


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

**ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS EM MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS DE
GESTANTES COM ROTURA PREMATURA DE MEMBRANAS PRÉ-TERMO**

Jossimara Poletini

Dissertação apresentada 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
2007**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

**ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS EM MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS DE
GESTANTES COM ROTURA PREMATURA DE MEMBRANAS PRÉ-TERMO**

Orientada: Jossimara Poletini

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Dissertação apresentada 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
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Polettini, Jossimara.

Análise quantitativa da expressão de citocinas inflamatórias em membranas corioamnióticas de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo / Jossimara Polentini. – Botucatu : [s.n.], 2007

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2007.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Assunto CAPES: 20300000

1. Gravidez - Patologia 2. Gravidez - Doenças - Aspectos imunológicos 3. Patologia

CDD 616.07

Palavras-chave: Citocinas; Infecção; Membranas coriamnióticas; PCR em tempo real; Rotura prematura de membranas

Aos meus pais, João e Vera,

*Pelo apoio e amor incondicional, pelo estreito laço
de amizade, pelo exemplo de vida, e pela acolhida
a cada volta pra casa...*

À minha avó, Benedita,

*Pela presença constante, meu exemplo
de fortaleza e doçura...*

*“Meta: a gente busca; Caminho, a gente acha;
Desafio, a gente enfrenta; Vida, a gente inventa;
Saudade, a gente mata; e Sonho, a gente realiza!”*

Aos meus irmãos, Jussara e Ismael,

*Pela amizade, carinho e compreensão.
Vocês, que, simplesmente por existirem, fazem
minha vida completa e feliz...*

Ao Leonardo e sua família,

*Por todo amor e carinho que recebo a cada dia,
pela certeza de um futuro feliz...*

*“Maior que qualquer distância é a saudade
Maior que a saudade, é a nossa certeza!”*

À minha orientadora Márcia Guimarães da Silva

Que, quando deveria ser simplesmente professora, foi mestre.

Que, quando deveria ser mestre, foi amiga,

E, em sua amizade, me compreendeu e me incentivou a seguir meu caminho.

A Deus

Por me emprestar diariamente o coração que pulsa, o oxigênio que respiro, o solo em que caminho e milhões de coisas para que eu exista!

*“Louvado seja o Senhor, dia após dia, ele toma cuidado
de nós, o Deus da nossa salvação” Sl 68:20*



Aos Profs. Drs. João Manuel Grisi Candeias e

João Pessoa Araujo Junior

Não apenas pelas valiosas contribuições no Exame Geral de Qualificação, mas, principalmente, pela acolhida desde o início das minhas atividades científicas, acompanhada de muitos ensinamentos, orientações e amizade.

Ao final de mais uma etapa de minha vida, agradeço a todas as pessoas que me apoiaram, incentivaram e ajudaram na concretização desse trabalho.

Às gestantes, que, mesmo num momento de fragilidade, entenderam a necessidade desse trabalho e contribuíram para a realização do mesmo.

Às minhas amigas de mestrado: **Camila Marconi, Eliane P. Vieira e Ana Carolina Pereira**, pela ajuda imprescindível, pelo dia a dia do laboratório, por compartilharem as alegrias e angústias, e, principalmente, pela busca incessante pelas nossas placentas...

Às nossas graduandas Larissa Doddi, Talita Rochetti e Bruna Ramos. Obrigada pela paciência em ouvir e pelo muito que aprendo com vocês.

Ao Prof. Dr. José Carlos Peraçoli, pelas orientações e correções.

Aos residentes da Ginecologia e Obstetrícia, por abrirem espaço no seu tempo de aprendizado para nos ajudar durante as coletas.

Às enfermeiras do Centro Obstétrico, por dispenderem, a cada dia, minutos do seu trabalho para nos auxiliar na esterilização do material de coleta, e pela companhia de tantas horas durante os trabalhos de parto.

