

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 09/12/2022



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

Moisés Diôgo de Lima

**Análise dos mecanismos fisiopatológicos  
relacionados ao parto pré-termo: corioamnionite  
histológica, estresse oxidativo e apoptose.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Guimarães da Silva

Botucatu  
2016

Moisés Diôgo de Lima

**Análise dos mecanismos fisiopatológicos  
relacionados ao parto pré-termo: corioamnionite  
histológica, estresse oxidativo e apoptose.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Márcia Guimarães da Silva

Botucatu  
2016

---

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Lima, Moisés Diôgo.

Análise dos mecanismos fisiopatológicos relacionados ao parto pré-termo : corioamnionite histológica, estresse oxidativo e apoptose / Moisés Diôgo Lima. - Botucatu, 2016

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

Orientador: Márcia Guimarães da Silva

Capes: 40105008

1. Prematuros. 2. Corioamnionite. 3. Stress oxidativo. 4. Apoptose. 5. Gravidez - Complicações.

Palavras-chave: Apoptose; Corioamnionite; Estresse oxidativo; Infecção intra-amniótica; Prematuridade.

---

***Epígrafe***

---

*“Não existe verdade real nesse mundo apenas a percepção de cada um sobre ela”*

*Pensamento egípcio*

---

***Dedicatória***

---

*Dedico esse singelo trabalho à minha família; alicerce da minha existência.*

---

## ***Agradecimientos***

---

*Agradeço, sinceramente,*

*À Maria do Socorro Costa, secretária da Unidade Materno-infantil do Hospital  
Universitário Lauro Wanderley / Universidade Federal da Paraíba pela dedicação  
com que sempre me atendeu;*

*Aos meus colegas de trabalho da Unidade Materno-infantil do Hospital Universitário  
Lauro Wanderley / Universidade Federal da Paraíba pelo apoio constante no  
acompanhamento clínico das mulheres envolvidas nessa pesquisa;*

*Ao Professor Alexandre Rolim do Departamento de Cirurgia do Centro de Ciências  
Médicas / Universidade Federal da Paraíba pela gentileza em nos assessorar no  
laboratório de anatomia patológica do Hospital Universitário Lauro Wanderley /  
Universidade Federal da Paraíba;*

*Aos colegas de turma do programa DINTER - UNESP/ UFPE pela simpatia dos  
nossos encontros;*

*À coordenação do Programa de Dinter UNESP/UFPE pela iniciativa em proporcionar  
essa oportunidade. À secretária do Programa de Pós-Graduação em Patologia,  
UNESP, pela atenção dedicada à parte burocrática do processo de Pós-Graduação;*

*À Capes, pelo financiamento do Programa Dinter UNESP/UFPE;*

*Aos colegas Professores do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Centro  
de Ciências Médicas da Universidade Federal da Paraíba pelo incentivo;*

*Em especial à Laura Fernandes Martin e aos demais pós-graduandos do Laboratório  
de Imunopatologia da Relação Materno Fetal do Departamento de Patologia da  
Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pela contribuição em momentos  
cruciais desse trabalho;*

*À Professora Doutora Márcia Guimarães da Silva pela competente e amigável  
orientação acadêmica.*

