

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

**Expressão de Pentraxina 3 em Membranas Corioamnióticas de
Gestações Pré-Termo complicadas por Trabalho de Parto Prematuro ou
Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo na presença de
corioamnionite histológica**

Amanda Manoel Della Coletta

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Guimarães da Silva

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, como exigência parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Botucatu – SP
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Della Coletta, Amanda Manoel.

Expressão de Pentraxina 3 em membranas corioamnióticas de gestações pré-termo complicadas por rotura prematura de membranas pré-termo ou trabalho de parto prematuro / Amanda Manoel Della Coletta. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Márcia Guimarães da Silva

Coorientador: José Carlos Peraçoli

Jossimara Polettini

Capes: 40103005

1. Genética - Expressão. 2. Gravidez – Complicações. 3. Parto (Obstetrícia). 4. Trabalho de parto – Complicações e sequelas. 5. Membranas fetais. 6. Placenta – Infecções.

Palavras-chave: Corioamnionite histológica; Expressão gênica; Membranas corioamnióticas; Pentraxina 3.

“Deus ao mar o perigo e o abismo deu,

Mas nele é que espelhou o céu.”

Fernando Pessoa

Dedicatória

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, que muitas vezes deixou seus sonhos de lado pra acreditar nos meus.

Aos meus pais, Luiz Antônio e Silvana, por serem pessoas sensacionais, sem as quais eu nunca chegaria até aqui.

Às minhas irmãs, Isabela e Renata, por estarem comigo sempre.

Amo todos vocês.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por ter permitido que eu tivesse possibilidade de passar por diversas situações e aprender muito em cada uma delas.

À minha orientadora professora Márcia Guimarães da Silva, por compartilhar todo o seu conhecimento, ter me dado a oportunidade de viver em seu laboratório e ter tantas experiências que levarei por toda a vida.

Às meninas (Jô, Camila, Aline, Eliane, Mariana, Bruna, Larissa-Mam's, Nathalinha, Laura, Natália, Carol, Carolzinha e Niele-Lady) e ao menino (Gabriel) do laboratório, por estarem ao meu lado nesse ano, compartilhando experiências, me ensinando e me dando a oportunidade de crescer. Em especial, Carol e Natália, por dividirem o precioso tempo comigo, me dando todo o suporte e tendo paciência pra fazer com que eu pudesse me guiar com meus próprios passos. Aos meus queridos companheiros de laboratório e de conversas, Laura e Gabriel, obrigada por fazerem com que meus dias fossem mais leves e mais divertidos, me dando a oportunidade de aproveitar cada segundo da minha iniciação científica.

Aos meus amigos da XLV, Renata (Trident), Juliana (Balsa), Cecília (Dupexe), Natália (Figs), Niele (Lady), Cristiane (Dofa) e Ana (Passa), por todos esses anos de muitas aulas, mas muitos momentos de diversão e companheirismo. Em especial, André (Qualy) e Carla (Caldo), obrigada por, junto comigo, formarem os três mosqueteiros. Amo vocês meus amigos, meus irmãos.

Aos meus amigos queridos, Bruno (Xigela), Marina (Hemácea), Larissa (Rasga) e Patrícia (Serosa), obrigada por fazerem parte da minha vida e por me mostrarem o quão prazeroso é ganhar alguns presentes do destino. À minha irmã, Bianca (Peks), por me mostrar que, muitas vezes, as mais gratas surpresas da vida estão ao nosso lado e também por me mostrar que um

sentimento lindo pode surgir de onde menos esperamos e ser pra sempre, mesmo que existam distâncias e adversidades.

À minha irmã de alma, Raíza, por estar ao meu lado em todos esses anos, sendo minha amiga, minha confidente. Obrigada por dividir comigo a sua história e me ajudar a sempre ir em busca dos meus sonhos. Amo você!

Ao Encontro Nacional de Biomedicina (ENBM) e à família que um dia construí, por me mostrarem que a universidade vai muito além da sala de aula e por estarem presentes nos melhores anos da minha vida.

Ao Departamento de Patologia e todos os seus funcionários, por permitirem que eu pudesse ter as melhores oportunidades.

A todas as mulheres dos grupos do meu projeto e a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse projeto.

À FAPESP, pela bolsa de iniciação científica concedida (Processo 2011/17140-4).

Sumário

1. Resumo.....	8
2. Introdução.....	10
3. Objetivo.....	15
4. Materiais e Métodos.....	16
4.1. Constituição dos grupos de estudo.....	16
4.2. Coleta das membranas corioamnióticas.....	17
4.3. Detecção de RNAm de PTX3 por PCR em tempo real.....	18
4.3.1. Extração de RNA.....	18
4.3.2. Obtenção de cDNA.....	19
4.3.3. PCR em tempo real.....	20
4.4. Detecção de proteína PTX-3 por <i>western blotting</i>	21
4.5. Análise estatística.....	22
5. Resultados.....	24
5.1. Característica das pacientes.....	24
5.2. Análise histopatológica das membranas corioamnióticas.....	26
5.3. Quantificação da expressão gênica de PTX3.....	26
5.4. Quantificação da expressão protéica de PTX-3.....	27
6. Discussão.....	28
7. Referências Bibliográficas.....	31