Aos amigos da Pós-Graduação, pelo companheirismo em cada etapa de sucessos e fracassos, pelas experiências trocadas, pelos risos de desespero...

Aos meus amigos de Mogi Mirim, por estarem sempre do meu lado, me acolhendo sempre e vibrando a cada conquista.

Ao Prof. Dr. Reinaldo José da Silva, pela amizade, pelas sugestões e pelo indispensável 'auxílio técnico'.

Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial às secretárias, Sônia e Nice, e ao Laboratório de Virologia, que possibilitou a realização da parte prática desse trabalho.

Aos meus amigos da Virologia: Rodrigo Vela (Smurf), Aripuanã Watanabe (Gyraia), Thiago Batista, Telma Papparotto, Marcela, José Augusto, por proporcionarem um ambiente descontraído de trabalho; e em especial à Andreza Figueiredo e à Taís Fukuda, pela ajuda indispensável no entendimento e manuseio do aparelho de PCR em tempo real.

À eterna Rep. 'Cuba Light', com momentos inesquecíveis e pessoas incomparáveis. **Brenda Medeiros, Ana Karina Sochetta e Ana Luiza Pereira**, muito obrigada pelo apoio, torcida, lágrimas e sorrisos...

Às pessoas que me incentivaram a seguir o caminho da ciência, especialmente à minha amiga Milena Pilla, exemplo de perseverança nessa caminhada.

Àqueles que me ajudaram direta ou indiretamente na realização desse trabalho, especialmente às meninas do Departamento de Imunologia - Graziela Romagnoli, Érika Nakaira, Fabiane Missima, Camila Banwart - pela ajuda, amizade, carinho e companheirismo.

A todos os funcionários do Departamento de Patologia, por todos os serviços e ajuda prestados, especialmente à Cristina Dorico, Luciano Donini e José Carlos Pedroso, pela atenção e disponibilidade, sempre.

Ao Prof. Dr. Viciany E. Fabris, pelo auxílio nas análises histopatológicas.

À Tânia Andrade, secretária do Programa de Pós-Graduação em Patologia, e à Profa. Dra Denise Fecchio, coordenadora do Programa, por toda ajuda e amizade.

À Capes, pela concessão da Bolsa de Estudos durante o Mestrado, e à Fapesp, pelo Auxílio-Pesquisa concedido, processo 03/13268-0.

Trabalho realizado no Departamento
de Patologia, FMB, Unesp, e no
Departamento de Microbiologia e
Imunologia, IBB, Unesp.

Sumário

Capítulo I	01
Revisão da Literatura	02
Referências Bibliográficas.....	14
Capítulo II - Manuscrito -.....	22
Análise quantitativa da expressão de citocinas inflamatórias em membranas corioamnióticas de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo.....	23
Resumo.....	24
Abstract.....	25
1. Introdução.....	26
2. Material e Métodos.....	28
2.1. Casuística.....	28
2.2. Colheita das membranas corioamnióticas.....	29
2.3. Análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório.....	30
2.4. Detecção de citocinas por PCR em tempo real.....	30
2.4.1. Extração de RNA	30
2.4.2. Obtenção de cDNA	31
2.4.3. PCR em tempo real.....	32
2.5. Análise estatística.....	33
3. Resultados.....	34
3.1. Características das pacientes.....	34
3.2. Análise histopatológica das membranas corioamnióticas.....	36
3.3. Quantificação relativa da expressão das citocinas inflamatórias.....	38
3.3.1. Determinação da curva padrão na PCR em tempo real para IL-1 β , IL-8 e β actina.....	38

