki BJ, Izban MG, Pratap S, Sashti NA, Sanderson M, Nowicki S: Spontaneous preterm labor is associated with an increase in the proinflammatory signal transducer TLR4 receptor on maternal blood monocytes. *BMC Pregnancy Childbirth* 2010;10:66.
62. Vogel C, Marcotte EM: Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 2012;13(4):227-232.
63. Challis JRG: Mechanism of parturition and preterm labor. *Obstet Gynecol Surv* 2000;55:650-660.
64. Gomez R, Ghezzi F, Romero R, Muñoz H, Tolosa JE, Rojas I: Premature labor and intra-amniotic infection. Clinical aspects and role of the cytokines in the diagnosis and pathophysiology. *Clin Perinatol* 1995;22:281-342.
65. Menon R, Boldogh I, Hawkins HK, Woodson M, Polettini J, Syed TA, Fortunato SJ, Saade GR, Papaconstantinou J, Taylor RN: Histological evidence of oxidative stress and premature senescence in preterm premature rupture of the human fetal membranes recapitulated in vitro. *Am J Pathol* 2014;184(6):1740-1751.
66. Kacerovsky M, Andrys C, Drahosova M, Musilova I, Hornychova H, Lesko D, Tosner J, Jacobsson B: Soluble Toll-like receptor 1 family members in the amniotic fluid of women with preterm prelabor rupture of the membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25(9):1699-1704.
67. Kacerovsky M, Andrys C, Hornychova H, Pliskova L, Lancz K, Musilova I, Drahosova M, Bolehovska R, Tambor V, Jacobsson B: Amniotic fluid soluble Toll-like receptor 4 in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of the membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25(7):1148-1155.
68. Andrys C, Kacerovsky M, Drahosova M, Musilova I, Pliskova L, Hornychova H, Prochazka M, Jacobsson B: Amniotic fluid soluble Toll-like receptor 2 in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013;26(5):520-527.
69. Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, Kim GJ, Kim MR, Kuivaniemi H, Tromp G, Espinoza J, Bujold E, Abrahams VM, Mor G: Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191(4):1346-1355.

70. Marconi C, Ramos BRA, Peraçoli JC, Donders GG, Silva MG: Amniotic fluid interleukin-1 beta and interleukin-6, but not interleukin-8 correlate with microbial invasion of the amniotic cavity in preterm labor. *Am J Reprod Immunol* 2011;65:549-556.
71. Guzik DS, Winn K: The association of chorioamnionitis with preterm delivery. *ObstetGynecol* 1985;65(1):11-16.
72. van Hoven KH, Anyaegbunam A, Hochster H, Whitty JE, Distant J, Crawford C, Factor SM: Clinical significance of increasing histologic severity of acute inflammation in the fetal membranes and umbilical cord. *Pediatr Pathol Lab Med* 1996;16(5):731-744.

Conclusão

A análise da expressão de receptores *Toll*-like em tecidos gestacionais vem sendo investigada há anos na literatura mundial, porém a abordagem mais sistêmica dessa análise, através da investigação da expressão desses receptores em células do sangue periférico materno, é mais recente e ainda conta com poucos estudos, principalmente no que se refere às complicações gestacionais como a prematuridade. Tendo em vista a importância da imunidade inata e dos TLRs no sucesso da gestação e a escassez de dados consistentes acerca da expressão de TLRs em células mononucleares do sangue periférico e em neutrófilos maternos, a realização de estudos como este se torna de grande importância no cenário dos resultados gestacionais adversos e saúde materno-fetal.

Considerando a população incluída e as metodologias empregadas no presente estudo, nossos resultados demonstram que as expressões de TLR-1, TLR-2, TLR-4 e TLR-6 em células mononucleares e em neutrófilos maternos não se alteram significativamente no decorrer da gestação normal. Além disso, a análise conjunta dos resultados de expressão gênica e proteica nos permite concluir que a expressão de TLRs em células do sangue periférico materno não é um parâmetro útil como biomarcador molecular para risco elevado de parto pré-termo.

Estudos futuros com intuito de caracterizar possíveis biomarcadores moleculares de fácil acesso e que sejam úteis na identificação precoce do trabalho de parto pré-termo tornam-se extremamente necessários no cenário atual, no qual apesar de todos os esforços empreendidos por pesquisadores e clínicos, a incidência de prematuridade não vem diminuindo e os nascimentos prematuros permanecem como principal causa de morbimortalidade neonatal.

