

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DE IL-4 e IL-
10 EM MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS DE
GESTANTES COM ROTURA PREMATURA DE
MEMBRANAS PRÉ-TERMO**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. MÁRCIA GUIMARÃES DA SILVA
CO-ORIENTADOR: PROF. ADJUNTO JOSÉ CARLOS PERAÇOLI**

Ana Carolina Pereira

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

**BOTUCATU - SP
2008**

Sumário

Capítulo I

Revisão de literatura.....	02
Referências bibliográficas.....	14

Capítulo II - Manuscrito

Resumo.....	24
Abstract.....	26
1. Introdução.....	28
2. Material e Métodos.....	31
2.1. Casuística	31
2.2. Colheita de membranas corioamnióticas e análise histopatológica.....	32
2.3. Detecção de citocinas por PCR em tempo real.....	33
2.3.1. Extração de RNA.....	33
2.3.2. Obtenção de cDNA.....	34
2.3.3. PCR em tempo real.....	35
2.4. Análise estatística.....	36
3. Resultados	37
3.1 Incidência de rotura prematura de membranas e trabalho de parto prematuro.....	37
3.2. Características das pacientes.....	37
3.3. Análise histopatológica das membranas corioamnióticas.....	40
3.4. Quantificação relativa da expressão das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL- 10...	42
3.4.1. Determinação da curva padrão na PCR em tempo real para o gene da β -actina.....	42
3.4.2. Determinação da curva padrão na PCR em tempo real para os genes da IL- 4 e IL-10.....	43
3.4.3. Quantificação relativa de RNAm de IL-4 nas membranas corioamnióticas...	44
3.4.4. Quantificação relativa de RNAm de IL-10 nas membranas corioamnióticas..	45
3.4.5. Quantificação relativa de RNAm de IL- 4 e IL-10 nas membranas corioamnióticas em relação à presença da corioamnionite.....	47
4. Discussão.....	49
5. Referências Bibliográficas.....	53
6. Anexos.....	58

A rotura espontânea das membranas ovulares ou amniorrexe é um acontecimento normal durante o trabalho de parto, ocorrendo rotineiramente após o início do mesmo. Quando precede o início do trabalho de parto é intitulada de rotura prematura de membranas (RPM). Sua ocorrência em idade gestacional inferior a 37 semanas recebe a denominação de rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT)^{1,2}.

A incidência de RPM ocorre em cerca de 9,0% das gestações³ variando de 2%⁴ a 4,6%⁵ das gestações pré-termo.

Essa intercorrência está associada com aumento da morbidade materna e da morbimortalidade perinatal^{2,6-8}. O maior risco materno é a infecção, que pode apresentar-se desde a forma de processo localizado como a endometrite ou a endomiometrite puerperal até à sepse. Os riscos fetais estão relacionados à idade gestacional em que o acidente ocorre, aumentando a prematuridade e a infecção fetal e neonatal².

Os fatores de risco associados à RPM podem ser classificados em passíveis e não passíveis de prevenção. Entre os passíveis de prevenção destacam-se: infecções cérvico-vaginais como vaginose bacteriana⁹ e infecção clamidiana¹⁰ assim como infecções causadas por *Mycoplasma hominis*¹¹, *Ureaplasma urealyticum*¹¹ e *Streptococcus agalactiae*¹¹; tabagismo, sugerido por alguns estudos¹²⁻¹⁴ e não confirmado por outros¹⁵; toques vaginais repetidos e procedimentos diagnósticos pré-natais invasivos como amniocentese¹⁶. Dentre os fatores não passíveis de prevenção destacam-se o antecedente de parto prematuro,

sangramento vaginal durante a gestação, antecedente de procedimento cirúrgico cervical, patologia placentária e aumento acentuado do volume do útero causado por gemelaridade e polidrâmnio¹⁷.

A RPM acontece como um evento repentino e de difícil predição, sendo o ponto final de muitas vias bioquímicas e mecânicas ainda não completamente compreendidas. Em gestação de termo, na presença de colo uterino desfavorável para indução do parto, a RPM está associada com alta incidência de corioamnionite, cesárea, hemorragia pós-parto, endometriíte e infecção neonatal¹⁸. Quando a RPM acontece em gestação pré-termo predispõe às mesmas complicações que na gestação de termo, aumentando a incidência de prematuridade e, quando se torna prolongada, o feto corre riscos de malformações estruturais e de desenvolvimento inadequado^{19,20}.

Embora a patogênese da RPM não esteja completamente elucidada, a ascensão bacteriana, do trato genital inferior para a decídua e membranas corioamnióticas, parece ser o evento chave na etiologia da RPM assim como do parto prematuro^{21,22}.

Teoricamente, os microrganismos podem ter acesso às membranas ovulares e à cavidade amniótica pelas vias ascendente transcervical, hematogênica através da placenta, iatrogênica durante procedimentos invasivos ou oriunda da cavidade peritoneal por meio das tubas uterinas²³.

O conceito que a invasão microbiana da cavidade amniótica segue a via ascendente é apoiado pela observação de que, em geral, os microrganismos isolados do líquido amniótico de gestantes com RPM,

são similares aos encontrados no trato genital inferior²⁴. Sustentando este conceito, Galask *et al.*²⁵ descreveram que os microrganismos da microbiota vaginal apresentam capacidade de atingir as membranas corioamnióticas e infectar a cavidade amniótica, apresentando alguns desses microrganismos maior capacidade de invasão²⁶.

Entre os possíveis mecanismos envolvidos na RPM destacam-se os efeitos das proteases, secretadas pela flora cérvico-vaginal e pelo organismo materno, em resposta à corioamnionite. Os leucócitos que infiltram as membranas fetais, como parte da resposta inflamatória à corioamnionite, podem liberar elastase que, como a tripsina, degrada especificamente o colágeno tipo III, componente importante da estrutura das membranas²⁷.

É conhecido que alta porcentagem de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo apresentam corioamnionite e segundo Menon *et al.*²⁸ as membranas corioamnióticas são locais de produção de citocinas inflamatórias.

As citocinas são moléculas de proteínas de baixo peso molecular, secretadas pelos leucócitos e outras células do organismo em resposta a uma variedade de estímulos, atuando como mediadores das células do sistema imune. Desempenham papel importante em muitos mecanismos biológicos, incluindo os processos reprodutivos como ovulação, implantação, placentação e dilatação cervical. Durante a gestação o estroma decidual, assim como o sinciotrofoblasto, citotrofoblasto, cório e âmnio, são fontes adicionais de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias e essas citocinas participam na

indução da tolerância ao aloenxerto fetal, na regulação imune local contra agentes infecciosos e remodelamento tecidual durante a invasão trofoblástica^{29,30}.

As citocinas são consideradas moléculas-chave no processo de indução do trabalho de parto prematuro e de RPM, principalmente pela indução da síntese de prostaglandinas, potentes estimuladores da contratilidade do miométrio, desencadeando o trabalho de parto. Na presença de infecção da cavidade amniótica, as células inflamatórias que infiltram os tecidos maternos aumentam a produção das citocinas³¹. Dollner et al.³², empregando a técnica de imuno-histoquímica, demonstraram que na presença de corioamnionite intensa a concentração de citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL) 1 β , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) nos tecidos placentários foi mais elevada que na ausência do processo inflamatório.

Na presença de corioamnionite ou parto prematuro, o perfil de citocinas encontrado é o Th1³³. Do mesmo modo, nos casos de RPM as razões Th1/Th2 são maiores que em gestantes normais³⁴. Muitos estudos confirmam esses achados³⁵⁻³⁷, e ainda existem estudos que demonstram que essas citocinas são deletérias para a gestação, uma vez que em casos de abortos recorrentes elas foram encontradas em níveis elevados, principalmente o interferon (IFN- γ) e o TNF- α ^{38,39}.

Algumas condições que podem induzir o parto prematuro ou rotura prematura de membranas têm sido propostas, dentre elas a ação das citocinas inflamatórias⁴⁰. Essas citocinas são capazes de estimular o metabolismo do ácido araquidônico em tecidos reprodutivos

humanos⁴¹⁻⁴³ e através desse mecanismo, induzem a síntese de prostaglandinas, levando ao início do parto⁴⁴. Na presença de infecção da cavidade amniótica, as células inflamatórias que infiltram a decídua aumentam a produção de citocinas⁴⁵.

Muitos estudos na literatura mundial têm buscado validar a associação de citocinas e complicações gestacionais. A análise do padrão de citocinas, bem como seu valor preditivo positivo nas patologias gestacionais, têm sido realizados na tentativa dessas dosagens serem utilizadas como preditoras de complicações maternas e perinatais mesmo, antes que ocorram. Nesse cenário, a rotura prematura de membranas tem seu lugar de destaque já que é, sem dúvida, um dos mais difíceis problemas da Clínica Obstétrica. Assim, torna-se importante conhecer o papel que as citocinas inflamatórias desempenham na RPM-PT, na presença ou não de corioamnionite, assim como a ação de citocinas reguladoras nesse processo.

A IL-1 β é um produto de monócitos / macrófagos, que atua como estimulador para linfócitos e timócitos, sendo ainda secretada por células de Hofbauer da placenta⁴⁶. Desempenha papel central na regulação da resposta inflamatória em tecidos lesados, sendo produzida na infecção intra-uterina por células decíduais humanas em resposta a endotoxinas bacterianas^{45,47}. Em pacientes com corioamnionite clínica e histológica a IL-1 β é expressa em células inflamatórias do cório e decídua, tendo os macrófagos como sua principal fonte⁴⁸. Em parto prematuro com presença de infecção da cavidade amniótica, níveis de IL-1 β estão elevados, e na ausência, a concentração é inferior⁴⁵. IL-1 β

também está aumentada no parto quando há RPM e infecção amniótica⁴⁶, revelando sua participação no momento da resolução da gestação. A IL-1, agindo sinergicamente com TNF- α , induz produção de prostaglandina, conduzindo indiretamente ao parto⁴⁹. Esse efeito sinérgico também induz a produção de IL-6 pelo trofoblasto⁵⁰, potencializando a produção de prostaglandina, e conseqüentemente, aumentando as contrações uterinas.

A ação da IL-1 β nos casos de RPM pode estar relacionada à sua capacidade de induzir apoptose em membranas fetais. Fortunato & Menon⁴⁰ obtiveram indução da atividade de caspases após estimulação de membranas fetais com IL-1 β recombinante. A ativação da cascata das caspases é um dos mecanismos de iniciação do processo de apoptose nas células das membranas corioamnióticas.

A IL-6, a exemplo da IL-1 β , é secretada por vários tipos celulares, dentre elas células endometriais, deciduais e macrófagos. Sua concentração aumentada no soro materno tem sido considerada marcador para parto prematuro ou infecção da cavidade amniótica²⁷. Muitos estudos revelaram aumento dessa citocina em secreção cervical³⁷, circulação fetal ³⁸ e no líquido amniótico²⁸. Goffinet et al.⁵¹ verificaram que em gestantes com parto prematuro e membranas ovulares íntegras, a expressão aumentada de RNAm de IL-6 na secreção cervical estava associada à maior risco de infecção neonatal. Lockwood et al.⁵², determinando a concentração de IL-6 na secreção cervical de pacientes com parto prematuro, concluíram que os níveis aumentados dessa citocina, quantificados entre a 24^a e 36^a semanas de gestação,

estão relacionados com RPM, sendo que, em metade dos casos, níveis maiores que 250 pg/mL estão associados à RPM. Uma análise do líquido amniótico revelou que em casos de RPM e parto prematuro o aumento da concentração de IL-6 foi maior que nos casos de parto prematuro e bolsa íntegra, demonstrando que a própria RPM é capaz de induzir aumento de IL-6²⁸. Segundo Edwin et al.⁴² quase a totalidade dos casos de RPM com infecção da cavidade amniótica apresentaram elevados níveis de citocinas no líquido amniótico, e aproximadamente metade desses casos tiveram elevação dos níveis de citocinas no soro materno. Além disso, quando há associação de corioamnionite e RPM, a produção de IL-6 pelos tecidos placentários é elevada ^{37,42}.