3.3.2. Determinação da curva padrão na PCR em tempo real para IL-6 e TNF- α	39
3.3.3. Detecção de RNAm de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α nas membranas corioamnióticas.....	41
3.3.4. Quantificação relativa de RNAm de IL-1 β	41
3.3.5. Quantificação relativa de RNAm de IL-6.....	42
3.3.6. Quantificação relativa de RNAm de IL-8.....	43
3.3.7. Quantificação relativa de RNAm de TNF- α	44
3.3.8. Quantificação relativa de RNAm de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α em relação à presença de infiltrado inflamatório nas membranas coriomnióticas	45
3.3.9. Quantificação relativa de RNAm de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α em relação à intensidade do infiltrado inflamatório nas membranas coriomnióticas.....	47
2.6. Discussão.....	50
2.7. Referências bibliográficas.....	56
Anexos.....	61
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	
Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	

“Nunca ande por caminhos já traçados, pois eles conduzem até onde os outros já chegaram.”
(Graham Bell)



Capítulo I

Revisão de Literatura

A manutenção da gravidez continua sendo um enigma biológico, pois o feto é considerado, para o organismo materno, um semi-enxerto, com metade da carga genética oriunda da mãe e metade do pai. Embora seja esperado que o sistema imune materno rejeite o feto, isto não ocorre com frequência, por existir tolerância materna ao enxerto feto-placentário. A resposta imune materna contra o feto é, em parte, inibida pelos mesmos mecanismos de tolerância periférica a antígenos próprios, resultando na integração de numerosos mecanismos que atuam sinergicamente, permitindo o sucesso gestacional¹.

Muitos fatores contribuem para a proteção do feto contra a rejeição materna^{2,3}. A interação de proteínas transmembrana FasL presentes nas células trofoblásticas com moléculas Fas expressas por linfócitos maternos ativados promovem apoptose dessas células imune². Além disso, a migração de células T maternas da circulação ao tecido fetal pode ser inibida por ação da enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO), produzida por macrófagos teciduais. Segundo Munn et al.⁴, a expressão da IDO na placenta de camundongo é responsável pela não rejeição do feto semi-alogênico pelas células T maternas.

No entanto, a principal estratégia para se evitar a rejeição fetal é a expressão de antígenos leucocitários humanos não-clássicos (HLA-G) pelo trofoblasto, que bloqueiam a resposta imune das células T alorreativas maternas. Assim, a resposta materna específica contra HLA-fetais é suprimida, enquanto a resposta de célula T contra outros antígenos alogênicos não é influenciada⁵. Sem dúvida, o grau de invasão do trofoblasto e a interação das células desse tecido com o sistema imune materno são fundamentais para definir o prognóstico da gestação⁶.

A participação das células natural killer (NK) no sucesso gestacional também está bem documentada. Essas células são células encontradas na circulação periférica e no útero e, quando ativadas, induzem a morte celular. O reconhecimento das moléculas HLA-G, por receptores específicos presentes nas células NK uterinas, promove uma resposta imune favorável ao sucesso gestacional, uma vez que a expressão dessas moléculas pelo tecido trofoblástico inibe mais de 80% da proliferação de células mononucleares uterinas, incluindo as NK, diminuindo a resposta imune materna contra o feto⁷. Além disso, a atividade citotóxica de células NK decíduais encontra-se diminuída devido à inabilidade dessas células em maturar a sinapse de ativação dos microtúbulos e grânulos citotóxicos, independentemente da expressão de HLA-G⁸, mostrando que, além da participação das moléculas HLA-G, outros fatores também contribuem para que a gestação se desenvolva de maneira favorável.

As células NK uterinas possuem considerável expressão de citocinas, que pode ser afetada pela expressão de moléculas HLA-G, provocando aumento de produção de interferon gama (INF- γ) pelas referidas células⁷. Esse aumento de produção de INF- γ condiz com o paradigma Th1/Th2 proposto por Wegmann et al.⁹, no qual o predomínio do perfil Th1 de citocinas é prejudicial ao sucesso gestacional. Desse modo, a regulação imune durante a gestação é caracterizada pela supressão da imunidade mediada por célula e pela regulação da função imune humoral. Diferentes sub-populações de linfócitos T *helper* CD4⁺ produzem citocinas diferenciadas¹⁰, caracterizando a resposta imune a ser desencadeada. Isso significa que, dependendo do patógeno, a

resposta imune se caracteriza por um perfil Th1 ou Th2 de produção de citocinas.