---

***Resumo***

---

O parto pré-termo espontâneo, definido como nascimento antes das 37 semanas completas de gestação apesar dos consideráveis avanços científicos ainda representa um importante problema médico, humano e social. É representado por dois grandes grupos de patologias obstétricas definidas como Trabalho de Parto Prematuro (TPP) e Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo (RPM-PT). O primeiro objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) em membranas corioamnióticas de gestações complicadas pela prematuridade. Neste estudo transversal, foram estudadas 31 membranas corioamnióticas de gestações complicadas por TPP e 35 com RPM-PT cujos partos ocorreram no período compreendido para a prematuridade. Como grupo controle foram incluídas 37 membranas corioamnióticas de partos a termo. As membranas corioamnióticas foram coletadas e a extração total de DNA foi realizada pelo Kit genomic-Prep Mini Spin e os níveis de 8-OHdG foram analisados pela técnica de ELISA empregando-se o kit Highy Sensitive 8-OHdG. Em relação aos dados obtidos, os níveis de 8-OHdG (2,90 ng/mL [1,54 – 4,06]) nas membranas corioamnióticas do grupo termo foram significativamente maiores que no grupo de partos prematuros (0,61ng/mL [mínimo: 0,37 – máximo: 0,92]) ( $p < 0,0001$ ). Os níveis de 8-OHdG foram também mais elevados no grupo de termo do que nos grupos PTL (0,71 ng/mL [mínimo: 0,40 – máximo:1,47]) ou RPM-PT (0,53 [mínimo: 0,37 – máximo: 0,71]) ( $p < 0,0001$ ), respectivamente. Nossos dados reforçam a tese que os danos oxidativos estão presentes nas membranas corioamnióticas de gestações a termo como consequência de um processo fisiológico do envelhecimento dos tecidos gestacionais. O segundo objetivo deste estudo foi analisar a associação entre corioamnionite histológica, ocorrência de apoptose e níveis de 8-OHdG em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por RPM-PT e TPP. Foi realizado um estudo prospectivo e um total de 60 gestantes foram recrutadas, sendo 31 gestações complicadas por RPM-PT e 29 com TPP. Após o parto, as membranas corioamnióticas foram submetidas ao exame histopatológico, à análise dos níveis de 8-OHdG por ELISA, empregando-se o kit Highy Sensitive 8-OHdG, e quanto a ocorrência de apoptose pela imunomarcagem da proteína p53. A corioamnionite histológica foi detectada em 64,5% das membranas corioamnióticas do grupo RPM-PT e em 44,8% do grupo TPP ( $p = 0,12$ ). A ocorrência de apoptose no grupo RPM-PT (32,2%) foi semelhante no grupo TPP (24,1%) ( $p=0,48$ ). Os níveis de 8-OHdG no grupo TPP [0,71 (mínimo: 0,43 – máximo: 1,38)] foram significativamente maiores do que no grupo RPM-PT [0,53 (mínimo: 0,37- máximo: 0,69)] ( $p = 0,02$ ). A análise de regressão logística entre esses mecanismos demonstra que apenas a corioamnionite histológica está relacionada à apoptose (OR = 3,7; IC 95% = 1,19-14,9;  $p = 0,04$ ). Concluímos que entre os fatores analisados a corioamnionite e a imunomarcagem da proteína p53 foram mais prevalentes no grupo de mulheres acometidas pela RPM-PT, que os níveis de 8-OHdG foram mais elevados no grupo de

---

mulheres acometidas pelo TPP e que entre estes fatores a corioamnionite histológica parece estar mais claramente associada à ocorrência de apoptose em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por prematuridade espontânea. O terceiro objetivo deste estudo foi analisar a associação de desfechos neonatais adversos, especialmente a sepse neonatal precoce, em gestações complicadas por RPM-PT e TPP na presença de corioamnionite histológica. Foi realizado um estudo caso-controle e um total de 73 gestantes foram incluídas no estudo, sendo 39 gestantes com RPM-PT e 34 com TPP. Após o parto, as membranas foram submetidas ao exame histopatológico e os recém-nascidos foram avaliados para o diagnóstico de eventos adversos: escore de Apgar <7 aos 5 min e 10 min, admissão em unidade de terapia intensiva neonatal, dificuldade respiratória, intubação traqueal e sepse neonatal precoce (SNP), esta última definida como sendo uma síndrome clínica observada nas primeiras 72 h de vida do recém-nascido. Em ambos os grupos as características maternas e neonatais (idade materna, índice de massa corpórea, etnia, paridade, idade gestacional e peso do recém-nascido) não foram significativamente diferentes. Entre as variáveis analisadas no contexto da prematuridade observamos que a SNP foi a mais prevalente no grupo RPM-PT e corioamnionite distinguindo-se estatisticamente ( $p = 0,04$ ). Os outros desfechos neonatais adversos não mostraram diferença estatística entre si ou entre as patologias obstétricas envolvidas na pesquisa. No modelo de regressão logística, verificou-se que a presença de corioamnionite histológica (OR = 7,4, IC 95%: 1,95-35,9,  $p = 0,0005$ ), a dificuldade respiratória (OR = 3,5; IC 95%: 1,02-12,9;  $p = 0,049$ ) e RPM-PT (OR = 9,8; IC95%: 2,95-38,5;  $p = 0,0004$ ), entre as variáveis independentes, influenciaram diretamente a ocorrência de SNP. A análise da curva ROC reforça a tese que a corioamionite e a RPM-PT são critérios relevantes para o evento de SNP com índices de sensibilidade de 76% e especificidade de 82%, respectivamente. Conclui-se que a corioamnionite histológica e a ocorrência de RPM-PT estão associadas a desfechos neonatais adversos, especialmente a ocorrência de sepse neonatal precoce.