De acordo com esses resultados, considera-se que a IL-6 desempenha papel fisiológico nos mecanismos do parto⁴⁰, sendo um deles a indução da síntese de prostaglandina na presença de infecção^{41,42}.

A IL-8 é uma citocina que induz quimiotaxia neutrofílica, tendo função importante no mecanismo de defesa do hospedeiro. É produzida pela placenta humana durante a gestação⁵³ e detectada no líquido amniótico, a partir do segundo trimestre da gestação normal⁵⁴. Níveis elevados de IL-8 são detectados no líquido amniótico, durante infecções por microrganismos presentes nos tecidos materno-fetais⁵⁵, havendo correlação entre a concentração dessa citocina e o número de neutrófilos presentes no líquido amniótico⁴⁵. Esses dados são confirmados por diversos outros estudos^{37,45,32}, considerando assim que a determinação de IL-8 no soro materno seja sensível para avaliar

presença de corioamnionite, comparado com métodos convencionais⁴⁵. Por outro lado, Witt et al.³⁷ não demonstraram aumento de IL-8 no soro materno na presença de corioamnionite, revelando que a resposta inflamatória parece afetar mais os compartimentos fetais. Assim, quando somente o soro materno for avaliado, os melhores parâmetros para detectar infecção são contagem de células brancas e a concentração de proteína C reativa. Segundo esses mesmos autores, existe relação positiva entre aumento de IL-8 no líquido amniótico e infecção por *Ureaplasma urealyticum*, e esse aumento não foi verificado em infecções por outros patógenos. Por outro lado, em trabalho recente, Marconi⁵⁶descreveu que níveis aumentados de IL-1 β e IL-6 estão associados à infecção polimicrobiana na cavidade amniótica em gestantes com parto prematuro, porém essa associação não foi verificada para IL-8 e TNF- α . Em outras patologias obstétricas, o comportamento da IL-8 também parece controverso. A concentração dessa citocina no soro materno durante o primeiro trimestre de gestação não foi diferente entre grupos de mulheres grávidas com e sem hiperemese⁵⁷. Por outro lado, níveis séricos aumentados de IL-8 foram encontrados em mulheres com gravidez ectópica comparadas à gestantes normais ⁵⁸.

O TNF- α tem sido detectado em várias células do compartimento materno-fetal, atuando como regulador da proliferação celular na unidade feto-placentária, já que o papel dessa citocina no aumento do mecanismo de apoptose está bem documentado^{59,60}. O TNF- α tem propriedades similares à IL-1 β , sendo secretado por macrófagos

ativados. A identificação de TNF- α na decidua humana e de seus receptores nas células placentárias, sugere que o TNF- α desempenha papel fundamental na rede de citocinas produzidas na gestação⁶¹. No líquido amniótico de gestantes com infecção intra-amniótica, os níveis dessa citocina encontram-se mais elevados do que em gestantes sem infecção⁶².

Para Silva⁶³ a análise de citocinas inflamatórias demonstrou níveis elevados de IL-6 no soro das gestantes com RPM-PT, enquanto no líquido amniótico, os níveis de IL-1 β , IL-6 e IL-8 estavam aumentados em gestantes com infiltrado inflamatório moderado e intenso nas membranas corioamnióticas.

Fortunato et al.⁶⁴ descreveram que lipopolissacarídeo (LPS) induz produção de TNF- α em membranas corioamnióticas. Porém, segundo estes mesmos autores, quando há associação de estímulo com LPS e imunorregulação com IL-10, ocorre diminuição dose-dependente da produção de RNAm de TNF- α .

Em trabalho recente, estudando gestantes com RPM-PT e em trabalho de parto prematuro e bolsa íntegra, Poletini⁵ descreveu que a concentração relativa de RNAm de IL-1 β , IL-6 e IL-8 não foi diferente nos grupos estudados. Ainda segundo esse autor não houve diferença na intensidade de RNAm das citocinas inflamatórias em relação à presença e intensidade da corioamnionite e que citocinas anti-inflamatórias, nas membranas corioamnióticas, poderiam estar regulando a expressão de RNAm de citocinas pró-inflamatórias.

A IL-10, importante citocina anti-inflamatória, é capaz de diminuir a produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 em macrófagos estimulados com LPS⁶⁵, ou pode ser inibida pela própria IL-10, uma vez que a secreção dessa citocina parece ser auto-limitada e sua síntese pode ocorrer relativamente mais tarde em relação às outras citocinas produzidas por macrófagos^{66,67}. Segundo Greig et al.⁶⁸ a IL-10 está presente no líquido amniótico da maioria das gestações, com concentrações mais altas no terceiro trimestre da gestação. Na presença de infecção intra-uterina há significativo aumento nas concentrações dessa citocina, sendo detectados níveis mais elevados do que nas gestações pré-termo. Porém, para outros autores não há associação entre parto prematuro e aumento das concentrações de IL-10^{69,70}. Raghupathy et al.³⁴ descreveram que níveis aumentados de IL-10 no sangue estão significativamente elevados na gestação normal quando comparadas às gestantes com RPM-PT. Para Fortunato et al.⁶⁴, na presença de LPS, a IL-10 regula negativamente a expressão de RNAm de IL-8, sugerindo que a produção de IL-8 nas membranas ovulares pode ser controlada por IL-10 durante o processo inflamatório.

Em primatas não humanos a administração intra-amniótica de IL-10 inibe a atividade uterina estimulada por IL-1 β ⁷¹ e em modelo murino com prematuridade induzida por inflamação, a administração intra-uterina de IL-10 previne o parto prematuro e a perda fetal⁷².

Segundo Modestin-Sorrentino et al.⁷³, a concentração de IL-10 na secreção cervical diminui enquanto os níveis de IL-8 aumentam com avanço gestacional, sugerindo que essa mudança contribua para o

início do trabalho de parto. Para Hanna et al.⁷⁴ a concentração de IL-10 está significativamente diminuída nos casos de parto prematuro associado com corioamnionite, assim como na placenta de gestante a termo quando comparadas com gestantes normais durante o segundo trimestre. A IL-10 ainda inibe a expressão da ciclooxygenase-2 nas culturas de placentas de gestantes em trabalho de parto prematuro, mas não nas gestantes em trabalho de parto a termo. A IL-10 tem um papel indefinido na gestação e no trabalho de parto prematuro complicado por infecção da cavidade amniótica⁶⁸.

A exemplo da IL-10, a IL-4 é uma citocina anti-inflamatória, produzida por células T ativadas, mastócitos e basófilos⁷⁵. É pleiotrópica⁷⁵, estimula o desenvolvimento e expansão das células Th2, inibe a ativação de macrófagos e estimula a troca de classe pelo isotipo IgE na célula B⁷⁶.

Segundo a literatura, níveis elevados de IL-4 foram detectados no líquido amniótico de gestantes com evidência clínica de infecção intra-amniótica⁷⁷. A IL-4 possui um comportamento paradoxal no tecido gestacional, pois inibe a produção de prostaglandina, sugerindo seu efeito anti-inflamatório⁷⁸. Entretanto, em células do âmnio, cório e decídua podem acentuar a produção de prostaglandina⁷⁹. Para Simhan et al.⁷⁵ a IL-4 reduz a produção de prostaglandina 2 pelas células deciduais *in vitro* em resposta ao LPS.

Em conjunto, a presença de citocinas pró e anti-inflamatórias produzidas nos tecidos gestacionais, sugere que mecanismos de imunidade, importantes na defesa contra infecções, estejam agindo na

interface materno-fetal. Muitas dessas citocinas estão envolvidas na indução da síntese de prostaglandina e/ou expressão do receptor para ocitocina. Assim, o estudo de citocinas com atividade anti-inflamatória ou reguladora nas membranas ovulares, poderá contribuir para melhor compreensão do papel das citocinas na rotura prematura de membranas pré-termo.

Referências Bibliográficas*

1. Lee T, Silver H. Etiology and epidemiology of preterm premature rupture of the membranes. Clin Perinatol 2001; 28: 721-34.
2. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. Obstet Gynecol 2003; 101: 178-93.
3. Silva MG, Peraçoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Peraçoli MTS. Cervical *Lactobacillus* and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. Int J Gynecol Obstet 2003; 81: 175-83.
4. Tanir HM, Sener T, Tekin N, Aksit A, Ardic N. Preterm premature rupture of membranes and neonatal outcome prior to 34 weeks of gestation. Int J Gynecol Obstet 2003; 82: 167-72.
5. J Polettini. Análise quantitativa da expressão de citocinas inflamatórias em membranas corioamnióticas de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo. [Dissertação]. Botucatu. Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, 2007.
6. Aagaard-Tillery KM, Nuthalapaty FS, Ramsey PS, Ramin KD. Preterm premature rupture of membranes: perspectives surrounding controversies in management. Am J Perinatol 2005; 22: 287-97.
7. Baud O, Fontaine RH, Olivier P, Maury L, EL Moussawi F, Bauvin I, et al. Premature rupture of membranes: pathophysiology of neurological impact. Arch Pediatr 2007; 1: 549-53.
8. Pristauz G, Bauer M, Mauer-Fellbaum U, Rotky-Fast C, Bader AA, Hass J, et al. Neonatal outcome and two-year follow-up after expectant management of second trimester rupture of membranes. Gynecol Obstet

2008; *in press*.

9. Karat C, Madhivanan P, Krupp K, Poornima S, Jayanthi NV, Suguna JS, et al. The clinical and microbiological correlates of premature rupture of membranes. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24: 283-5.
10. Blas MM, Canchihuaman FA, Alva IE, Hawes SE. Pregnancy outcome in woman infected with *Chlamydia trachomatis*: a population-based cohort study in Washington State. *Sex Transm Infect* 2007; 83: 314-8.
11. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Neonatol* 2006; 11: 317-26.
12. Miller HC, Jekel JF. Epidemiology of spontaneous premature rupture of membranes: factors in preterm births. *Yale J Biol Med* 1989; 62: 241-51.
13. Harger JH, Hsing AW, Tuomala RE, Gibbs RS, Mead PB, Eschenbach DA, et al. Risk factors for preterm premature rupture of fetal membranes: a multicenter case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 130-7.
14. Meyer M B, Tonascia JA. Maternal smoking, pregnancy complications, and perinatal mortality. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 128: 494-502.
15. Naye RL. Factors that predispose to premature rupture of the fetal membranes. *Obstet Gynecol* 1982; 60:93-8.
16. Soper DE, Mayhall CG, Dalton HP. Risk factors for intraamniotic infection: A prospective epidemiologic study. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 562-8.
17. Newton ER. Chorioamnionitis and intraamniotic infection. *Clin Obstet Gynecol* 1993; 36: 795-808.
18. Polzin WJ, Brady K. Mechanical factors in the etiology of premature rupture of the membranes. *Clin Obstet Gynecol* 1991; 34: 702-14.
19. Beydoun S, Yasin S. Premature rupture of membranes before 28 weeks: conservative management. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155: 471-9.
20. Garite TJ. Premature rupture of the membranes: the enigma of the obstetrician. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 151: 1001-5.
21. Sompolinsky D, Solomon S, Elkina L, Weinraub Z, Bukovsky I, Caspi E. Infections with *Mycoplasma* and bacteria in induced midtrimester abortion and fetal loss. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 121: 610-6.