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular, secretadas pelos leucócitos e outras células do organismo em resposta a diferentes estímulos, atuando como mediadores das células do sistema imune. Interleucinas como IL-1, IL-2, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, fator de necrose tumoral (TNF- α) e INF- γ encontram-se entre as citocinas produzidas por células Th1, sendo esta associada à resposta mediada por células, particularmente em resistência à patógenos intracelulares, enquanto IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 são citocinas perfil Th2, que estão envolvidas na resposta humoral e produção de imunoglobulina E¹¹.

Estudos mostram a importância do balanço entre os tipos Th1 e Th2 de citocinas na manutenção da gestação, na qual o padrão Th2 é mediador predominante na interface materno-fetal^{12,13}. Evidências da predominância do perfil Th2 durante a gestação normal são observadas em mulheres portadoras de doenças autoimunes. Doenças com padrão Th2 de resposta, como lúpus eritematoso sistêmico, se exacerbam durante a gestação¹⁴, enquanto doenças com padrão Th1, como esclerose múltipla, permanecem controladas¹⁵. Além disso, estudos indicam que as citocinas padrão Th1 são deletérias para a gestação, uma vez que em casos de abortos recorrentes seus níveis estão elevados no sangue periférico materno^{16,17}.

Citocinas produzidas no endométrio contribuem para a modulação local da resposta imune adaptativa materna, e atuam no processo de implantação endometrial, facilitando o sucesso da implantação do embrião e a manutenção da gestação. Análise da expressão de RNA mensageiro (RNAm) para citocinas, no local de implantação do ovo, realizada por Lim et al.¹⁸ demonstrou

predomínio de citocinas de perfil Th2, como IL-4. Os autores acreditam que mulheres que tiveram sucesso em gestação anterior devem ter seu endométrio condicionado à exposição a antígenos embrionários como o HLA-G, conduzindo a diminuição da expressão de citocinas Th1 por esse tecido.

A literatura procura validar a associação de citocinas e complicações gestacionais. Assim, a análise do perfil de citocinas, bem como seu valor preditivo positivo nas patologias gestacionais poderiam ser utilizados como fatores preditores de complicações maternas e perinatais. Aliado à isso, o estudo do envolvimento das citocinas nos mecanismos de complicações gestacionais são desejáveis. Nesse cenário, a rotura prematura de membranas tem lugar de destaque já que é, sem dúvida, um difícil problema da Clínica Obstétrica.

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. Sua ocorrência, em idade gestacional inferior a 37 semanas, recebe a denominação de rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT)^{19,20}.

A incidência de RPM-PT varia entre 3% e 18% das gestações²¹ e é responsável por aproximadamente um terço de todos os nascimentos pré-termo²⁰. Essa intercorrência está associada com aumento da morbidade materna e da morbimortalidade perinatal²⁰. Na década de 80, Beydoun et al.²² descreveram que, em gestação inferior a 28 semanas e na presença de RPM, as complicações neonatais aumentam devido à prematuridade.

A RPM é um evento repentino e de difícil predição, sendo o ponto final de muitas vias bioquímicas e mecânicas pouco 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 neonatal. Quando a RPM acontece em gestação pré-termo predispõe a essas mesmas complicações, aumenta a incidência de prematuridade e, quando se torna prolongada, o feto corre riscos de malformações estruturais e de desenvolvimento inadequado²³.

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, causadas por agentes como *Trichomonas vaginalis*, fungos, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Streptococcus* do grupo B; tabagismo, sugerido por alguns estudos^{24,25} e negado por outros^{26,27}; toques vaginais repetidos e procedimentos diagnósticos pré-natais invasivos como a amniocentese²⁸. Dentre os fatores não passíveis de prevenção destacam-se: 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 gemelaridade²⁹ e polidrâmnio³⁰.