1. Resumo

Introdução: Pentraxina 3 (PTX3) é um componente essencial da resposta imune inata e age como receptores de reconhecimento de padrões (PPRs) reconhecendo produtos microbianos, opsonizando fungos, bactérias Gram positivas e negativas, além de apresentar a capacidade de ativar o sistema complemento. Poucos estudos na literatura mundial têm investigado a expressão de PTX3 nas complicações gestacionais associadas à invasão microbiana da cavidade amniótica e resultados conflitantes têm sido descritos. **Objetivo:** Avaliar a expressão gênica e protéica de PTX3 em membranas corioamnióticas de gestações pré-termo complicadas por Trabalho de Parto Prematuro (TPP) e bolsa íntegra ou Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo (RPM-PT), na presença de corioamnionite histológica (CA). **Pacientes e Métodos:** Foram incluídas no estudo 30 gestantes com TPP, sendo 15 na ausência e 15 na presença de corioamnionite histológica e 30 gestantes com RPM-PT, sendo 15 na ausência e 15 na presença de corioamnionite histológica. Cortes parafinizados foram encaminhados à análise histopatológica para confirmação de corioamnionite histológica. Outros fragmentos de 1cm² das membranas foram submetidos à extração de RNA total. Após a extração do RNA, as amostras com concentração entre 0,02 e 0,2µg/ µL de RNA foram submetidas à obtenção de cDNA para posterior utilização na quantificação da expressão gênica de PTX3 pela técnica da PCR em tempo real empregando-se o Sistema TaqMan[®] Gene Expression Assays. Fragmentos das mesmas amostras incluídas no estudo foram utilizados para verificar a expressão da proteína PTX-3 através da técnica de *Western Blotting*. **Resultados:** Dentre as 60 membranas corioamnióticas incluídas no estudo, 56 (93,3%) expressaram PTX-3. Não houve diferença estatisticamente

significativa na expressão de mRNA de PTX-3 ($p=0,137$) entre os grupos: RPM-PT na presença de CA (Md: 0.355; 0.11-1.03), RPM-PT na ausência de CA (Md: 0,049; 0.001-0.32), TPP na presença de CA (Md: 0.067; 0.02-1.73) e TPP na ausência de CA (Md: 0.184; 0.09-1.00). A expressão protéica de PTX-3 foi verificada em todas as amostras de membranas corioamnióticas processadas dos grupos de interesse e essa análise quantitativa encontra-se em fase de finalização. **Conclusão:** PTX-3 é expressa pelas membranas corioamnióticas e a expressão gênica não é modulada pela presença de corioamnionite histológica.

Palavras-chave: Gestação Pré-Termo, Rotura Prematura de Membranas, Trabalho de Parto Prematuro, Corioamnionite Histológica, Pentraxina 3.

2. Introdução

A interação entre o sistema imune materno e células fetais permite o desenvolvimento adequado do feto durante a gestação. O papel da interface materno-fetal é fundamental, pois garante o adequado desenvolvimento da gestação, promovendo tolerância ao aloenxerto enquanto mantém a resposta imune materna contra possíveis patógenos.

O conceito de que a placenta e seus anexos atuam como barreiras imunológicas contra a invasão de patógenos na cavidade amniótica baseia-se em estudos que demonstram que esses tecidos expressam agentes antimicrobianos³ e componentes do sistema imune inato⁴. O sistema imune inato atua como primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos. Os receptores do sistema imune inato são conhecidos como receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), os quais são capazes de reconhecer regiões microbianas denominadas padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs)⁵. Diferentes PRRs interagem com diferentes PAMPs, ativando vias de sinalização específicas⁵. Dentre as principais funções dos PRRs destacam-se opsonização, ativação do sistema complemento, fagocitose, indução de apoptose e ativação de vias de sinalização de citocinas pró-inflamatórias⁶.

As pentraxinas são uma família de PRRs solúveis constituídas por diversas proteínas multifuncionais conservadas, sendo detectadas dos aracnídeos até os mamíferos⁷. Essas proteínas caracterizam-se por estrutura multimétrica e presença de uma região de cerca de 200 aminoácidos na porção carboxiterminal, conhecida como *domínio pentraxina*⁸. Tendo como base a estrutura primária dos seus monômeros, as pentraxinas são subdivididas em dois grupos, as moléculas de cadeia

curta e as moléculas de cadeia longa. A proteína C-reativa (PCR) e o componente amilóide P (SAP) são exemplos clássicos de pentraxinas de cadeia curta, produzidas predominantemente por hepatócitos, enquanto que o protótipo de pentraxina de cadeia longa é a pentraxina 3 (PTX3).

A PTX3, primeira pentraxina de cadeia longa a ser identificada na década de 1990⁹, também conhecida como gene 14 estimulado por Fator de Necrose Tumoral (TNF), é uma proteína de 381 aminoácidos com peso molecular de 40kD e seu gene está localizado no cromossomo 3⁹⁻¹¹. É rapidamente produzida e liberada por muitos tipos celulares após ativação, em particular por macrófagos, células dendríticas, fibroblastos e células endoteliais em resposta a sinais inflamatórios, tais como interleucina (IL-)1, TNF- α e ativação de Receptores *Toll-like* (TLR)¹²⁻¹⁶. A PTX3 é ainda expressa por monócitos do sangue periférico após estimulação com componentes microbianos como lipopolissacárides (LPS), enquanto IL-6, MCP-1, M-CSF, GM-CSF ou IFN- γ não são potentes indutores de PTX3¹⁷⁻²⁰.

A PTX3 está também presente em grânulos de neutrófilos²¹, agindo como reservatório para rápida liberação após reconhecimento microbiano¹⁷. Células dendríticas produzem altas concentrações de PTX3 em resposta à LPS ou agonistas de TLRs, como peptidoglicano (TLR-2), fita dupla de DNA (TLR-3), *Candida* spp. (TLR-4) e flagelina (TLR-5)^{22,23}. Em contraste aos neutrófilos, células dendríticas e macrófagos produzem PTX3 *de novo* em resposta aos sinais inflamatórios¹⁷.

As propriedades multifatoriais dessa proteína devem-se, principalmente, à sua capacidade de interagir com diversos ligantes. A PTX3 liga-se a conídios de *Aspergillus fumigatus*, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, além de partículas virais^{20,24-27}.

A PTX3 desempenha papel importante na regulação da resistência inata à patógenos. Células da resposta imune inata produzem PTX3 em resposta a sinais inflamatórios como ativação de TLRs, agindo como proteína de resposta de fase

aguda. Somado a isso, sob condições normais, sua concentração no plasma é baixa (<2ng/mL), mas aumenta rapidamente, em picos de 6 a 8 horas, em pacientes com resposta inflamatória sistêmica, sepse, choque séptico ou outras condições infecciosas e inflamatórias, sempre correlacionada com a severidade da doença^{18,28}.