*Referências bibliográficas elaboradas de acordo com o International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals. *Ann Intern Med* 1997; 126:36-47.

22. Üstün C, Kocak I, Baris S, Uzel A, Saltik F. Subclinical chorioamnionitis as an etiologic factor in preterm deliveries. *Int J Gynaecol Obstet* 2001; 72:109-15.
23. Benirschke K. Routes and types of infection in the fetus and the newborn. *Am J Dis Child* 1965; 28: 714-7.
24. Romero R, Hanaoka S, Mazor M, Athanassiadis P, Callahan R, Hsu YC, et al. Meconium-stained amniotic fluid: a risk factor for microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 859-62.
25. Galask RP, Varner MW, Petzold CR, Wilbur SL. Bacterial attachment to the chorioamniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148: 915-28.
26. Gyr TN, Malek A, Mathez-Loic F, Altermatt HJ, Bodmer T, Nicolaides K, et al. Permeation of human chorioamniotic membranes by *Escherichia coli* in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 223-7.
27. Allen SR. Epidemiology of premature rupture of the fetal membranes. *Clin Obstet Gynecol* 1991; 34: 685-91.
28. Menon R, Swan KF, Lyden TW, Rote NS, Fortunato S. Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1 β and interleukin-6) in amniochorionic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 493-500.
29. Bennett WA, Lagoo-Deenadayalan S, Stopple JA, Barber WH, Hale E, Brackin MN, et al. Cytokine expression by first-trimester human chorionic villi. *Am J Reprod Immunol* 1998; 40: 309-18.
30. Robertson SA, Seamark RF, Guilbert LJ, Wegmann TG. The role of cytokines in gestation. *Crit Rev Immunol* 1994; 14: 239-92.
31. Kauma SW, Johnson DE. The expression and localization of IL-1 β mRNA in chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 163: 1430-7.
32. Dollner H, Vatten L, Halgunset J, Rahimipoor S, Austgulen R. Histologic chorioamnionitis and umbilical serum levels of pro-inflammatory cytokines and cytokine inhibitors. *BJOG* 2002; 109: 534-9.
33. Wilczynski JR. Th1/Th2 cytokines balance – *yin* and *yang* of reproductive immunology. *Europ J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 122: 136-43.
34. Raghupathy R, Makhseed M, El-Shazly S, Azizieh F, Farhat R, Ashkanani L. Cytokine patterns in maternal blood after premature rupture of

- membranes. *Obstet Gynecol* 2001; 98: 122-6.
35. Murtha AP, Greig PC, Jimmerson CE, Herbert WNP. Maternal serum interleukin-6 concentration as a marker for impending preterm delivery. *Obstet Gynecol* 1998; 91: 161-4.
 36. Fukuda H, Masuzaki H, Ishimaru T. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in amniotic fluid and cord blood in patients with preterm premature rupture of the membranes. *Int J Gynecol Obstet* 2002; 77: 123-9.
 37. Witt A, Berger A, Gruber CJ, Petricevic L, Apfalter P, Husslein P. IL-8 concentrations in maternal serum, amniotic fluid and cord blood in relation to different pathogens within the amniotic cavity. *J Perinat Med* 2005; 33: 22-6.
 38. Daher S, Denardi KAG, Blotta MHSL, Mamoni RL, Reck APM, Camano L, et al. Cytokines in recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2004; 62: 151-7.
 39. Gücer F, Balkanli-Kaplan P, Yüksel M, Sayin NC, Yüce MA, Yardim T. Maternal serum levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-2 receptor in threatened abortion: a comparison with normal and pathologic pregnancies. *Fertil Steril* 2001; 76: 707-9.
 40. Fortunato SJ, Menon R. IL-1 β is a better inducer of apoptosis in human fetal membranes than IL-6. *Placenta* 2003; 24: 922-8.
 41. Mitchell MD, Dudley DJ, Edwin SS, Lundin-Schiller S. Interleukin-6 stimulates prostaglandin production by human amnion and decidua cells. *Eur J Pharmacol* 1991; 192: 189-91.
 42. Edwin SS, LaMarche SL, Thai D, Branch DW, Mitchell MD. 5-hydroxyeicosatetraenic acid biosynthesis by gestational tissues: effects of inflammatory cytokines. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 1467-71.
 43. Lundin-Schiller S, Mitchell MD. Prostaglandin production by human chorion leave cells in response to inflammatory mediators. *Placenta* 1991; 12: 353-63.
 44. Shobokshi A, Shaarawy M. Maternal serum and amniotic fluid cytokines in patients with preterm premature rupture of membranes with and without intrauterine infection. *Int J Gynecol Obstet* 2002; 79: 209-15.

45. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T. Cytokine production in chorioamnionitis: a review. *J Reprod Immunol* 2000; 47: 185-96.
46. Hill JA. Cytokines considered critical in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1992; 28: 123-6.
47. Axemo P, Brauner A, Petterson M, Eriksson L, Rwamushaija E, Bergström A. Amniotic fluid interleukins in Swedish and Mozambican pregnant women. *Gynecol Obstet Invest* 1996; 41: 113-7.
48. Bry K, Hallman M. Synergistic stimulation of amnion cell prostaglandin E2 synthesis by interleukin-1, tumor necrosis factor and products from activated human granulocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1991; 44: 241-5.
49. Li Y, Matsuzaki N, Masuhiro K, Kameda T, Taniguchi T, Saji, F, et al. Trophoblast-derived tumor necrosis factor- α induces release of human chorionic gonadotropin using interleukin-6 (IL-6) and IL-6-receptor-dependent system in the normal human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 184-91.
50. Goffinet F, Kayem G, Maillard F, Trebeden H, Cabrol D, Weill B, et al. Detection of interleukin 6 mRNA by RT-PCR in vaginal secretions: association with preterm delivery and neonatal infection in women with preterm labour and intact membranes. *Europ J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 123: 167-73.
51. Lockwood CJ, Ghidini A, Wein R, Lapinski R, Casae D, Berkowitz RL. Increased interleukin-6 concentrations in cervical secretions are associated with preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 1097-102.
52. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-57.
53. Lundin-Schiller S, Mitchell MD. Prostaglandin production by human chorion leave cells in response to inflammatory mediators. *Placenta* 1991; 12: 353-63.

54. Muzzucchelli I, Avanzini MA, Ciardelli L, Pagani S, Greco R, Belloni C, et al. Human amniotic fluid cells are able to produce IL-6 and IL-8. *Am J Reprod immunol* 2004; 51: 198-203.
55. Hsu CD, Meaddough E, Aversa K, Copel JA. The role of amniotic L-secreting, GRO- α , and interleukin-8 in the pathogenesis of intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 428-32.
56. C Marconi. Interleucina 1 β e interleucina 6 no líquido amniótico: relação com invasão microbiana da cavidade amniótica em gestantes em trabalho de parto prematuro. [Dissertação]. Botucatu. Faculdade de Medicina de Botucatu. 2008.
57. Kaplan PB, Gücer F, Sayin NC, Yüksel M, Yüce MA, Yardim T. Maternal serum cytokine levels in women with hyperemesis gravidarum in the first trimester of pregnancy. *Fertil Steril* 2003; 79: 498-502.
58. Soriano D, Hugol D, Quang NT, Darai E. Serum concentrations of interleukin-2R (IL-2R), IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor alpha in patients with ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 2003, 79: 975-80.
59. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Role of tumor necrosis factor-alpha in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 1159-62.
60. Yui J, Garcia-Loret M, Wegmsnn TG, Guilbert LJ. Cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 1994, 15: 819-35.
61. Eades DK, Corneium P, Pekala PH. Characterization of tumor necrosis factor receptor in human placenta. *Placenta* 1988; 9: 247-51.
62. Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, Wu YK, Oyarzun E, Hobbins JC, et al. Infection and labor. IV. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 336-41.
63. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. The effect of transforming growth factor and interleukin-10 on interleukin-8 release by human amniochorion may regulate histologic chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 794-9.
64. MG Silva. Avaliação microbiológica da secreção cervical e níveis de

- citocinas inflamatórias no soro e líquido amniótico de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo. [Dissertação]. Botucatu. Faculdade de Medicina de Botucatu. 1999.
65. Oswald IP, Gazzinelli RT, Sher A, James SL. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor- β to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J Immunol* 1992; 148: 3578-82.
 66. De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennet B, Figdor CG, Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 1991; 174: 1209-20.
 67. Shaw TC, Thomas LH, Friedman JS. Regulation of IL-10 secretion after phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes cells. *Cytokine* 2000; 12: 483-6.
 68. Greig PC, Herbert WN, Robinette BL, Teot LA. Amniotic fluid interleukin-10 concentrations increase through pregnancy and are elevated in patients with preterm labor associated with intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1223-7.
 69. Dudley DJ, Hunter C, Mitchell MD, Varner MW. Amniotic fluid interleukin-10 (IL-10) concentrations during pregnancy and with labor. *J Reprod Immunol* 1997; 33: 147-56.
 70. Menon R, Camargo MC, Thorsen P, Lombardi SJ, Fortunato SJ. Amniotic fluid interleukin-6 increase is an indicator of spontaneous preterm birth in white but not black Americans. *BJOG* 2008; 115: 77.e1-77.e7.
 71. Sadowsky DW, Novy MJ, Witkin SS, Gravett MG. Dexamethasone or interleukin-10 blocks interleukin-1 beta-induced uterine contractions in pregnant rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 252-63.
 72. Terrone DA, Rinehart BK, Granger JP, Barrilleaux PS, Martin JN, Bennett WA. Interleukin-10 administration and bacterial endotoxin-induced preterm birth in a rat model. *Obstet Gynecol* 2001; 98: 476-80.
 73. Modestin-Sorrentino M, Smulian JC, Vintzileos AM, Sorrentino D, Ananth CV, Sharma S, et al. Variations in cervical IL-10 and IL-8 concentrations throughout gestation in normal pregnancies. *Am J*

- Reprod Immunol 2007; 57: 482-7.
74. Hanna N, Bonifacio L, Weinberger B, Reddy P, Murphy S, Romero R, et al. Evidence for Interleukin-10 mediated inhibition of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production in preterm human placenta. J Reprod Immunol 2006; 55: 19-27.
 75. Simhan NH, Chura JC, Rauk PN. The effect of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 on lipopolysaccharide-stimulated production of prostaglandin E2 by cultured human decidual cells. J Reprod Immunol 2004; 64: 1-7.
 76. Abbas AK, Lichtman AH. Imunologia Celular e Molecular. 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
 77. Dudley DJ, Hunter C, Varner MW, Mitchell MD. Elevation of amniotic fluid interleukin-4 concentrations in women with preterm labor and chorioamnionitis. Am J Perinatol 1996;13: 443-7.
 78. Hart PH, Vitty GF, Burgess DR, Whitty GA, Piccoli DS, Hamilton JA. Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 3803-7.
 79. Adamson S, Edwin SS, LaMarche S, Mitchell MD. Actions of interleukin-4 on prostaglandin biosynthesis at the chorion-decidual interface. Am J Obstet Gynecol 1993; 169: 1442-7.

Análise quantitativa da expressão de IL-4 e IL-10 em membranas corioamnióticas de gestantes com Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo.

Pereira AC¹, Polettini J¹, Vieira EP¹, Marconi C¹, Peraçoli JC², Peraçoli MTS³, Silva MG¹.