**Palavras-chave:** Prematuridade, corioamnionite histológica, estresse oxidativo e apoptose.

---

***Abstract***

---

Spontaneous preterm birth, defined as birth before 37 weeks completed gestation, despite the considerable scientific advances, still represents an important medical problem, human and social. It is represented by two large groups of obstetric pathologies defined as preterm labor (PTL) and premature rupture of preterm ovular membranes (pPROM). The first objective of this study was to evaluate the levels of 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in amniochorion membranes from pregnancies complicated by prematurity. In this cross-sectional study, were enrolled 31 with PTL and 35 with pPRM who presented preterm delivery. As control group was included 37 pregnant women that delivery at term. Amniochorion membranes were collected and total DNA extraction was performed by ILLUSTRATE tissue & cells genomic-Prep Mini Spin Kit and 8-OHdG levels were measured by an ELISA Highly Sensitive 8-OHdG Check kit. Regarding to data, 8-OHdG levels in amniochorion membranes of term group (2,90 ng/mL [min: 1,54 – max:4,06]) were significantly higher than premature group (0,61 ng/mL [min: 0,37 – max:0,91]) ( $p < 0.001$ ). 8-OHdG levels were also higher in term group than in PTL (0,71 ng/mL [min: 0,40 – max:1,47]) or pPROM groups (0,53 ng/mL [min: 0,37 – max:0,71]) ( $p < 0.001$ ), respectively. Our data reinforces that oxidative damage are present at term pregnancies as physiologic process of amnionchorion aging. The second objective of this study was to analyze the association among histologic chorioamnionitis, apoptosis occurrence and 8-OHdG levels in amniochorion membranes from pregnancies complicated by pPROM and PTL. It was a prospective study and a total of 60 pregnant women were enrolled, being 31 pregnant women who presented pPROM and 29 with PTL. After delivery, the amniochorion membranes were subjected to a histopathological examination, to 8-OHdG levels analysis by an ELISA Highly Sensitive 8-OHdG Check kit and occurrence of apoptosis by p53 protein immunohistochemical study. Histologic chorioamnionitis was detected in 64.5% of the amniochorion membranes from pPROM group and in 44.8% from PTL group ( $p = 0.12$ ). The occurrence of apoptosis in the pPROM group (32.2%) was similar in the PTL group (24.1%) ( $p = 0.48$ ). The 8-OHdG levels in the PTL group [0.71 (0.43-1.38)] were significant higher than in the pPROM group [0.53 (0.37-0.69)] ( $p = 0.02$ ). Logistic regression analysis among these mechanisms showed that only histologic chorioamnionitis is related to apoptosis (OR=3.7; 95%CI= 1.19-14.9;  $p = 0.04$ ). Histologic chorioamnionitis seems to be more clearly associated with apoptosis occurrence in amniochorion membranes from pregnancies complicated by spontaneous prematurity. The third objective of this study was to analyze the association of adverse neonatal outcomes, especially early neonatal sepsis (ENS), in pregnant women affected by pPROM and PTL in the presence of histologic chorioamnionitis. It was a case-control study and a total of 73 pregnant women were enrolled, being 39 pregnant women who presented pPROM and 34 with PTL. After delivery, the membranes were subjected to a histopathological examination