Anexos



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Distrito de Rubião Júnior, s/nº - Caixa Postal 564 - CEP 18.618-000 - Botucatu - SP - Brasil
(014) 3811-6238 - Ramais 6146/6042/6238 - Fax (014) 3815-2348

FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos você para participar da pesquisa "Expressão de receptores Toll-like-2 e Toll-like-4 em neutrófilos maternos de gestações normais e complicadas por rotura prematura de membranas pré-termo e trabalho de parto prematuro" que tem por objetivo avaliar a expressão de algumas proteínas no sangue materno durante a gestação. Esta pesquisa é de responsabilidade da pós-graduanda Natália Prearo Moço, com a orientação da Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu e participação do Prof. Titular José Carlos Peraçoli do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Para participação nesse estudo será coletado 10 mL de sangue materno e, no momento do parto, após retirada da placenta, esta será coletada para análise. O desconforto da coleta de sangue fica restrito ao desconforto da picada da agulha com possível formação de uma pequena área roxa que desaparece em poucos dias. Após retirada do fragmento da placenta necessário para a pesquisa, o restante da placenta será encaminhada para incineração, conforme rotina do hospital.

Pelo presente instrumento, eu _____

devidamente esclarecida, ciente da autorização a mim solicitada, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, e ciente, também, de que as informações serão utilizadas exclusivamente pelos pesquisadores, que manterão sigilo sobre minha identidade, e que os mesmos estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas e de que posso retirar este consentimento a qualquer hora sem prejuízo do meu atendimento neste serviço, firmo meu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**, concordando em participar da pesquisa proposta. Estou ciente também que este estudo não trará benefício imediato para minha gestação e que não receberei nenhum benefício financeiro pela participação no estudo. Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3811-6143.

Esse instrumento será elaborado em 2 vias, uma para o paciente e outra para o pesquisador.

Botucatu, _____ de _____ de 20____

Assinatura da paciente

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

Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva
Rua Izidoro Bertaglia, 746
Jardim Paraíso, Botucatu, 18610-140
Fone (14) 38152417



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 06 de Dezembro de 2010.

Of. 574/10-CEP

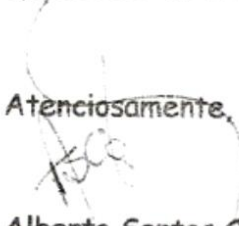
Ilustríssima Senhora
Profª Drª Márcia Guimarães da Silva
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Drª. Márcia,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa (**Protocolo CEP 3752-2010**) Expressão de receptores Toll-like-2 e Toll-like-4 em neutrófilos maternos de gestações normais e complicadas por rotura prematura de membranas pré-termo e trabalho de parto prematuro, a ser conduzido por Natália Prearo Moço, orientado por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável aprovado em reunião de 06 de dezembro de 2.010.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP



Prefeitura de
BOTUCATU
Secretaria de
S a ú d e

Comissão de Ética em Pesquisa
Fls. nº 38

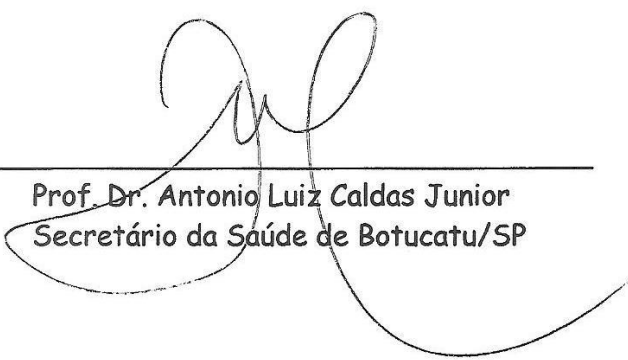
DECLARAÇÃO

DECLARO que tenho **CIÊNCIA E AUTORIZO**, o desenvolvimento do Projeto de Pesquisa "Expressão de receptores Toll-like-2 e Toll-like-4 em neutrófilos maternos de gestações normais e complicadas por rotura prematura de membranas pré-termo e trabalho de parto prematuro". A pesquisa será conduzida pela aluna Natália Prearo Moço e orientada pela Prof^a. Dr^a. Márcia Guimarães da Silva junto a esta entidade.

Declaro que conheço, cumprirei e farei cumprir os Requisitos da Resolução 196/96 e suas complementares e como esta Instituição tem condições para o desenvolvimento deste Projeto, autorizo a execução.

Por ser verdade, firmamos a presente em

06/11/2010.



Prof. Dr. Antonio Luiz Caldas Junior
Secretário da Saúde de Botucatu/SP