Estudos recentes demonstram que, durante a gestação, a concentração de PTX3 encontra-se aumentada em relação à concentração dessa proteína em não-gestantes^{16,29}, porém os resultados dos estudos que avaliaram as alterações da concentração de PTX3 ao longo da gestação são conflitantes. Rovere-Querini et al.¹⁶ relataram aumento de PTX3 no soro materno com o avanço da idade gestacional e altas concentrações durante o trabalho de parto¹⁶, enquanto Cetin et al.²⁹ não encontraram diferenças nas concentrações de PTX3 durante o progresso gestacional. Segundo Larsson et al.³⁰, os níveis de PTX3 aumentam continuamente no soro durante a gestação normal e essa evidência foi mais acentuada após a 31ª semana de gestação, com níveis mais elevados imediatamente antes do parto e decréscimo no puerpério. Entretanto, esse estudo apresenta limitações relacionadas ao número reduzido de mulheres estudadas além do desconhecimento dos grupos étnicos incluídos no estudo.

Cruciani et al.³¹ demonstraram que PTX3 é um constituinte normal do líquido amniótico (LA) e que sua concentração é significativamente elevada na presença de infecção/inflamação intra-amniótica (IAI), sugerindo que a PTX3 desempenha um papel importante na resposta imune inata contra invasão microbiana da cavidade amniótica. A origem da PTX3 presente no LA ainda permanece incerta, porém diversas fontes têm sido sugeridas, entre elas a expressão de PTX3 pelas membranas corioamnióticas^{16,32}. Roveri-Querini¹⁶ detectaram, pela técnica de imunistoquímica, a expressão de PTX3 no epitélio amniótico e no cório de membranas corioamnióticas de gestações normais. O mesmo trabalho demonstrou maior expressão de PTX3 em membranas corioamnióticas de gestações

complicadas por corioamnionite histológica¹⁶, sugerindo que as membranas corioamnióticas atuam como fonte de PTX3 nos casos de IAI.

O estudo da PTX3 em complicações gestacionais também é recente^{16,29,31,33-37} e os resultados são ainda mais controversos. Assi et al.³⁶ apesar de terem relatado elevadas concentrações de PTX3 no plasma materno de gestantes em Trabalho de Parto Prematuro (TPP) com membranas íntegras e em TPP com Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo (RPM-PT) que tiveram a resolução da gestação anterior à 34 semanas, não concluíram que infecção da cavidade amniótica esteve associada com significantes mudanças nas concentrações de PTX3.

Os achados de IAI associada a níveis elevados de PTX3 em gestações complicadas por TPP ou RPM-PT na presença de corioamnionite histológica também são muito recentes. Cruciani et al.³⁸ demonstraram que, em gestantes com RPM-PT ou TPP, a presença de IAI foi associada com aumento de 12 a 20 vezes na concentração de PTX3 no LA respectivamente⁵. Similarmente, gestantes que apresentaram corioamnionite histológica tiveram aumento significativo de 22 vezes na concentração de PTX3 no LA quando comparado com mulheres que não apresentaram resposta inflamatória nos tecidos gestacionais. Nesse sentido, Greco et al.³² relataram elevadas concentrações de PTX3 no LA coletado do *fornix* vaginal de gestantes que apresentaram RPM-PT e a concentração de PTX3 esteve relacionada com presença de corioamnionite histológica.

Considerando a importância da PTX3 na regulação da resposta imune inata através do reconhecimento de microrganismos envolvidos na invasão microbiana da cavidade amniótica e que essa infecção desempenha papel importante na ativação da resposta inflamatória das membranas corioamnióticas, além da escassez de trabalhos na literatura avaliando a expressão dessa proteína em tecidos gestacionais, o estudo da expressão gênica e proteica da PTX3 poderá contribuir

para o entendimento do papel da imunidade inata nas gestações complicadas por TPP ou RPM-PT.

3. Objetivo

O objetivo do estudo foi avaliar a expressão gênica e protéica de PTX3 em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por Trabalho de Parto Prematuro (TPP) e bolsa íntegra ou Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo (RPM-PT) na presença de corioamnionite histológica.

4. Materiais e Métodos

4.1 Constituição dos grupos de estudo

Foi realizado estudo transversal no qual foram incluídas no estudo 60 gestantes que apresentaram TPP e bolsa íntegra ou RPM-PT e parto prematuro como desfecho gestacional, na presença ou não de corioamnionite histológica, constituindo os seguintes grupos de estudo:

G1: TPP na ausência de corioamnionite histológica (n=15)

G2: TPP na presença de corioamnionite histológica (n=15)

G3: RPM-PT na ausência de corioamnionite histológica (n=15)

G4: RPM-PT na presença de corioamnionite histológica (n=15)

O cálculo do tamanho amostral do estudo transversal prospectivo foi baseado na média de expressão de PTX3 em membranas corioamnióticas, em estudo piloto de gestações normais, considerando que a expressão de PTX3 esteja aumentada em 10% nos casos de RPM-PT ou TPP e considerando um erro do tipo I de 5% e erro do tipo II de 20% e resultou em 15 pacientes por grupo.

As gestantes foram consideradas normais quando não apresentaram complicações, nem médicas nem obstétricas, e quando o parto ocorreu em idade gestacional de termo, com apropriado peso do recém-nascido ao nascimento.

Para se estabelecer a idade gestacional das pacientes incluídas no estudo foi avaliada a data da última menstruação e/ou o exame ultra-sonográfico precoce (até 20 semanas). Nas gestantes que apresentaram RPM-PT, o diagnóstico 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 azul de Nilo³⁹. O diagnóstico de TPP foi confirmado pela presença de uma ou mais contrações a cada 10 minutos com ritmo e frequência regulares e esvaecimento cervical igual ou superior a 50% e/ou dilatação cervical igual ou superior a 2 cm⁴⁰.