---

and the newborn infants were evaluated for the diagnosis of adverse events: Apgar score <7 at 5 min and 10 min, admission to a neonatal intensive care unit, respiratory distress, use of continuous positive airflow pressure (CPAP), tracheal intubation and early neonatal sepsis, defined as being a clinical syndrome observed in the first 72 h of life of the newborn. In both groups, the sample general characteristics (maternal age, body mass index, ethnicity, parity, gestational age, and weight of the newborn) were not statistically different. Except ENS, which was the most prevalent in the pPROM and chorioamnionitis groups ( $p=0.04$ ), the other neonatal adverse outcomes showed no statistical difference between them or between obstetric pathologies involved in the research. In a logistic regression model, we found that the presence of histologic chorioamnionitis (OR=7.4; 95%CI=1.95-35.9;  $p=0.0005$ ), respiratory distress (OR=3.5; 95%CI=1.02-12.9;  $p=0,049$ ) and pPRM (OR=9.8; 95%CI= 2.95-38.5;  $p=0.0004$ ) among the independent variables, directly influenced ENS occurrence. ROC analysis reinforced that choriamnionites and pPROM are as criteria of relevant sensitivity (76.0%) and specificity (82.0%) for the ENS event. We conclude that histological chorioamnionitis and the occurrence of pPROM are associated with adverse neonatal outcomes, especially the occurrence of early neonatal sepsis.

**Keywords:** Prematurity, histologic chorioamnionitis, oxidative stress, apoptosis.

---

## ***Lista de abreviaturas***

---

<b>AP-1</b>	Proteína Ativadora – 1
<b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b>	Ânion superóxido
<b>CAM</b>	Corioamnionite
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase – 2
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	Cátion Cobre
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ERNs</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>FADD</b>	Fas associado ao domínio de morte
<b>FasL</b>	Ligante para a proteína Faz
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	Cátion ferro
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>IIA</b>	Infecção intra-amniótica
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INF-<math>\alpha</math></b>	Interferon alfa
<b>INF-<math>\beta</math></b>	Interferon beta
<b>IRF3</b>	Fator regulador de interferon 3
<b>IRF7</b>	Fator regulador de interferon 7
<b>kDa</b>	Quilo Dalton
<b>MDA</b>	Malonaldeído
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>MMP-2</b>	Metaloproteinase-2
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear $\kappa$ B
<b>OGG1</b>	Oxoguanina glicosilase
<b>PAMPs</b>	Padrões moleculares associados a patógenos
<b>ONOO<sup>·-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>P38MAPK</b>	Proteinoquinase ativada por mitógeno
<b>Ras-GTPase</b>	Trifosfato guanosina hidroxilase
<b>RL</b>	Radical livre
<b>OH<sup>·</sup></b>	Radical hidroxil
<b>NO<sub>2</sub></b>	Radical nitro
<b>RPMO-PT</b>	Rotura prematura de membranas ovulares pré-termo
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TBAR</b>	Reagente do ácido tiobarbitúrico
<b>TIMP</b>	Fator tecidual inibidor de metaloproteinase
<b>TIR</b>	Receptor Toll/IL -1
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>TPP</b>	Trabalho de parto prematuro
<b>TRADD</b>	Receptor TNF associado ao domínio de morte
<b>8-OHdG</b>	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
<b>3-NT</b>	3-nitrotirosina