¹ Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

² Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

³ Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP.

Resumo

Introdução: A Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo (RPM-PT) é um dos principais problemas da Clínica Obstétrica, com etiologia relacionada à ascensão bacteriana do trato genital inferior para a decídua e membranas corioamnióticas. **Objetivo:** Quantificar a expressão de interleucina (IL)-4 e IL-10 pelas membranas corioamnióticas de gestantes com RPM-PT e avaliar a relação dessa expressão com presença de corioamnionite. **Material e**

Métodos: Foram incluídas no estudo 30 gestantes com RPM-PT em trabalho de parto (RPM-PT em TP) e 20 gestantes com RPM-PT fora do trabalho de parto (RPM-PT fora de TP). Como grupo controle foram avaliadas 30 gestantes em trabalho de parto prematuro (TPP) e bolsa das águas íntegra. No momento da resolução da gestação, após a dequitação, foram retirados fragmentos das membranas corioamnióticas e acondicionados em *RNA later* para posterior quantificação do RNAm das citocinas pela técnica de PCR em tempo real. Fragmentos das membranas foram submetidos à análise histopatológica para avaliação da presença de corioamnionite. **Resultados:** No período do estudo, a incidência de RPM-PT foi de 6,2% e de TPP foi de 5,5%. Para a IL-10, a concentração relativa de RNAm foi estatisticamente superior nas membranas corioamnióticas de gestantes do grupo RPM-PT fora de TP em relação ao grupo

TPP. Em relação à IL-4 não houve diferença significativa entre os grupos estudados. A presença de corioamnionite foi de 44,0% no grupo RPM-PT e de 66,7% no grupo TPP. A análise estatística não apontou diferença significativa entre a expressão de IL-4 e IL-10, na presença ou ausência de corioamnionite, nos grupos estudados. **Conclusão:** A concentração relativa de RNAm de IL-10 é superior nas membranas corioamnióticas do grupo RPM-PT fora de TP em relação ao grupo TPP e entre os grupos RPM-PT e TPP a expressão de IL-4 é similar. Não existe relação entre a expressão de IL-4 e IL-10 e corioamnionite.

Detection of IL-4 and IL-10 mRNA in chorioamniotic membranes from the pregnant women with preterm premature rupture of membranes.

Pereira AC¹, Polettini J¹, Vieira EP¹, Marconi C¹, Peraçoli JC², Peraçoli MTS³, Silva MG¹.

¹ Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

² Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

³ Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP.

Introduction: The preterm premature rupture of membranes (PPROM) is one of the major problems of Clinical Obstetrics. Its etiology is related to the ascending pathway of bacteria from the lower genital tract to the decidua and chorioamniotic membranes. **Objective:** To quantify the expression of the interleukin (IL)-4 and IL-10 in the chorioamniotic membranes of pregnant women with PPRM and evaluate the relation of this expression with the presence of chorioamnionitis. **Material and Methods:** Thirty PPRM women in labor and 20 PPRM without labor women were studied. As a control group 30 pregnant women in premature labor (PTL) were studied. After delivery, samples of the chorioamniotic membranes were collected for histopathological analyses and others fragments were conditioned in *RNA later* for posterior quantification of cytokine mRNA expression by real time PCR. **Results:** In the study period, the incidence of PPRM was 6,2% and 5,5% for PTL. For IL-10, the expression of mRNA was statistically higher in the PPRM without labor group in relation to the groups with PTL. mRNA expression of IL-4 was not statistically different in the groups studied. In 44,0% of samples in PPRM group the presence of chorioamnionitis was observed and for PTL group the incidence was 66,7%. No difference occurred in the expression of cytokine mRNA in relation to the presence of chorioamnionitis in the groups studied. **Conclusion:** The expression of mRNA was statistically higher in the PPRM without labor group in relation to the group with PTL and among the PPRM and PTL groups

mRNA expression of IL-4 was not statistically different. No difference occur in the expression of IL-4 and IL-10 mRNA in relation to the presence of chorioamnionitis.

1. Introdução

A rotura espontânea das membranas ovulares ou amniorrexe é um acontecimento normal durante o trabalho de parto, ocorrendo rotineiramente após o início do mesmo. Quando precede o início do trabalho de parto é intitulada de rotura prematura de membranas (RPM). Sua ocorrência em idade gestacional inferior a 37 semanas recebe a denominação de rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT)^{1,2}.

Pela associação com nascimento prematuro e morbidade perinatal², a RPM é objeto de muitos estudos epidemiológicos e clínicos, na tentativa de identificar fatores de risco. Esses fatores são múltiplos, incluindo-se tabagismo³, atividade sexual⁴, nível socioeconômico⁵, gemelaridade⁶, sangramento vaginal durante a gestação³, polidrâmnio⁶, vaginose bacteriana⁷ e infecção da cavidade amniótica, sendo essa última associada à maioria dos casos de RPM-PT⁸⁻¹⁰.

A invasão da cavidade amniótica e infecção intra-amniótica induzem resposta inflamatória materna e fetal, caracterizada pela presença de corioamnionite histológica e aumento da produção de citocinas inflamatórias. Trabalhos relatam elevadas concentrações de citocinas no líquido amniótico⁹ e tecidos gestacionais^{11,12} de mulheres com infecção da cavidade amniótica e RPM-PT.

De acordo com Menon et al.¹², as membranas corioamnióticas são locais de produção de citocinas inflamatórias e esses mediadores do sistema imune são moléculas-chave no processo de indução da RPM-PT, pois segundo Fortunato et al.^{13,14}, a biodisponibilidade do fator de

necrose tumoral (TNF- α), a apoptose e a atividade de metaloproteinases são mecanismos responsáveis pela rotura prematura de membranas. O papel das citocinas na indução do trabalho de parto prematuro (TPP) já está bem documentado, principalmente pela estimulação do metabolismo do ácido araquidônico em tecidos reprodutivos humanos^{15,16}. Na presença de infecção da cavidade amniótica, as células inflamatórias que infiltram os tecidos gestacionais aumentam a produção das citocinas¹⁷.

Em trabalho recente, estudando gestantes com RPM-PT e em trabalho de parto prematuro e bolsa das águas íntegra, Poletti¹⁸ descreveu que as concentrações relativas de RNAm de interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-8 não foram diferentes nos grupos estudados. Ainda segundo esse autor, não houve diferença na intensidade de RNAm das citocinas inflamatórias em relação à presença e intensidade da corioamnionite e que citocinas anti-inflamatórias, nas membranas corioamnióticas, poderiam estar regulando a expressão de RNAm de citocinas pró-inflamatórias.

A IL-10, importante citocina anti-inflamatória, é capaz de diminuir a produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeos¹⁹. A produção de IL-10 está significativamente reduzida nas placentas de gestantes a termo fora de trabalho de parto quando comparadas com gestantes durante o primeiro e segundo trimestres, sugerindo que este seja um evento

fisiológico favorecendo um estado inflamatório temporário para o início do trabalho de parto²⁰.

A IL-4 é uma citocina anti-inflamatória, produzida por células T ativadas, mastócitos e basófilos²¹. É uma citocina pleiotrópica²¹, que estimula o desenvolvimento e expansão das células Th2, inibe a ativação de macrófagos e estimula a troca de classe pelo isotipo IgE na célula B²². Inibe a produção de prostaglandinas^{23,24}, e segundo a literatura, os níveis elevados de IL-4 são detectados no líquido amniótico de gestantes com evidência clínica de infecção na cavidade amniótica²⁵.

Considerando os resultados controversos da literatura acerca dos níveis das citocinas em complicações gestacionais e a hipótese de que citocinas anti-inflamatórias nas membranas corioamnióticas poderiam regular expressão de citocinas inflamatórias, o objetivo desse estudo foi quantificar a expressão de IL-4 e IL-10 pelas membranas corioamnióticas de gestantes com RPM-PT bem como avaliar a relação dessa expressão com presença de corioamnionite histológica.

Material e Métodos

2.1. Casuística

No período do estudo, de julho de 2006 a novembro de 2007, foram estudadas 30 mulheres com gestação única, cuja rotura de membranas ovulares tenha ocorrido espontaneamente entre 26 e 36 semanas de gestação e que estavam em trabalho de parto (RPM-PT em

TP) e 20 gestantes com RPM-PT fora do trabalho de parto (RPM-PT fora de TP). Gestantes portadoras de diabetes, anomalias fetais congênitas comprovadas, placenta prévia, infecção urinária ou outras infecções foram excluídas do estudo. Como grupo controle, foram estudadas 30 gestantes em trabalho de parto prematuro e bolsa das águas íntegra (TPP). Todas as gestantes incluídas no estudo foram atendidas no Serviço de Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

A idade gestacional foi estabelecida pela data da última menstruação ou por exame ultra-sonográfico precoce (até 20 semanas). O tempo de rotura das membranas na admissão da paciente foi obtido por informação materna.

O diagnóstico de RPM foi confirmado pela história clínica e constatação de líquido amniótico na cavidade vaginal ou quando isto não foi possível, por meio de testes realizados na secreção do fundo de saco vaginal: cristalização do esfregaço em lâmina seca, queima de esfregaço em lâmina, pH vaginal e pesquisa de células fetais pela coloração do sulfato de azul de Nilo²⁶.

As pacientes permaneceram internadas na Enfermaria de Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, sendo controladas clinicamente por meio de avaliação da frequência cardíaca e temperatura a cada 6 horas e, laboratorialmente por hemograma em dias alternados até a resolução da gestação.

Todas as gestantes envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1), tendo sido o projeto de

pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, protocolo 512/2007-CEP.

2.2. Colheita de membranas corioamnióticas e análise histopatológica

No momento da resolução da gestação, logo após a dequitação, foram colhidas membranas corioamnióticas de todas as gestantes incluídas no estudo. Foram retirados fragmentos da borda das membranas, com bisturi, que foram acondicionados em tubos de 1,5 mL tipo *ependorf* contendo RNA later (RNA Stabilization Reagent – Qiagen) por 4 horas. Após esse período, os fragmentos foram transferidos para novo tubo e imediatamente armazenados a -70°C para posterior extração de RNA. Após esses procedimentos, as placentas e seus anexos foram fixados e acondicionados em recipiente apropriado, contendo formalina a 10%, por 24 horas para fixação. Fragmentos das membranas corioamnióticas foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol e a seguir incluídos em blocos de parafina. Os blocos obtidos foram seccionados em micrótomo comum, obtendo-se cortes de 6 µm de espessura para montagem em lâminas de vidro. As lâminas foram coradas pelo método clássico de Hematoxilina-Eosina (HE) para a análise histopatológica das membranas. O critério histopatológico empregado para o diagnóstico de corioamnionite foi o descrito por Hargitai et al.²⁷.