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 tanto na etiologia da RPM como do parto prematuro^{31,32}.

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 inferior³³. Sustentando este conceito, Galask et al.³⁴ descreveram que os microrganismos da flora vaginal apresentam capacidade de atingir as membranas corioamnióticas e infectar a cavidade amniótica. Segundo Gyr et al.³⁵, alguns desses microrganismos teriam maior capacidade de invasão.

Entre os possíveis mecanismos envolvidos na RPM destacam-se os efeitos das proteases, tanto secretadas pela flora cérvico-vaginal como pelo organismo materno, em resposta à corioamnionite. Os leucócitos que infiltram as membranas fetais, como parte da resposta inflamatória à corioamnionite, podem liberar elastases que degradam componentes da matriz extracelular, conduzindo à rotura precoce das membranas ovulares³⁶.

É conhecido que alta porcentagem de gestantes com parto prematuro ou rotura prematura de membranas apresenta corioamnionite³⁷⁻³⁹ ou pelo menos evidências de infecção clínica⁴⁰ e segundo Menon et al.⁴¹, as membranas corioamnióticas são locais de produção de citocinas inflamatórias. Esses mediadores do sistema imune são moléculas-chave no processo de indução do trabalho de parto prematuro e de RPM, principalmente pela estimulação do metabolismo do ácido araquidônico em tecidos reprodutivos humanos^{42,43}, induzindo a 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 citocinas⁴⁴. Dollner et al.⁴⁵, pela técnica de imuno-histoquímica, demonstraram que na presença de corioamnionite intensa a concentração de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α nos tecidos placentários foi estatisticamente mais elevada que na ausência da infecção.

É conhecido que a IL-1 β atua como estimulador para linfócitos e tímócitos, sendo ainda secretada por células de Hofbauer da placenta⁴⁶. Desempenha papel central na regulação da resposta inflamatória em tecidos lesados e na infecção intra-uterina é produzida por células decíduais humanas em resposta a endotoxinas bacterianas⁴⁷. Em gestantes com corioamnionite clínica e histológica, a IL-1 β é expressa em células inflamatórias do cório e decídua, sendo os macrófagos a principal fonte dessa citocina nesses tecidos⁴⁴. Em parto prematuro, na presença de infecção da cavidade amniótica a IL-1 β está aumentada no líquido amniótico, e na ausência, a concentração é significativamente inferior⁴³. Para Leviton⁴⁸, a infecção uterina materna e o subsequente aumento de IL-1 β , TNF- α e IL-6 estiveram associados ao parto prematuro, e à lesão neurológica desses recém-nascidos. Esta hipótese foi confirmada por Yoon et al.⁴⁹, que relatam altos níveis de citocinas inflamatórias no líquido amniótico de gestantes que tiveram recém-nascidos com lesões cerebrais. Recentemente, Rodts-Palenik et al.⁵⁰ sugeriram que a terapia com IL-10, em ratas infectadas com *Escherichia coli*, pode fornecer neuroproteção aos RN de mães com infecção uterina.

A IL-1, agindo sinergicamente com TNF- α , induz produção de prostaglandina⁵¹, e esse efeito induz a produção de IL-6 pelo trofoblasto⁵², potencializando a produção de prostaglandina, e conseqüentemente, induzindo as contrações uterinas necessárias para a ocorrência do parto a termo.

A ação da IL-1 β , nos casos de RPM, pode estar relacionada à sua capacidade de induzir apoptose em membranas fetais. Nesse sentido, Fortunato & Menon⁵³ obtiveram indução da atividade de caspases após estimulação de membranas fetais com IL-1 β recombinante, sendo a ativação

da cascata das caspases um dos mecanismos de iniciação do processo de apoptose nas células das membranas corioamnióticas.