Foram excluídas do estudo pacientes que apresentaram síndrome anticorpos anti-fosfolípides, síndrome HELLP, incompetência istmo-cervical, descolamento prévio de placenta, placenta prévia, incompatibilidade de RH, trauma mecânico, oligoâmnio ou polidrâmnio, gestantes com restrição de crescimento intra-uterino, má formação fetal ou óbito fetal e, pólipos endocervicais. Gestantes acometidas por doenças ou infecções sistêmicas como lúpus eritematoso sistêmico, hipertensão arterial crônica, doenças na tireóide, ou soropositividade para HIV, assim como pacientes que tenham sido submetidas à amniocentese ou fertilização *in vitro* ou que façam uso de drogas e álcool também foram excluídas do estudo.

Todas as gestantes do estudo foram informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.(Protocolo CEP 3161-2009).

4.2 Coleta de membranas corioamnióticas

No momento da resolução da gestação, logo após a dequitação, foram coletadas membranas corioamnióticas de todas as gestantes do estudo. Fragmentos de 1 cm² da borda das membranas foram coletados em condições estéreis e acondicionados em tubos de 1,5 mL tipo *ependorf* contendo solução estabilizadora de RNA (RNA later - Qiagen[®]) por 4 horas. Após esse período, os fragmentos foram transferidos para novo tubo de 1,5 mL e armazenados a -80°C.

As membranas corioamnióticas foram acondicionadas em recipiente apropriado contendo formol a 10% para a fixação do material. Após a fixação, fragmentos das membranas corioamnióticas foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol e a seguir incluídos em blocos de parafina. Os blocos de parafina obtidos foram seccionados em micrótomo comum, obtendo-se cortes de 4 μm de espessura, os quais foram montados 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 Yoon et al⁴¹.

4.3 Detecção de RNAm de PTX3 por PCR em tempo real

4.3.1 Extração de RNA

Os fragmentos de membranas corioamnióticas coletados conforme descrito no item 4.2 foram retirados dos tubos tipo *ependorf* e submetidos à extração de RNA total, usando o kit RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare). Com o auxílio de um bisturi foi obtida quantidade de 30 mg de tecido, a qual foi macerada em cadinho contendo nitrogênio líquido, com posterior adição de 350 μL de tampão RA1 acrescido de β - mercaptoetanol e lise em vórtex. A seguir, o tecido lisado foi transferido para um filtro com tubo coletor e centrifugado por 1 minuto a 11.000g. Após a centrifugação, o filtro foi descartado e o filtrado transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Foram adicionados 350 μL de etanol 70% e o conteúdo dos tubos foi homogeneizado no vórtex por 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 o material foi centrifugado por 1 minuto a 11.000g para a secagem da membrana de gel-sílica. Após centrifugação, o filtrado foi descartado e o tubo coletor colocado de volta na coluna. As amostras foram

submetidas ao tratamento com a enzima DNase livre de RNase, com objetivo de eliminar possível contaminação com DNA residual genômico. Posteriormente, foi realizado o processo de lavagem do material, no qual primeiramente foram adicionados 200 μ L de tampão RA2 com centrifugação por 1 minuto a 8.000g. Em seguida as colunas foram transferidas para novos tubos coletores, nos quais foram adicionados 600 μ L de tampão RA3. Os novos tubos coletores foram, então, centrifugados por 1 minuto a 11.000 g e, após descarte do conteúdo do tubo coletor, foram adicionados 250 μ L de tampão RA3, com centrifugação por 2 minutos a 11.000g. As colunas foram transferidas para novos tubos de 1,5 μ L e o RNA extraído será eluído em 40 μ L de água RNase-free. Após o término da extração, a eficácia do tratamento com a DNase foi verificada por amplificação do gene constitutivo da β -globina por PCR direta seguida de visualização em gel de agarose 1,5%. Somente as amostras que não apresentaram essa amplificação foram incluídas no estudo.

4.3.2 Obtenção de cDNA

O RNA total extraído das membranas corioamnióticas foi quantificado por leitura em aparelho Epoch (Biotek), na absorbância de 260nm (A_{260}). A pureza do RNA obtido foi determinada pela razão da absorbância de 260 nm pela absorbância de 280nm (A_{260}/A_{280}). Foram consideradas aceitáveis as razões entre 1,8 e 2,1.

Em seguida à quantificação, as amostras com concentração entre 0,02 e 0,2 μ g/ μ L de RNA foram submetidas à obtenção de cDNA utilizando-se o *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems). As amostras com concentrações superiores foram diluídas em água livre de RNase.

Para cada amostra foi produzido um *mix* contendo 8 μ L de RT-buffer, 3,2 μ L de dNTP (100 mM), 8 μ L de *random primer*, 4 μ L de *multiscribe RT* e 16,8 μ L

de água livre de RNase, totalizando volume final de 40 μ L. Em seguida, foram adicionados 40 μ L de RNA em cada *mix*. Os tubos contendo *mix* e RNA foram acondicionados no termociclador e as condições da reação foram de 25°C por 10 minutos, seguidos de 37° por 120 minutos e 85°C por 5 segundos. Imediatamente após o término da reação as amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C para posterior quantificação da expressão dos genes de interesse.

4.3.3 PCR em tempo real

A partir do cDNA obtido foi efetuada a amplificação dos genes PTX3 (Hs00173615_m1) de acordo com o protocolo da Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays, em termociclador Line Gene K (Bioer®), no volume final de 20 μ L com adição de 5 μ L de cDNA das amostras na diluição 1:5. 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 TBP (TATA box binding protein) (Hs9999910_m1) como controle endógeno, visto que o valor real de expressão gênica foi dado através da comparação do resultado de amplificação dos genes PTX3 e desse gene constitutivo.