2.3. Detecção de citocinas pela PCR em tempo real

2.3.1. Extração de RNA

Os fragmentos das membranas corioamnióticas armazenados em tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL contendo RNA *later* foram submetidos à extração de RNA total, usando o kit RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare), segundo as instruções do fabricante. Inicialmente foi determinada a quantidade de 30mg de tecido a ser macerado em nitrogênio líquido, com posterior adição de 350µL de tampão RA1, acrescido de β-mercaptoetanol e lisado no *vortex*. A seguir, o tecido lisado foi transferido para um filtro com tubo coletor e centrifugado por 1 minuto a 11.000 g. Após a centrifugação, o filtro foi descartado e o filtrado transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Foram adicionados 350µL de etanol 70% e homogeneizado no *vortex* duas vezes. Posteriormente, o lisado foi transferido para a coluna com membrana gel-sílica e centrifugado por 30 segundos a 8.000g. Em seguida foram adicionados 350 µL de tampão MBD e centrifugadas por 1 minuto a 11.000 g para secagem da membrana. O filtrado foi descartado e o tubo coletor retornado à coluna. As amostras foram então submetidas ao tratamento com enzima DNase livre de RNase, com objetivo de eliminar possível contaminação com DNA residual genômico. A seguir, foram adicionados 200 µL de tampão RA2 com centrifugação por 1 minuto a 8.000g e as colunas foram transferidas para novos tubos coletores. Seguindo o processo de lavagem da membrana, foram adicionados 600 µL de tampão RA3, centrifugados por 1 minuto a 11.000 g e, após descarte do conteúdo do tubo coletor, foram adicionados 250 µL de tampão RA3, centrifugados por 2 minutos a 11.000 g. As colunas foram transferidas para novos tubos e o RNA foi eluído em 40µL de água

RNase-free, com posterior centrifugação por 1 minuto a 11.000 g. O RNA extraído foi quantificado pela leitura em biofotômetro (Eppendorf), na densidade óptica de 260nm.

2.3.2. Obtenção de cDNA

Em seguida à extração de RNA, as amostras com concentração entre 0,02 e 0,2µg/ µL de RNA foram submetidas à obtenção de cDNA utilizando-se o *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA produzido foi quantificado por biofotômetro (Eppendorf), na densidade óptica de 206 nm e armazenado a – 70°C para posterior utilização na detecção e quantificação de IL-10 pela técnica da PCR em tempo real.

2.3.3. PCR em tempo real

A partir do cDNA obtido foi efetuada a amplificação dos genes das citocinas IL-4 (Hs 00174122_m1) e IL-10 (Hs 01038788_m1) de acordo com o protocolo da Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays em ABI Prism® 7300 Sequence Detector, em volume final de 20 µL com adição de 5 µL de cDNA das amostras na diluição 1:10. As condições da reação foram de 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos compostos por 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, sendo os sinais de fluorescência adquiridos nos passos de anelamento e extensão do ciclo de amplificação (60 °C por 1 minuto). Em todos os ensaios, as amostras foram processadas em duplicata. Paralelamente, foi realizada a amplificação do gene da β-actina, como controle

endógeno, visto que o valor real de expressão gênica foi dado através da comparação do resultado de amplificação dos genes da citocina e desse gene constitutivo.

O cDNA de referência para as citocinas estudadas consistiu da mistura de vários cDNAs produzidos a partir do RNA das próprias amostras das membranas corioamnióticas incluídas no estudo. Esse cDNA foi diluído na razão de 1:2 a 1:128 em água ultrapura estéril e estas diluições foram testadas, em duplicatas, na PCR em tempo real para IL-4, IL-10 e para o gene da β -actina. Pela determinação do *baseline*, *threshold* e dos Ct (*cycle threshold*) produzidos por cada diluição, a curva padrão foi estabelecida de acordo com os dados fornecidos pelo programa SDS versão 1.2.3 (“Sequence Detection Systems” 1.2.3 – 7300 Real Time PCR System – Applied Biosystems). As quatro diluições que apresentaram Ct entre os ciclos 25 e 35 foram escolhidas para constituir a curva padrão utilizada em todas as reações. A menor diluição do cDNA de referência recebeu o valor relativo igual a 100 e, seguindo a mesma razão da diluição, as outras três diluições do cDNA foram determinadas como 50; 25 e 12,5, e foram consideradas como referência na quantificação relativa da expressão dos genes da IL-4 e IL-10. A concentração de cada amostra testada foi fornecida diretamente pelo programa SDS 1.2.3, calculada em relação à curva padrão e ao valor igual a 100, estabelecido para o cDNA de referência.

2.4. Análise estatística

Os dados referentes à idade materna, idade gestacional no momento do parto e concentração relativa de RNAm das citocinas nos grupos estudados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. As variáveis estado civil, raça, hábito de fumar, bem como as características obstétricas das pacientes, como paridade, frequência de intercorrências gestacionais anteriores e o tempo de rotura das membranas foram submetidos ao teste de comparação de proporção (Teste z). A idade gestacional da ocorrência da rotura foi submetida ao teste de Mann-Whitney para comparação entre os grupos com RPM-PT. O nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5%²⁸.

3. Resultados

3.1. Incidência de rotura prematura de membranas e trabalho de parto prematuro

No período do estudo foram realizados 1560 partos no Centro Obstétrico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp. Deste total, 6,2% corresponderam a gestantes portadoras de RPM-PT e 5,5% de TPP.

3.2. Características das pacientes

As variáveis sócio-demográficas e gestacionais das pacientes incluídas no estudo estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Variáveis sócio-demográficas e obstétricas das gestantes incluídas no estudo.

Variáveis	RPM-PT fora de TP (n=20)	RPM-PT em TP (n=30)	TPP (n=30)
Idade (anos)	26 (16-42) ^a	22 (14-44) ^{ab}	20 (14-28) ^b
Estado Civil			
Solteira	6(30,0%) ^a	12(40,0%) ^a	10 (33,3%) ^a
Casada	6 (30,0%) ^a	14 (46,7%) ^a	10 (33,3%) ^a
União Estável	8 (40,0%) ^a	4 (13,3%) ^a	10 (33,3%) ^a
Etnia			
Branca	14 (70,0%) ^a	29 (96,7%) ^b	23 (76,7%) ^{ab}
Não Branca	6 (30,0%) ^a	1 (3,3%) ^a	7(33,3%) ^a
Via de parto			
Vaginal	-	23 (76,7%) ^a	20 (66,7%) ^a
Cesárea	20 (100,0%) ^a	7 (23,3%) ^b	10 (33,3%) ^b
Idade gestacional no momento do parto	34s5d (26s-36s4d) ^a	33s4d (25s5d-36s5d) ^a	32s4d (25s3d-36s) ^a
Paridade			
Primigesta	10 (50,0%) ^a	15 (50,0%) ^a	9 (30,0%) ^a
Secundigesta	5 (25,0%) ^a	6 (20,0%) ^a	5 (16,7%) ^a
Multigesta	5 (25,0%) ^a	9 (30,0%) ^a	16 (53,3%) ^a
Intercorrências gestacionais anteriores			
RPM	2/10 ^a	3/15 ^a	3/21 ^a

Aborto	6/10 ^a	5/15 ^a	7/21 ^a
TPP	2/10 ^a	4/15 ^a	12/21 ^a

Na comparação dos grupos foram utilizadas letras minúsculas, considerando-se que as proporções seguidas de, pelo menos, uma mesma letra não diferem.

Em relação a via de parto podemos observar que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos RPM-PT fora de TP, RPM-PT em TP e TPP. Quanto às variáveis idade gestacional no momento do parto, paridade, intercorrências gestacionais anteriores, não foi observada diferença estatisticamente significativa nos grupos estudados.

Em relação ao tempo de rotura das membranas ovulares, podemos observar que mais de 50% das gestantes apresentavam período de latência superior a 24 horas, no momento da resolução da gestação (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição das gestantes em relação à idade gestacional e ao tempo de rotura das membranas corioamnióticas no momento da resolução da gestação.

	RPM-PT fora TP (n=20)	RPM-PT em TP (n=30)	Estatística p
Idade gestacional no momento da RPM	34s (22s5d - 36s4d) ^a	33s (25s2d - 36s6d) ^a	0,14
Tempo RPM			
< 12 horas	4 (20,0%) ^a	9 (30,0%) ^a	0,76
12-24 horas	4 (20,0%) ^a	5 (16,7%) ^a	0,45
> 24 horas	12 (60,0%) ^a	16 (53,3%) ^a	0,97

3.3. Análise histopatológica das membranas corioamnióticas

A análise histopatológica referente à presença de infiltrado inflamatório nas membranas corioamnióticas estão apresentados na Tabela 3 e Figuras 1 e 2. Podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa na freqüência de corioamnionite nos grupos RPM-PT fora de TP, RPM-PT em TP e TPP.

Tabela 3. Número e porcentagem de corioamnionite presente nas amostras de membranas corioamnióticas nos grupos estudados.

	RPM-PT fora TP (n=20)	RPM-PT em TP (n=30)	TPP (n=30)
Presença de Corioamnionite	6 (30,0%) ^a	16 (53,3%) ^a	20 (66,7%) ^a
Ausência de Corioamnionite	14 (70,0%) ^a	14 (46,7%) ^a	10 (33,3%) ^a

Na comparação dos grupos foram utilizadas letras minúsculas, considerando-se que as proporções seguidas de, pelo menos, uma mesma letra não diferem.

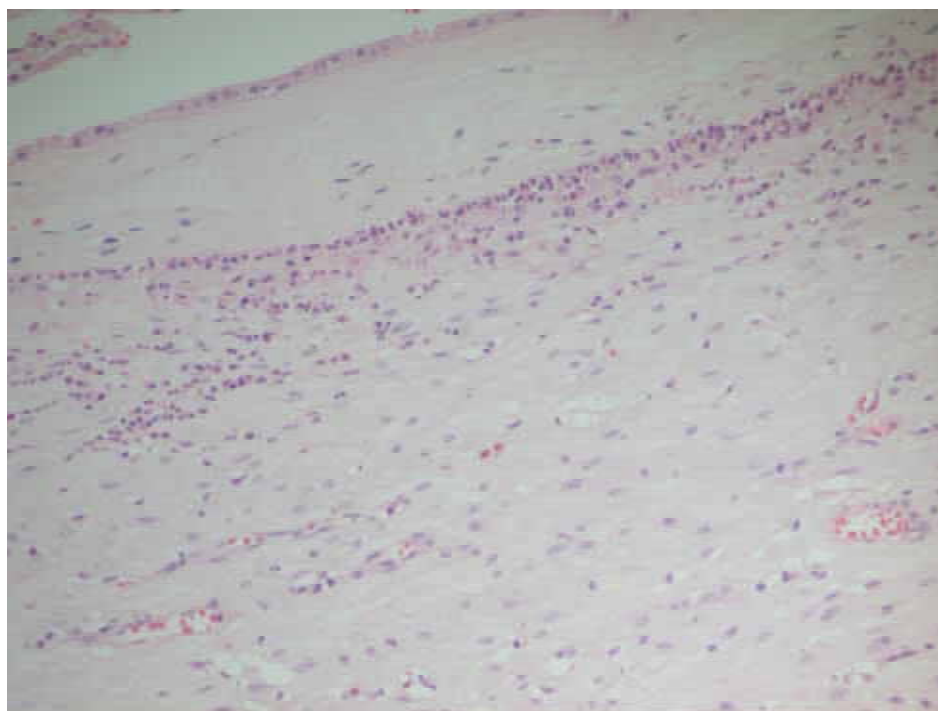


Figura 1. Fotomicrografia das membranas corioamnióticas de gestantes do grupo rotura prematura de membranas pré-termo com presença de corioamnionite. HE. 200X.