---

## ***Sumário***

---

## Sumário

<b>Capítulo I</b> .....	20
<b>1. Revisão da literatura</b> .....	21
1.1. Prematuridade: conceito, incidência e fatores de risco .....	22
1.2. Mecanismos fisiopatológicos propostos para o determinismo do Trabalho de Parto Pré-Termo .....	24
1.3. Aspectos gerais acerca da anatomofisiologia das membranas corioamnióticas e mecanismo inflamatório dos tecidos gestacionais .....	26
1.4. A formação de radicais livres e o estado de estresse oxidativo .....	33
1.5. O estresse oxidativo e a sua participação no trabalho de parto prematuro e rotura prematura das membranas ovulares pré-termo .....	36
1.6. Fundamentos básicos dos mecanismos ativadores da apoptose nos tecidos gestacionais ..	38
2. Justificativa .....	42
3. Objetivo geral .....	45
3.1. Objetivos específicos .....	45
4. Referências bibliográficas .....	46
<b>Capítulo II</b> .....	55
5. Artigo Científico I .....	56
5.1. <b>8-Oxo-2'-Deoxiguanosine levels in amniochorion membranes from pregnancies complicated by prematurity</b> .....	57
5.2. Abstract .....	58
5.3. Introduction .....	59
5.4. Material and Methods .....	60
5.5. Results .....	62
5.6. Discussion .....	64
5.7. Conclusion .....	65
5.7. References .....	65
6. Artigo Científico II .....	68
6.1. <b>p53 Protein expression (Apoptosis) in fetal membranes: Association between histological chorioamnionitis</b> .....	69
6.2. Abstract .....	70
6.3. Introduction .....	71
6.4. Material and Methods .....	73
6.5. Results .....	77
6.6. Discussion .....	80
6.7. References .....	83
7. Artigo Científico III .....	86
7.1. <b>Adverse neonatal outcomes in pregnancy complicated by premature rupture of ovular pre-term membranes and premature labor related to histological chorioamnionitis</b> .....	87
7.2. Abstract .....	88
7.3. Introduction .....	89
7.4. Material and Methods .....	90
7.5. Results .....	93
7.6. Discussion .....	97
7.7. References .....	100
<b>Conclusões</b> .....	103
<b>Anexos</b> .....	105
8. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa .....	106

---

52. Lee SM, Lee KA, Kim SM, et al. The risk of intra-amniotic infection, inflammation and histologic chorioamnionitis in term pregnant women with intact membranes and labor. *Placenta* 2011;32:516-521.
53. Lee SM, Park JW, Kim BJ, et al. Acute histologic chorioamnionitis is an risk factor for adverse neonatal outcome in late preterm birth after preterm premature rupture of membranes. *PLoS One* 2013; 8:e79941.
54. Thomas W, Speer CP. Chorioamnionitis: important risk factor or innocent bystander for neonatal outcome? *Neonatology* 2011; 99:177-187.
55. Dexter SC, Malee MP, Pinar H, et al. Influence of chorioamnionitis on developmental outcome in very low birth weight infants. *Obstet Gynecol* 1999; 9:267-273.
56. Ahn HM, Park EA, Cho SJ, et al. The association of histological chorioamnionitis and antenatal steroids on neonatal outcome in preterm infants born at less than thirty-four weeks gestation. *Neonatology* 2012;102:259-264.
57. Bersani I, Thomas W, Speer CP. Chorioamnionitis – the good or the evil for neonatal outcome? *Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25:12-16.

**Considerando o tamanho amostral incluído nesse estudo bem como as metodologias empregadas para atingir os objetivos propostos, podemos concluir que:**

- 1) Nossos dados reforçam que os danos oxidativos estão presentes em gestações a termo como processo fisiológico do envelhecimento das membranas corioamnióticas;
  - 2) A corioamnionite histológica, entre os mecanismos analisados, parece estar mais claramente associada à ocorrência de apoptose em membranas corioamnióticas de gestações complicadas pela prematuridade espontânea.
  - 3) A Rotura Prematura de Membras Pré-Termo e a corioamnionite histológica estão associadas a desfechos neonatais adversos, especialmente à ocorrência de sepse neonatal precoce.
-