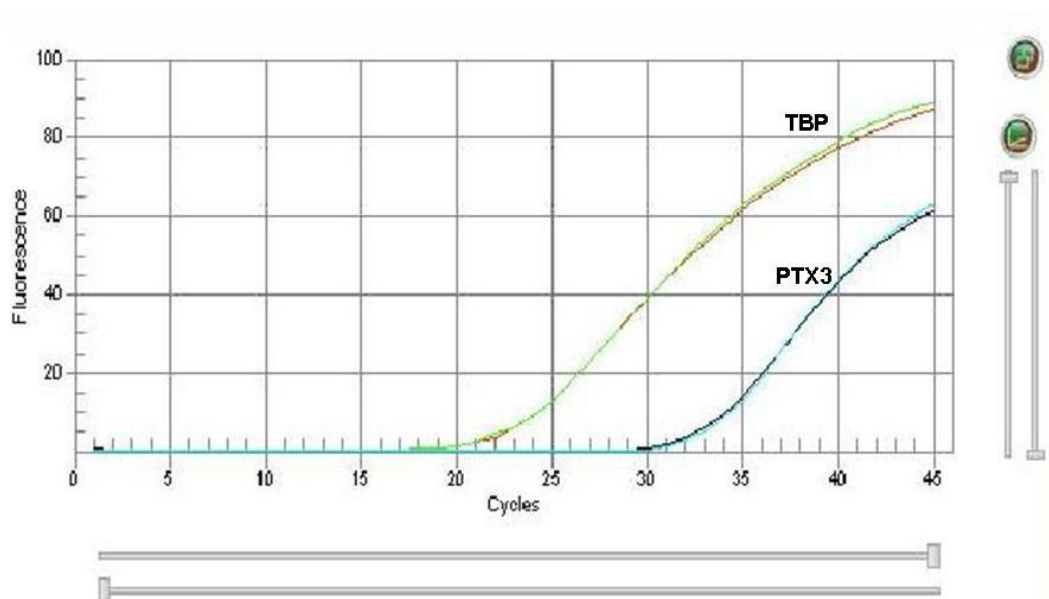


Figura 1: Amplificação da PCR em tempo real dos genes TBP (verde e vermelho, caracterizando duplicata) e PTX3 (azul e preto, caracterizando duplicata).

4.4 Detecção de proteína PTX3 por *Western Blotting*

Os fragmentos de membranas corioamnióticas armazenados a -80°C no Biobanco do Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno Fetal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, UNESP e as amostras coletadas no período do estudo foram utilizados para obtenção das proteínas totais de cada amostra. Para isso, os fragmentos foram homogeneizados em tampão de lise (Tris-HCl – 50mM pH 7.4, NaCl – 0.2 M, Triton X -100 0,1%, CaCl_2 - 10mM) acrescido de inibidor de protease na proporção de 30mg de tecido/ 100 μl de tampão. Após determinação da concentração de proteína total em cada amostra, pelo método de Bradford¹, as proteínas foram diluídas numa concentração de 50ng. Posteriormente, foi realizada eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

(SDS-PAGE), em condições redutoras previamente descritas por Laemmli², sob voltagem constante de 120V.

Em seguida, o gel foi transferido para um tampão de equilíbrio (Tris 25mM, glicina 192mM, metanol 20%, SDS 0,1%) por 15 minutos em agitação constante, seguido de incubação em tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192 mM, metanol 20%) por 15 minutos, também em agitação constante. O gel foi colocado em contato direto com a membrana de nitrocelulose em cassete apropriado, e submetido à eletroblotting para transferência das bandas para a membrana. Após a transferência, foi realizado o bloqueio dos sítios livres da membrana com solução de TBS-T (Buffer Tris Saline Tween) contendo leite desnatado em pó na concentração de 5% durante quarenta minutos à temperatura ambiente e agitação constante. Após 3 lavagens da membrana com TBS-T por 5 minutos, foi realizada a incubação com o anticorpo primário para PTX-3 anti-rabbit (1:500) (P 0496 - Sigma) e β -Actina anti-mouse (1:1000) (643802 - BioLegend) overnight a 4°C com agitação constante. As membranas então foram lavadas com TBS-T, e incubadas com o anticorpo secundário IgG anti-rabbit, conjugado à peroxidase (1:1000) (SAB Signalway Antibody). A revelação foi realizada com reagente quimioluminescente ECL (Amersham) por 3 minutos em contato com a membrana e reveladas em aparelho Alpha Innotech FluorChem® FC2 Imager.

4.5 Análise estatística

A variável idade das pacientes (anos) foi submetida ao teste de análise de variância para comparação entre os grupos. As variáveis estado civil, etnia, paridade e intercorrências gestacionais anteriores foram comparadas entre os grupos pelo Teste de comparação de proporções (Teste z). A comparação dos dados de PTX-3 e a idade gestacional no momento do parto entre os grupos foi realizada através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado para todos

os testes empregados foi de 5%. A análise estatística foi realizada utilizando o *software* Sigma Stat 9.0.

5. Resultados

5.1. Características das pacientes

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

As variáveis idade materna, paridade, intercorrências gestacionais anteriores, estado civil e etnia, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados.

Em relação à idade gestacional no momento do parto, observa-se que esta não apresentou diferença estatisticamente significativa nos grupos pré-termo, quando comparadas membranas corioamnióticas com ou sem corioamnionite histológica.

Tabela 1. Características sócio-demográficas e gestacionais das pacientes incluídas no estudo.

Variáveis	RPM-PT presença de corioamnionite (n=15)	RPM-PT ausência de corioamnionite (n=15)	TPP presença de corioamnionite (n=15)	TPP ausência de corioamnionite (n=15)
Idade (anos) *	25,3± 7,1 ^a	24,3± 5,3 ^a	20,3± 5,4 ^a	24,1± 5,8 ^a
Estado civil				
Solteira	30,8% (4/13) ^a	13,3% (2/15) ^a	26,7% (4/15) ^a	15,4% (2/13) ^a
União estável	69,2% (9/13) ^a	86,7% (13/15) ^a	73,3% (11/15) ^a	84,6% (11/13) ^a
Etnia				
Branca	93,3% (14/15) ^a	86,7% (13/15) ^a	73,3% (11/15) ^a	80,0% (12/15) ^a
Não- branca	6,7% (1/15) ^a	13,3% (2/15) ^a	26,7% (4/15) ^a	20,0% (3/15) ^a
IG no momento do parto (dias) ⁺	238 (214– 258) ^a	239 (200 – 258) ^a	231 (182– 252) ^a	227 (177 – 257) ^a
Paridade				
1	53,3% (8/15) ^a	40,0% (6/15) ^a	46,7% (7/15) ^a	33,3% (5/15) ^a
>1	46,7% (7/15) ^a	60,0% (9/15) ^a	53,3% (8/15) ^a	66,7% (10/15) ^a
Intercorrências gestacionais anteriores				
TPP	6,7% (1/15) ^a	14,3% (2/14) ^a	26,7% (4/15) ^a	38,5% (5/13) ^a
RPM-PT	7,1% (1/14) ^a	20,0% (3/15) ^a	13,3% (2/15) ^a	7,7% (1/13) ^a
Aborto	6,7% (1/15) ^a	28,6% (4/14) ^a	0,00% (0/15) ^a	50,0% (7/14) ^a