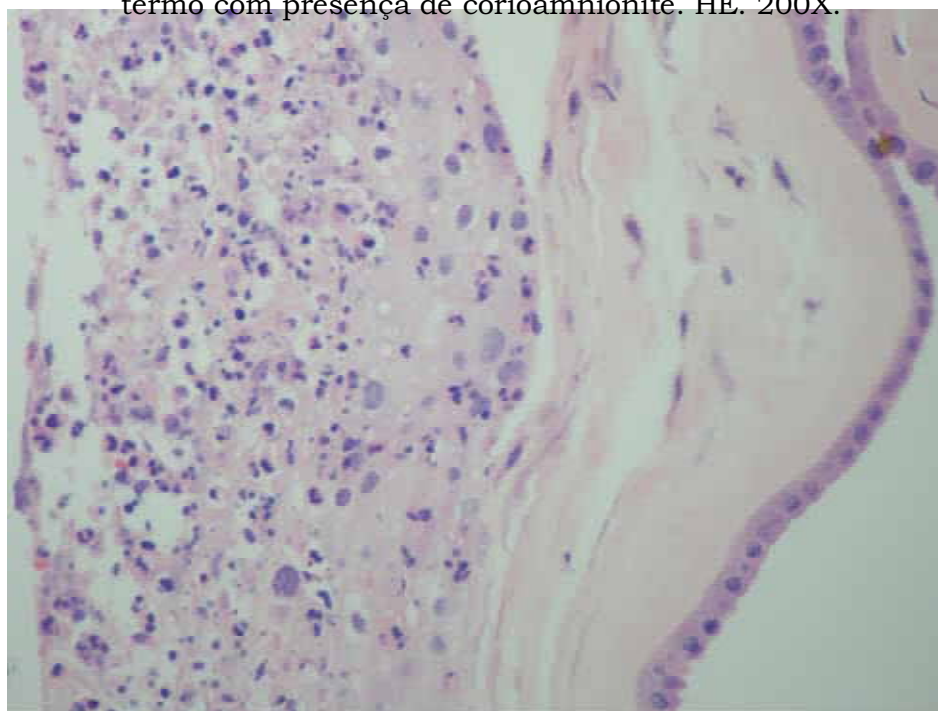


Figura 2. Fotomicrografia das membranas corioamnióticas de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo demonstrando rico exsudato polimorfonuclear. HE. 400X.

3.4. Quantificação relativa da expressão de IL-4 e IL-10

3.4.1. Determinação da curva padrão na PCR em tempo real para o gene da β -actina

As diluições do cDNA de referência testadas para serem utilizadas na quantificação relativa da expressão da β -actina estão representadas na Tabela 4 e na Figura 3. Para isso, foram selecionadas quatro diluições (1:16, 1:32, 1:64 e 1:128), com o *threshold* determinado na fase exponencial da curva de amplificação.

Tabela 4. Valor relativo e Ct do cDNA de referência para β -actina obtidos, em diferentes diluições, pela PCR em tempo real das amostras de membranas corioamnióticas.

cDNA	Valor relativo	Ct β actina
1:16	100,0	24,1
1:32	50,0	25,1
1:64	25,0	26,4
1:128	12,5	28,2

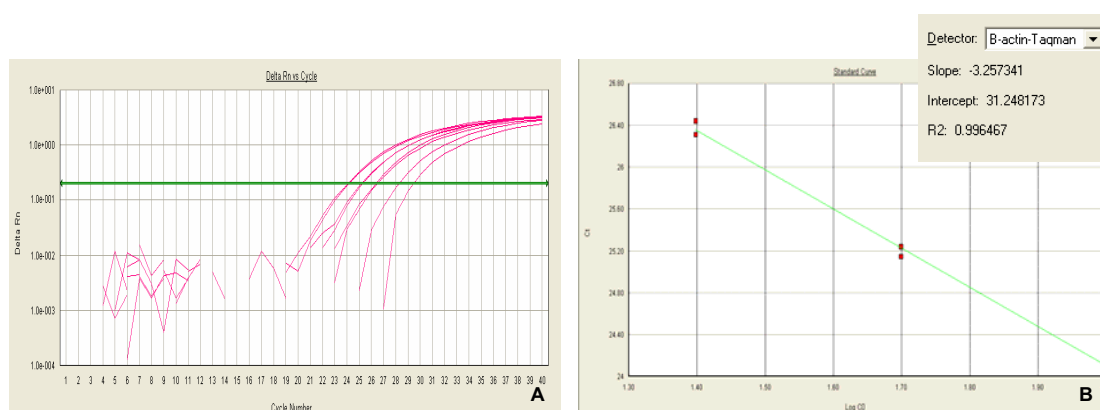


Figura 3. **A.** Representação gráfica da curva de amplificação da PCR em tempo real para β -actina das diluições do cDNA de referência utilizado como padrão nas reações. Em ordem decrescente de diluição, da esquerda para a direita, apresentam-se as diluições 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128. **B.** Representação gráfica da curva padrão, construída com

quatro pontos nas referidas diluições, obtidas a partir da PCR em tempo real para a β -actina.

3.4.2. Determinação da curva padrão na PCR em tempo real para os genes da IL- 4 e IL-10

As diluições do cDNA de referência testadas para serem utilizadas na quantificação relativa da expressão de IL-4 e IL-10 estão representadas na Tabela 5 e nas Figuras 4 e 5. Para isso, foram selecionadas quatro diluições (1:2, 1:4, 1:8 e 1:16), com o *threshold* determinado na fase exponencial da curva de amplificação.

Tabela 5. Valor relativo e Ct do cDNA de referência para IL- 4 e IL-10 obtidos, em diferentes diluições, pela PCR em tempo real das amostras de membranas corioamnióticas.

cDNA	Valor relativo	Ct IL- 4	Ct IL-10
1:2	100,0	31,4	25,5
1:8	50,0	33,3	26,5
1:16	25,0	34,4	27,7
1:32	12,5	35,2	28,7

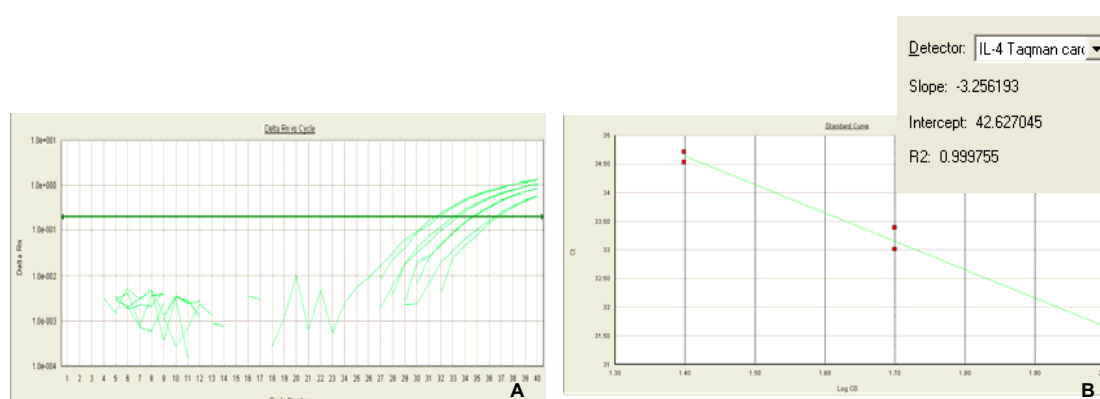


Figura 4. A. Representação gráfica da curva de amplificação da PCR em tempo real para IL-4 das diluições do cDNA de referência utilizado como padrão nas reações. Em ordem decrescente de diluição, da esquerda para a direita, apresentam-se as

diluições 1:2, 1:4, 1:16 e 1:32. **B.** Representação gráfica da curvas padrão, construída com quatro pontos nas referidas diluições, obtidas a partir da PCR em tempo real para IL-4.

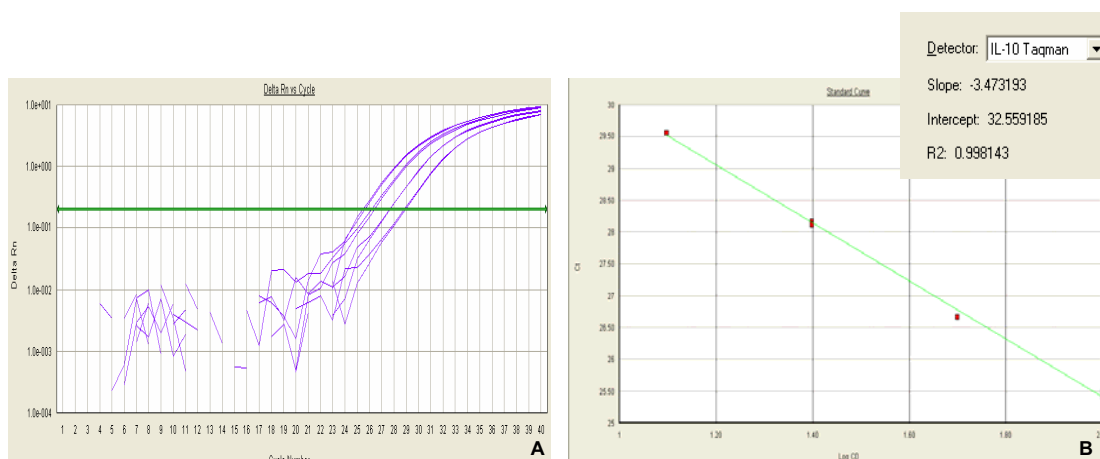


Figura 5. A. Representação gráfica da curva de amplificação da PCR em tempo real para IL-10 das diluições do cDNA de referência utilizado como padrão nas reações. Em ordem decrescente de diluição, da esquerda para a direita, apresentam-se as diluições 1:2 1:4, 1:8 e 1:16. **B.** Representação gráfica da curva padrão, construída com quatro pontos nas referidas diluições, obtidas a partir da PCR em tempo real para IL-10.

3.4.3. Quantificação relativa de RNAm de IL-4 nas membranas corioamnióticas

As concentrações relativas de RNAm de IL-4 nas membranas corioamnióticas das gestantes com RPM-PT fora de TP, RPM-PT em TP e em TPP estão apresentadas na Figura 6. Podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos RPM-PT fora de TP, RPM-PT em TP e em TPP.

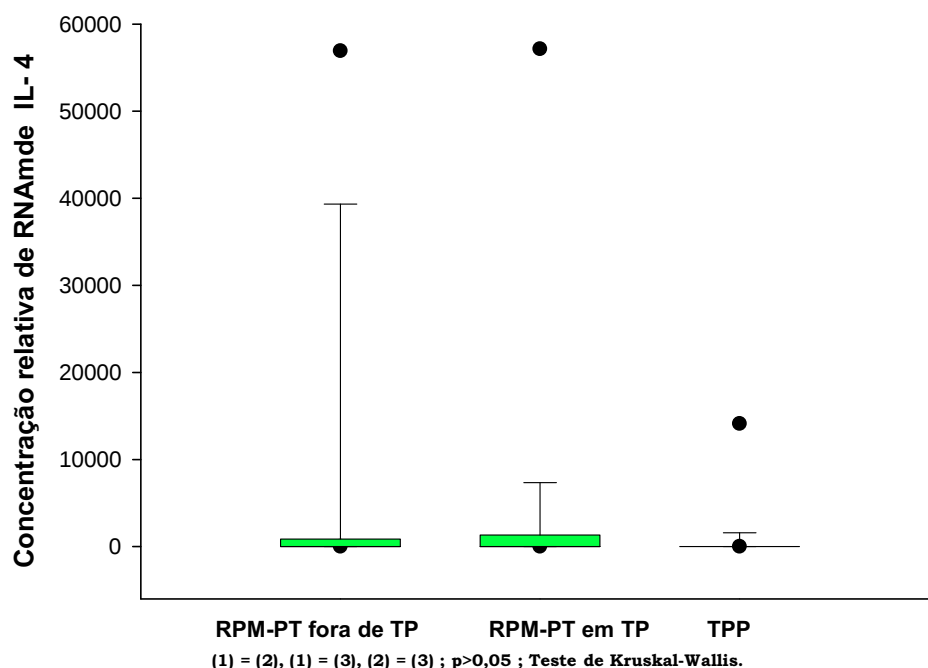


Figura 6. *Box-Plot* representando a concentração relativa de RNAm de IL-4 em membranas corioamnióticas de gestantes pertencentes aos grupos RPM-PT fora de TP, RPM-PT em TP e TPP. No *Box-plot*, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores, o traço horizontal, a mediana; as barras de erro correspondem aos percentis 5 e 95; e os círculos os valores outliers.

3.4.4. Quantificação relativa de RNAm de IL-10 nas membranas corioamnióticas

As concentrações relativas de RNAm de IL-10 nas membranas corioamnióticas das gestantes com RPM-PT fora de TP, RPM-PT em TP e em TPP estão apresentadas na Figura 7. Podemos observar que a expressão de IL-10 foi significativamente superior no grupo RPM-PT fora de TP em relação ao grupo TPP ($p < 0,01$) e não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos RPM-PT fora de TP e RPM-PT em TP.

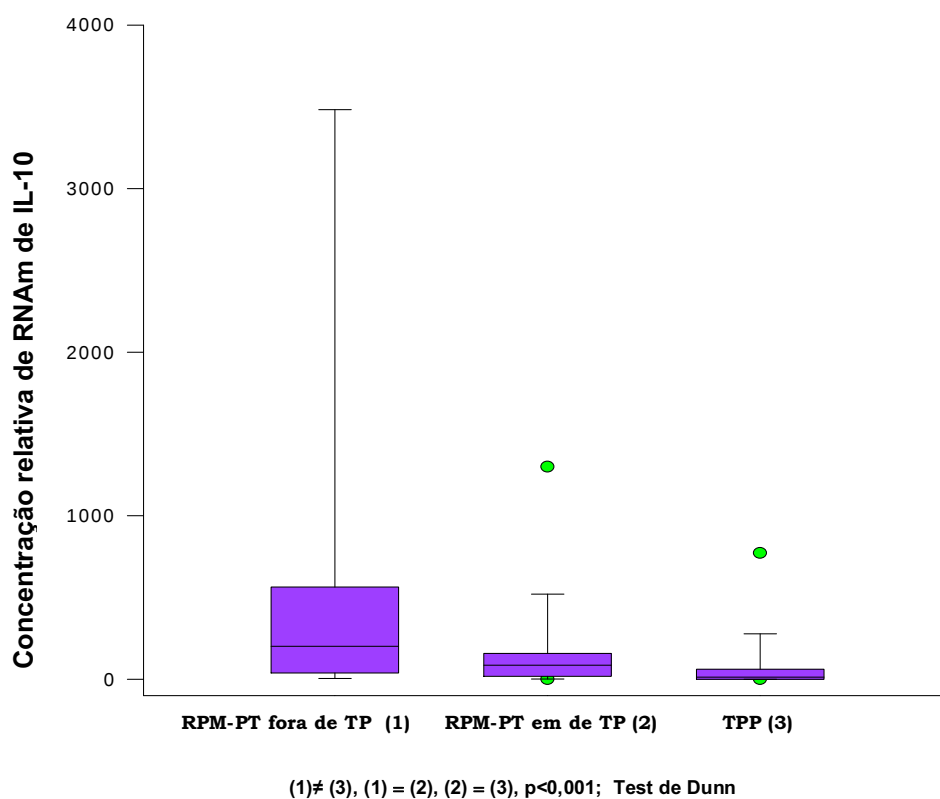


Figura 7. *Box-Plot* representando a concentração relativa de RNAm de IL-10 em membranas corioamnióticas de gestantes pertencentes aos grupos RPM-PT fora de TP, RPM-PT em TP e TPP. No *Box-plot*, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores, o traço horizontal, a mediana; as barras de erro correspondem aos percentis 5 e 95; e os círculos, os valores outliers.

3.4.5. Quantificação relativa de RNAm de IL-4 e IL-10 nas membranas corioamnióticas em relação à presença de corioamnionite.

As concentrações relativas de RNAm de IL-4 e IL-10 foram avaliadas quanto à presença de corioamnionite e não houve relação entre essas variáveis dentro dos grupos RPM-TP fora de TP, RPM-TP em TP e em TPP (Figuras 8 e 9).

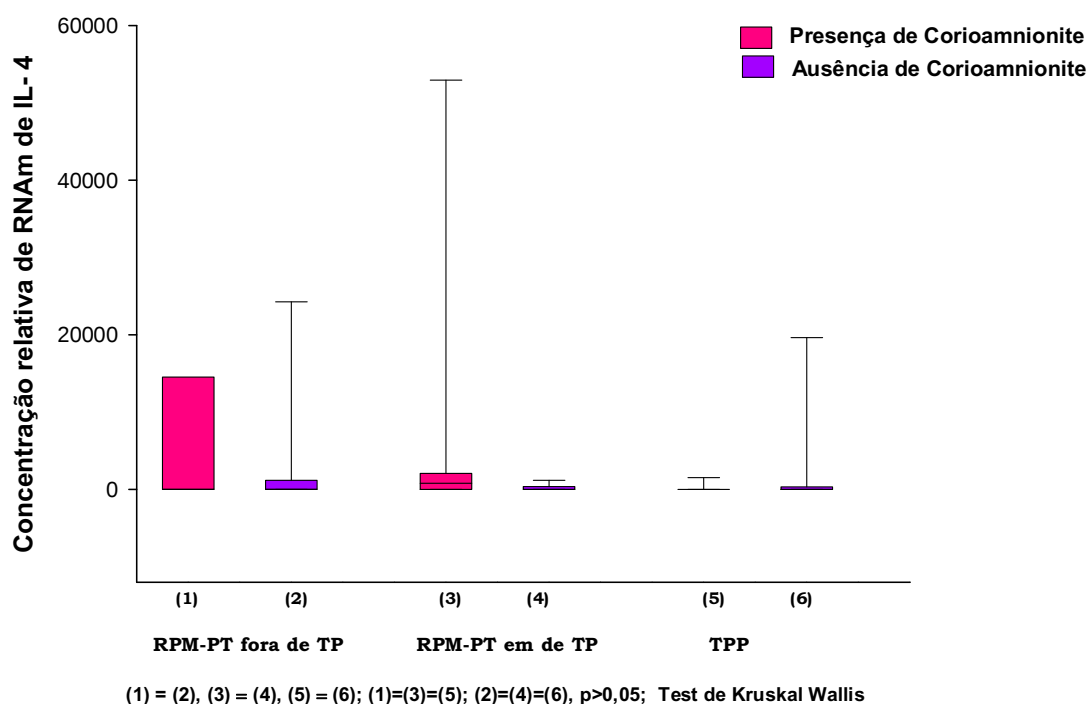


Figura 8. *Box-Plot* representando a concentração relativa de RNAm de IL-4 em membranas corioamnióticas de gestantes pertencentes aos grupos RPM-TP fora TP, RPM-TP em TP e TPP em relação à presença ou não de corioamnionite. No *Box-plot*, os quadrantes

representam de 25 a 75% dos valores, o traço horizontal, a mediana; as barras de erro correspondem aos percentis 5 e 95.

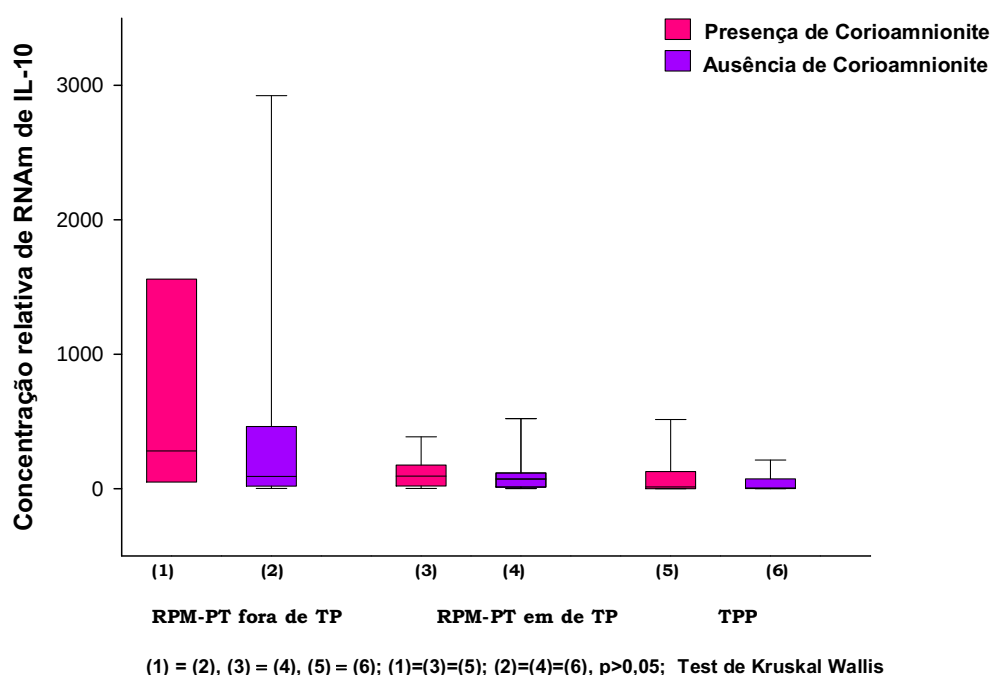


Figura 9. *Box-Plot* representando a concentração relativa de RNAm de IL-10 em membranas corioamnióticas de gestantes pertencentes aos grupos RPM-PT fora TP, RPM-PT em TP e TPP em relação à presença ou não de corioamnionite. No *Box-plot*, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores, o traço horizontal, a mediana; as barras de erro correspondem aos percentis 5 e 95.

4. Discussão

No presente estudo foram analisadas as concentrações relativas de RNAm de IL-4 e IL-10 em membranas corioamnióticas de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo em trabalho de parto e fora dele, assim como em gestantes em trabalho de parto prematuro e bolsa da águas íntegra. Também foi objetivo desse trabalho avaliar a relação entre a presença de corioamnionite com a expressão de das citocinas de interesse.

No período do estudo, foram realizados 1560 partos no Serviço de Obstetrícia da Faculdade de Botucatu, Unesp. A prevalência de RPM foi de 7,7% em gestações de termo e 6,2% em gestações pré-termo, freqüências semelhantes às relatadas na literatura^{29,18}. Segundo Polzin & Brady³¹, a RPM esteve presente em 15% das gestações de termo e em aproximadamente 30% das gestações pré-termo, nos 4 milhões de nascimentos ocorridos nos Estados Unidos em 1990.

A paridade e a freqüência de TPP, RPM e abortos anteriores foi a mesma nos grupos estudados, não tendo, portanto, influência maior do antecedente do parto prematuro como fator de risco para desencadeamento de RPM como sugerido por Newton⁶.

A concentração relativa de RNAm de IL-10 nas membranas corioamnióticas de gestantes com RPM-PT fora de trabalho de parto foi significativamente superior em relação ao grupo TPP. Segundo Dudley et al.³¹ a concentração de IL-10 no líquido amniótico não se encontra elevado em gestantes com TPP, corioamnionite ou em trabalho de parto

à termo. Para Menon et al.³² também não houve associação entre parto prematuro aumento na concentração de IL-10. Para Hanna et al.³³ os níveis de IL-10, em placentas de termo, estão diminuídos no período próximo ao parto e se mantém diminuído durante o trabalho de parto. Em contrapartida, Greig et al.³⁴ avaliando o papel da IL-10 em gestantes em TPP, associado à infecção da cavidade amniótica, relataram níveis elevados dessa citocina em gestantes com corioamnionite e Cadet et al.³⁵ encontraram elevadas concentrações de RNAm de IL-10 em placentas de gestação à termo. Para Modestin-Sorrentino et al.³⁶ a concentração de IL-10 na secreção cervical reduz enquanto níveis de IL-8 aumentam com o avanço gestacional, sugerindo que essa mudança contribua para o início do trabalho de parto. Em nosso estudo, concentrações elevadas de RNAm de IL-10 foram observadas apenas no grupo RPM-PT fora de TP em relação ao grupo TPP, sugerindo que os processos anti-inflamatórios estejam atenuados no cenário de trabalho de parto. Entretanto o padrão de expressão de IL-4 não diferiu nos grupos em trabalho de parto e fora dele.