*valores expressos em média ± desvio padrão

+ valores expressos em MD (min-máx)

^a Letras iguais não denotam diferença estatística

RPM-PT: Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo

TPP: Trabalho de parto Prematuro

5.2. Análise histopatológica das membranas corioamnióticas

O diagnóstico de corioamnionite histológica foi confirmado pela presença de infiltrado neutrofílico nas membranas corioamnióticas, de acordo com Yoon et al.⁴¹ (Figura 2).

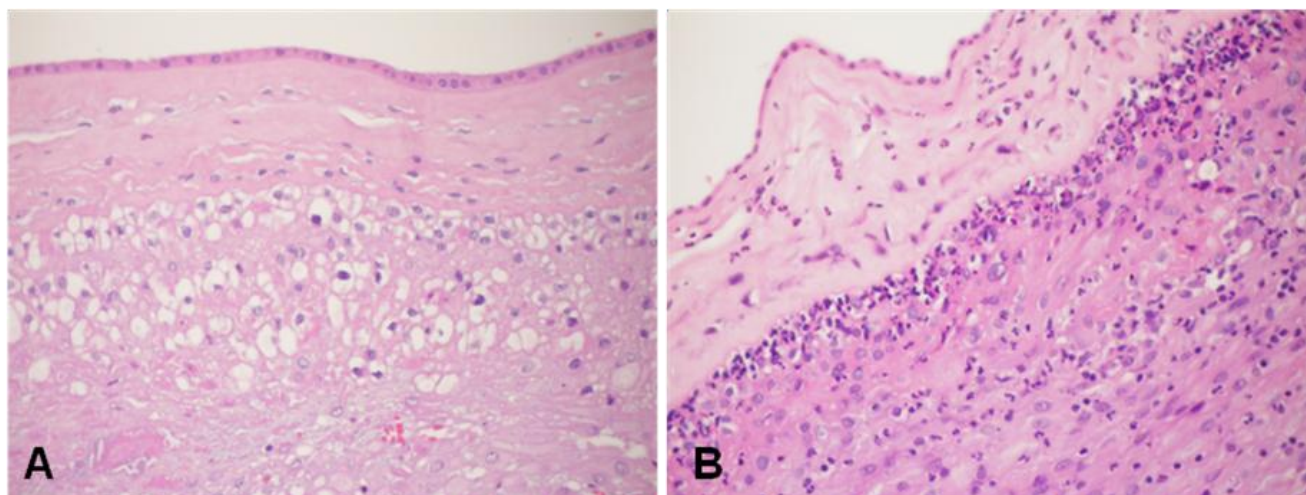


Figura 2. Fotomicrografia das membranas corioamnióticas **A.** Membranas corioamnióticas dentro dos limites de normalidade. Observa-se epitélio colunar em monocamada apoiado em tecido conjuntivo frouxo avascular. HE. 400x. **B.** Membranas corioamnióticas com intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear. HE. 400x.

5.3. Quantificação da expressão gênica de PTX-3

Para quantificar a expressão gênica de PTX-3, foi realizada a técnica de PCR em tempo real. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de RNAm de PTX-3 nas membranas corioamnióticas dos grupos RPM-PT e TPP com bolsa íntegra, tanto na presença quanto na ausência de corioamnionite histológica ($p=0,137$) (Figura 3).

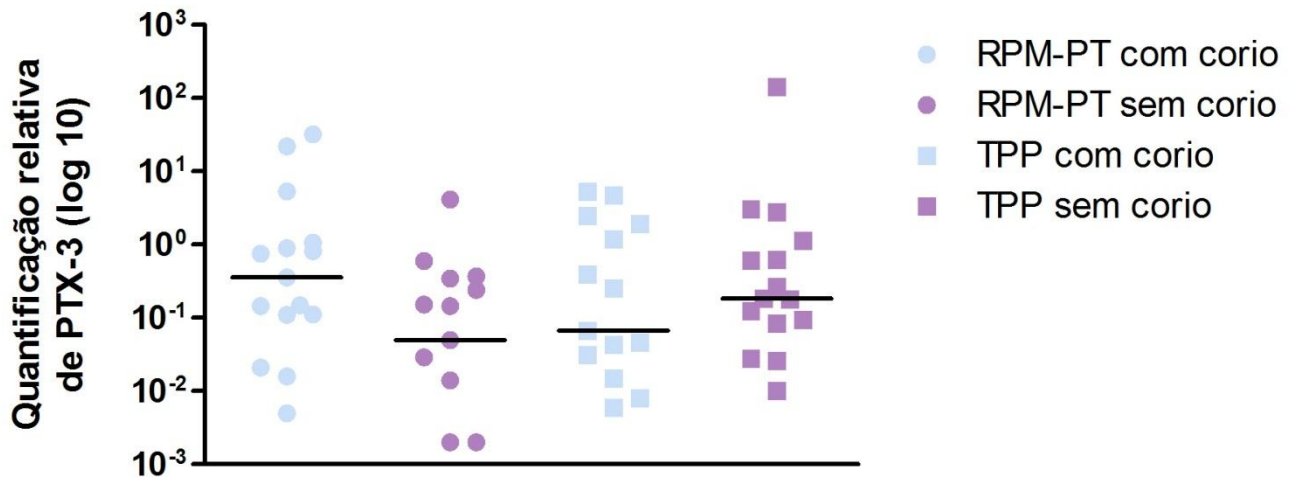


Figura 3. Quantificação relativa de PTX-3 em membranas corioamnióticas dos grupos RPM-PT na presença de corioamnionite histológica, RPM-PT na ausência de corioamnionite histológica, TPP na presença de corioamnionite histológica e TPP na ausência de corioamnionite histológica. Teste de Kruskal-Wallis; $p > 0,05$.

5.4. Quantificação da expressão protéica de PTX-3

A expressão protéica de PTX-3 foi verificada em todas as amostras de membranas corioamnióticas processadas até o momento dos grupos incluídos no estudo (Figura 4). Essa análise quantitativa está em fase de finalização.

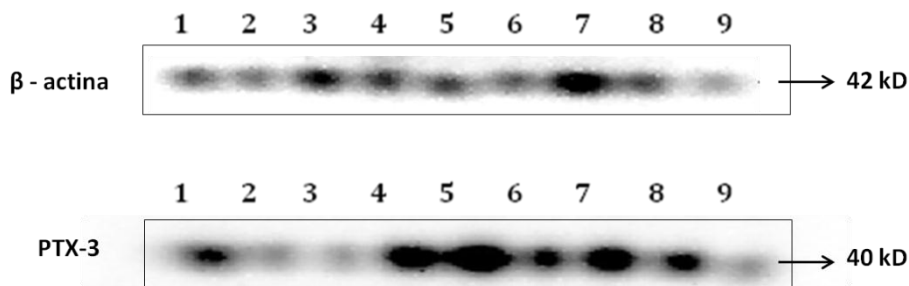


Figura 4. Análise por *Western blot* das membranas corioamnióticas utilizando anticorpo monoclonal anti-PTX-3.

6. Discussão

O objetivo desse estudo foi avaliar a expressão gênica e protéica de PTX3 pelas membranas corioamnióticas de gestações complicadas por RPM-PT ou TPP com bolsa íntegra na presença de corioamnionite histológica.

A PTX3 é rapidamente produzida e liberada por diversos tipos celulares como macrófagos, fibroblastos e células dendríticas após a ativação através de sinais inflamatórios¹²⁻¹⁶. É também armazenada em grânulos de neutrófilos²¹, sendo então considerados reservatórios de rápida liberação após reconhecimento microbiano. Células do sistema imune inato produzem PTX3 em resposta a sinais inflamatórios, portanto são consideradas proteínas de resposta de fase aguda.¹⁸⁻²⁸

Estudos recentes demonstraram que os níveis de PTX3 estão aumentados em gestantes quando comparados a não gestantes.^{16,29} Porém, esses resultados ainda são conflitantes.

Em estudo realizado por Cruciani et al.³¹, os dados demonstram que a PTX3 é um constituinte natural do líquido amniótico e a concentração encontra-se aumentada na presença de infecção/inflamação intra-amniótica, sugerindo que a PTX3 tem papel na resposta imune inata contra invasão microbiana da cavidade amniótica. A origem da PTX3 presente no LA ainda permanece incerta, contudo várias fontes são sugeridas, entre elas, as membranas corioamnióticas^{16,32}. Roveri-Querini¹⁶, descreve a expressão de PTX3 no epitélio amniótico de membranas corioamnióticas de gestações normais. Segundo esses mesmos autores, há elevação da expressão de PTX3 nas membranas corioamnióticas de gestações complicadas por corioamnionite histológica, quando comparadas com membranas na ausência de infiltrado inflamatório. Tal observação sugere que as membranas atuam

como potencial fonte adicional de PTX3 na presença de infecção da cavidade amniótica.

Em contraposição ao estudo de Roveri-Querini, no presente estudo não foi observada diferença nos níveis de PTX3 quando comparadas membranas com e sem infiltrado inflamatório, tanto no grupo TPP quanto no grupo RPM-PT. Porém, até o momento do estudo, apenas a quantificação de RNAm foi realizada e essa expressão não significa, necessariamente, produção de proteína. É importante salientar que todas as técnicas utilizadas para quantificação de RNAm proporcionam um nível de informação empírica e não uma condição estável absoluta. Além disso, sabe-se que a diferença na quantidade de um RNAm específico, entre duas amostras biológicas, não é necessariamente refletido por uma diferença quantitativa equivalente no nível de quantidade da proteína, que muitas vezes está implícito nos estudos. Existem, portanto, limitações intrínsecas da técnica, dentre as quais, a quantidade do RNA mensageiro nem sempre está correlacionada à quantidade da proteína; a sensibilidade e variação dinâmica dos métodos existentes são tais que os RNAm que estão em menos quantidade, potencialmente codificando as proteínas regulatórias mais importantes, não são facilmente medidos como acontece com os RNAm em maior quantidade; e a atividade das proteínas codificadas pelo RNAm é regulada em vários níveis após a sua expressão. Por exemplo, a localização subcelular e/ou a extensão em que as proteínas são pós-traducionalmente modificadas, não são reveladas pela medição da quantidade do RNAm⁴¹.

Para avaliar a quantidade de RNAm traduzido em proteína, a técnica de *Western Blotting* está sendo finalizada e assim será possível verificar o nível de tradução de pentraxina-3 das membranas corioamnióticas das gestantes incluídas no estudo. A expressão protéica de PTX-3 foi verificada em todas as amostras de membranas corioamnióticas processadas até o momento dos grupos incluídos no estudo.

Portanto, de acordo com as amostras incluídas no estudo e com a metodologia empregada, conclui-se que as membranas corioamnióticas expressam PTX3 e que a presença de infiltrado inflamatório, que caracteriza a corioamnionite histológica, não modula a expressão gênica.

7. Referências Bibliográficas

1. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding Anal. Biochem. 1976;72:248-254.
2. Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685.
3. King AE, Paltoo A, Kelly RW, *et al.* Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. Placenta 2007;28:161-9.
4. Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, *et al.* Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. Hum Pathol 2004;35:47-54.
5. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell 2006;124:783-801.
6. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol 2002;20:197-216.