Já é bem estabelecido na literatura que a IL-10 é uma citocina de padrão Th2 que regula a produção de citocinas Th1³⁶. As citocinas inflamatórias são moléculas-chave no processo de indução do trabalho de parto prematuro, principalmente pela estimulação do metabolismo do ácido araquidônico em tecidos reprodutivos humanos^{37,15}, induzindo a síntese de prostaglandinas, potentes estimuladores da contratilidade uterina, desencadeando o trabalho de parto. Baseado nesses conhecimentos e nos resultados obtidos nesse estudo, podemos

concluir que a IL-10 diminui a produção de prostaglandina, resultando em maior tempo de latência entre a rotura das membranas ovulares e o desencadeamento do TPP. A IL-10 inibe a produção de prostaglandina E2 através da regulação da expressão da ciclooxygenase 2 (COX-2)³⁸⁻⁴⁰. Segundo Bry & Hallman⁴⁰, a IL-4, outra citocina anti-inflamatória, induz diminuição de atividade de prostaglandina das células decíduais e induz diminuição de citocinas inflamatórias que estimulam a produção de prostaglandinas em cultura trofoblástica. Em contrapartida, a IL-4 tem comportamento paradoxal já que em monócitos pode inibir a atividade da ciclooxygenase, reduzindo a produção de prostaglandinas²³ e nos tecidos gestacionais, como em células amnióticas, coriônicas e decíduais a IL-4 pode amplificar a produção de prostaglandinas⁴¹. Spaziani et al.⁴² confirmaram que IL-4 induz COX-2 e produção de prostaglandina pelas células amnióticas.

Em relação à concentração relativa de RNAm de IL-4 e IL-10 e presença de corioamnionite, não observamos relação entre essas variáveis nos grupos estudados. A ausência dessa relação, pode ser explicada em parte, pelo fato que corioamnionite esteja numa fase inicial, sendo as citocinas anti-inflamatórias produzidas numa etapa mais tardia do processo inflamatório. No entanto, no presente estudo o período de latência foi de 60,0% e 53,3% para os grupos RPM-PT fora de TP e RPM-PT em TP, respectivamente.

Baseado nos resultados obtidos temos que considerar que a presença de RNAm não significa, necessariamente, produção de

citocinas. A transcrição consiste na síntese do RNA e resulta em sequência de RNA complementar ao comprimento total do gene⁴³. A quantidade de proteína produzida depende da estabilidade dos RNAm correspondente no citoplasma e da taxa de sua tradução. A estabilidade do RNAm também determina quanto tempo deve durar a síntese da proteína codificada e a maioria dos RNAm dos organismos multicelulares tem meia-vida de várias horas. No entanto, algumas proteínas são necessárias apenas durante curtos períodos de tempo e devem ser expressas em pulsos, como as citocinas. A expressão dessas proteínas ocorre em pulsos curtos porque a transcrição dos seus genes pode ser ligada ou desligada rapidamente e seu RNAm geralmente têm meia-vida curta, em torno de 30 minutos ou menos⁴⁴.

Portanto, a análise dos nossos resultados evidenciam que a expressão de IL-10 é superior nas membranas corioamnióticas do grupo RPM-PT fora de TP em relação ao grupo TPP e entre os grupos RPM-PT e TPP a expressão de IL-4 é similar e que não existe relação entre a expressão de IL-4 e IL-10 e corioamnionite.

Referências Bibliográficas

1. Lee T, Silver H. Etiology and epidemiology of preterm premature rupture of the membranes. *Clin Perinatol* 2001; 28: 721-34.
2. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 178-193.
3. Kyrklund-Blomberg NB, Granath F, Cnattingius S. Maternal smoking and causes of very preterm birth. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005; 84:572-7.
4. Mercer BM, Goldenberg RL, Meis PJ, Moawad AH, Shellhaas C, Das A^B, et al. The preterm prediction study: prediction of preterm premature rupture of membranes through clinical findings and ancillary testing. The National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 738-45.
5. Ferguson SE, Smith GN, Salenieks ME, Windrim R, Walker MC. Preterm premature rupture of membranes: Nutritional and socioeconomicf. *Obstet Gynecol* 2002; 100:1250-6
6. Newton ER. Chorioamnionitis and intraamniotic infection. *Clin Obstet Gynecol* 1993; 36: 795-808.
7. Karat C, MadhivananP, Krupp K, Poornima S, Jayanthi NV, Suguna JS, et al. The clinical and microbiological correlates of premature rupture of membranes. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24:283-5.
8. Yoon BH, Romero R, Moon JB, Shim SS, Kim M, Kim G, et al. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185:130-6.
9. Shobokshi A, Shaarawy M. Maternal serum and amniotic fluid cytokines in patients with preterm premature rupture of membranes with and without intrauterine infection. *Int J Gynecol Obstet* 2002; 79: 209-15.
10. Sinhan HN, Caritis SN, Krohn MA, Hillier SL. The vaginal inflammatory milieu and the risk of early premature preterm rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 213-8.

*Referências bibliográficas elaboradas de acordo com o International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals. *Ann Intern Med* 1997; 126:36-47.

11. Steinborn A, Niederht A, Solbach C, Hildenbrand R, Sohn C, Kaufmann M. Cytokine release from placental endothelial cells, a process associated with preterm labour in the absence of intrauterine infection. *Cytokine* 1999; 11:66-73.
12. Menon R, Swan KF, Lyden TW, Rote NS, Fortunato S. Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1 β and interleukin-6) in amniochorionic membranes *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 493-500.
13. Fortunato SJ, Menon R, Bryant C, Lombardi SJ. Programmed cell death (apoptosis) as a possible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrane degradation in premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182:1468-76.
14. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Role of tumor necrosis factor- α in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 1159-62.
15. Edwin SS, LaMarche SL, Thai D, Branch DW, Mitchell MD. 5-hidroxyeicosatetraenic acid biosynthesis by gestational tissues: Effects of inflammatory cytokines. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:1467-71.
16. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T. Cytokine production in chorioamnionitis. *J Reprod Immunol* 2000;47:185-96.
17. Kauma SW, Johnson DE. The expression and localization of IL-1 β mRNA in chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 1994;163:1430-7.
18. J Poletini. Análise quantitativa da expressão de citocinas inflamatórias em membranas corioamnióticas de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo. [Dissertação]. Botucatu. Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, 2007.
19. Oswald IP, Gazzinelli RT, Sher A, James SL. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor- β to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J Immunol* 1992; 148:3578-82.
20. Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, et al. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J Immunol* 2000; 164:5721-8.

21. Simhan NH, Chura JC, Rauk PN. The effect of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 on lipopolysaccharide-stimulated production of prostaglandin E2 by cultured human decidual cells. *J Reprod Immunol* 2004; 64:1-7.
22. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
23. Hart PH, Vitty GF, Burgess DR, Whitty GA, Piccoli DS, Halminton JA. Potential anti-inflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor- α , Interleukin 1 and prostaglandin E₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3803-7.
24. Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Wahl LM. Interleukin 4 inhibition of prostaglandin E₂ synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kDa type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes. *J Biol Chem* 1992; 267: 515-519.
25. Dudley DJ, Hunter C, Varner MW, Mitchell MD. Elevation of amniotic fluid interleukin-4 concentrations in women with preterm labor and chorioamnionitis. *Am J Perinatol* 1996; 13: 443-7.
26. Rezende J. *Obstetrícia*. 10ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
27. Hargitai B, Marton T, Cox PM. Examination of the human placenta. *J Clin Path* 2005; 57:775-82.
28. Curi PR. *Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas*. 1ª Edição. Editora Tipomic, 1997.
29. Silva MG, Peraçoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Peraçoli MTS. Cervical *Lactobacillus* and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynecol Obstet* 2003; 81:175-83.
30. Polzin WJ, Brady K. Mechanical factors in the etiology of premature rupture of the membranes. *Clin Obstet Gynecol* 1991; 34: 702-14.
31. Dudley DJ, Hunter C, Mitchell MD, Varner MW. Amniotic fluid interleukin-10 (IL-10) concentrations during pregnancy and with labor. *J Reprod Immunol* 1997; 33:147-56.

32. Menon R, Camargo MC, Thorsen Menon R, Camargo MC, Thorsen P, Lombardi SJ, Fortunato SJ. Amniotic fluid interleukin-6 increase is an indicator of spontaneous preterm birth in white but not black Americans. *BJOG* 2008; 198: 77.e1-77.e7.
33. P, Lombardi SJ, Fortunato SJ. Amniotic fluid interleukin-6 increase is an indicator of spontaneous preterm birth in white but not black Americans. *BJOG* 2008; 198: 77.e1-77.e7.
34. Hanna N, Bonifacio L, Weinberger B, Reddy P, Murphy S, Romero R, Sharma S. Evidence for Interleukin-10-mediated inhibition of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production in preterm human placenta. *J Reprod Immunol* 2006; 55:19-27.
35. Greig PC, Herbert WN, Robinette BL, Teot LA. Amniotic fluid interleukin-10 concentrations increase through pregnancy and are elevated in patients with preterm labor associated with intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173:1223-7.
36. Cadet P, Rady PL, Tying SK, Yandell RB, Hughes TK. Interleukin-10 messenger ribonucleic acid in human placenta: Implications of a role for interleukin-10 in fetal allograft protection. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173:25-9.
37. Modestin-Sorrentino M, Smulian JC, Vintzileos AM, Sorrentino D, Ananth CV, Sharma S, Hanna NN. Variations in cervical IL-10 and IL-8 concentrations throughout gestation in normal pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 2007; 57:482-7.
38. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T. Cytokine production in chorioamnionitis. *J Reprod Immunol* 2000; 47: 185-96.
39. Niino H, Otsuka T, Kuga S, Nemoto Y, Abe M, Hara N, et al. IL-10 inhibits prostaglandin E2 production by lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *Int Immunol* 1994; 6: 661-4.
40. Mertz PM, DeWitt DL, Stetler-Stevenson WG, Wahl LM. Interleukin 10 suppression of monocyte prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production. *J Biol Chem* 1994; 269:21322-29.

41. Bry K, Hallman M .Transforming growth factor-beta opposes the stimulatory effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor on amnion cell prostaglandins E2 production: Implication for preterm labor. Am J Obstet Gynecol 1992; 167: 222-6.
42. Adamson S, Edwin SS, LaMarche S, Mitchell MD. Actions of interleukin-4 on prostaglandin biosynthesis at the chorion-decidual interface. Am J Obstet Gynecol 1993; 169: 1442-7.
43. Spaziani EP, Lantz ME, Benoit RR. The induction of cyclooxygenase-2 (COX-2) in intact human amnion tissue by interleukin-4. Prostaglandins 1998; 51:215-23.
44. Strachan T, Read AP. Genética Molecular Humana. 2ª edição. Porto Alegre: ArtMed, 2002.
45. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP. Biologia Celular e Molecular. 5ª edição. Porto Alegre: ArtMed, 2005.