7. Agrawal A, Singh PP, Botazzi B, *et al.* The long pentraxin PTX3 as a prototypic humoral pattern recognition receptor: interplay with cellular innate immunity. *Immunological Reviews* 2009;227:9-18.

8. Garlanda C, Maina V, Cotena A, *et al.* The soluble pattern recognition receptor pentraxin-3 in innate immunity, inflammation and fertility. *J Reprod Immunol.* 2009;83:128-33.

9. Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, *et al.* Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* 1992;267:22193-7.

10. Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, *et al.* Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* 1997;272:32817-23.

11. Mantovani A, Garlanda C, Botazzi B. Pentraxin 3, a nonredundant soluble pattern recognition receptor involved in innate immunity. *Vaccine* 2003;21 Suppl 2:S73-7.

12. Wisniewski HG, Vilcek J. Cytokine-induced gene expression at the crossroads of innate immunity, inflammation and fertility: TSG-6 and PTX3/TSG-14. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15 (2–3):129-46.

13. Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, *et al.* Pentraxins at crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol* 2005;23:337-66.

14. Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* 1983;34:141-212.

15. Alles VV, Bottazzi B, Peri G, *et al.* Inducible expression of PTX3, a new member of pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood* 1994;84(10):3483-93.

16. Rovere-Querini P, Antonacci S, Dell'Antonio G, *et al.* Plasma and tissue expression of the long pentraxin 3 during normal pregnancy and preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2006;108(1):148-55.

17. Bottazzi B, Garlanda C, Cotena A, *et al.* The long pentraxin PTX3 as a prototypic humoral pattern recognition receptor: interplay with cellular innate immunity. *Immunol Rev* 2009;227:9-18.

18. Bottazzi B, Garlanda C, Salvatori G, *et al.* Pentraxins as a key component of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2006;18:10-5.

19. Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, *et al.* Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol* 2005;23:337-66.

20. Jeannin P, Bottazzi B, Sironi M, *et al.* Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity* 2005;22:551-60.

21. Jaillon S, Peri G, Delneste Y, *et al.* The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med* 2007;204:793-804.

22. Doni A, Michela M, Bottazzi B, *et al.* Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma. *J Leukoc Biol* 2006;79:797-802.

23. Doni A, Peri G, Chieppa M, *et al.* Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003;33:2886-93.

24. Bozza S, Bistoni F, Gaziano R, *et al.* Pentraxin 3 protects from MCMV infection and reactivation through TLR sensing pathways leading to IRF3 activation. *Blood* 2006;108:3387-3396.

25. Diniz SN, Nomizo R, Cisalpino PS, *et al.* PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymozan by macrophages. *J Leukoc Biol* 2004;75:649-56.
26. Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, *et al.* Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* 2002;420:182-6.
27. Reading PC, Bozza S, Gilbertson B, *et al.* Antiviral activity of the long chain pentraxin PTX3 against influenza viruses. *J Immunol* 2008;180:3391–8.
28. Muller B, Peri G, Doni A, *et al.* Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. *Crit Care Med* 2001;29:1404-7.
29. Cetin I, Cozzi V, Pasqualini F, *et al.* Elevated maternal levels of the long pentraxin 3 (PTX3) in preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:1347-53.
30. Larsson A, Helmersson J, Axelsson O. Pentraxin 3 Values During Normal Pregnancy. *Inflammation* 2010 (In press).

31. Cruciani L, Romero R, Vaisbuch E, *et al.* Pentraxin 3 in maternal circulation: an association with preterm labor and preterm PROM, but not with intra-amniotic infection/inflammation. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010;23:1097-105.
32. Greco M, Nebuloni M, Garlanda C, *et al.* PTX3 Histological Expression in preterm premature rupture of membranes. *Reproductive Sciences* 2009;16:200A-200A.
33. Kacerovsky M, Tosner J, Drahosova M, *et al.* Pentraxin 3 in amniotic fluid as a marker of intra-amniotic inflammation in women with preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynaecol Obstet* 2010;108:203-6.
34. Akolekar R, Casagrandi D, Livanos P, *et al.* Maternal plasma pentraxin 3 at 11 to 13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy. *Prenat Diagn* 2009;29:934-8.
35. Cetin I, Cozzi V, Papageorghiou AT, *et al.* First trimester PTX3 levels in women who subsequently develop preeclampsia and fetal growth restriction. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009;88:846-9.
36. Assi F, Fruscio R, Bonardi C, *et al.* Pentraxin 3 in plasma and vaginal fluid in women with preterm delivery. *BJOG* 2007;114:143-7.

37. Rovere-Querini P, Castiglioni MT, Sabbadini MG, *et al.* Signals of cell death and tissue turnover during physiological pregnancy, pre-eclampsia, and autoimmunity. *Autoimmunity* 2007;40:290-4.
38. Cruciani L, Romero R, Vaisbuch E, *et al.* Pentraxin 3 in amniotic fluid: a novel association with intra-amniotic infection and inflammation. *J Perinat Med* 2010;38:161-71.
39. *Rezende J.* Obstetrícia. 10ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
40. *Gestação de Alto Risco / Secretaria de Políticas, Área Técnica da Saúde da Mulher.* Brasília: Ministério da Saúde, 2000.
41. Yoon BH, Romero R, Kim CJ, *et al.* Amniotic fluid interleukin-6: a sensitive test for antenatal diagnosis of acute inflammatory lesions of preterm placenta and prediction of perinatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;172:960-70.
42. Hargitai B, Marton T, Cox PM. Examination of the human placenta. *J Clin Pathol* 2004;57:785-92.
43. Binneck E, As ômicas: integrando a bioinformação. *Biociência e Desenvolvimento (serial online).* 2004; 32:28-37 [citedd 2006 Dec 20]. Available from: [HTTP://www.biotecnologia.com.br/revista/bio32/omicas32.pdf](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio32/omicas32.pdf)