No contexto das citocinas inflamatórias e gestação, a IL-6 também tem seu papel avaliado nas complicações gestacionais. A exemplo da IL-1 β , a IL-6 é secretada por vários tipos celulares, incluindo-se células endometriais, deciduais e macrófagos. Desempenha papel fisiológico nos mecanismos do parto, uma vez que os níveis dessa citocina aumentam consideravelmente no soro materno durante o trabalho de parto⁵⁴. Ao longo da gestação, os níveis dessa citocina permanecem inalterados até que a gestação chegue ao termo. Por isso, a concentração aumentada, no sangue materno, durante a gestação é considerada um marcador para o parto prematuro ou infecção uterina⁵⁵. Com o objetivo de associar altos níveis dessa citocina e complicações gestacionais, são realizadas análises de secreção cervical^{56,57}, sangue materno e umbilical^{55,58}, líquido amniótico⁵⁹ e de tecidos gestacionais⁴¹. Goffinet et al.⁵⁷ verificaram que, em mulheres com parto prematuro e membranas ovulares intactas, a expressão aumentada de RNAm de IL-6 na secreção cervical estava associada ao maior risco de infecção neonatal. Além disso, níveis elevados dessa citocina no soro do cordão umbilical de recém-nascidos prematuros aumentam o risco de morbidade neonatal⁵⁸. Lockwood et al.⁵⁶, determinando a concentração de IL-6 na secreção cervical de gestantes com parto prematuro, concluíram que os níveis aumentados dessa citocina, quantificados entre a 24^a e 36^a semanas de gestação, estavam relacionados com RPM, sendo que, em metade dos casos, níveis maiores que 250 pg/mL estavam associados à RPM. Por outro lado, Hatzidak et al.⁶⁰ mostraram que as concentrações de 81pg/mL e 108,5 pg/mL de IL-6 no sangue materno e umbilical, respectivamente,

ofereciam oportunidade de detecção precoce de sepse em recém-nascidos prematuros.

A presença da infecção da cavidade amniótica parece aumentar ainda mais os níveis de IL-6 nos casos de RPM. Estudo realizado em gestantes com RPM mostrou que, praticamente, todos os casos associados à infecção tiveram elevados níveis de citocinas no líquido amniótico, incluindo a IL-6, e aproximadamente metade desses casos esteve associada com elevação dessas citocinas também no soro materno⁶¹. A detecção de altos níveis de citocinas no líquido amniótico revela a contribuição dos tecidos placentários ou fetais na produção desses mediadores inflamatórios.

A IL-8 é uma citocina que induz quimiotaxia neutrofílica e tem função importante no mecanismo de defesa do hospedeiro, sendo exaustivamente estudada durante a gestação. É produzida pela placenta humana⁶² e detectada no líquido amniótico a partir do segundo trimestre da gestação normal³³. A participação dos tecidos gestacionais na produção dessa citocina está documentada, especialmente em relação ao cório e à decídua durante o parto a termo, o que sugere também o papel da IL-8 no processo do trabalho de parto a termo⁶³.

Romero et al.³³ foram os primeiros autores a descrever concentrações elevadas de IL-8 no líquido amniótico de mulheres em TPP e naquelas com infecção na cavidade amniótica. Cherouny et al.⁶⁴ também descreveram níveis elevados de IL-8 no líquido amniótico de gestantes com corioamnionite histológica e TPP, sendo, na década de 90, considerada o indicador mais sensível de corioamnionite histológica e parto prematuro. Puchner et al.⁴⁰ encontraram altos níveis de IL-8 no líquido amniótico de mulheres com infecção na cavidade amniótica, quando comparado com mulheres sem infecção. Para

Albert et al.⁶⁵, a IL-8 pode prever a resposta à terapia tocolítica e quando sua concentração no líquido amniótico era maior que 15 ng/mL, esteve associada com TPP. Witt et al.⁶⁶ estabeleceram uma relação positiva entre o aumento de IL-8 no líquido amniótico e a infecção da cavidade amniótica por *Ureaplasma urealyticum*, fato não verificado em infecções por outros patógenos. Para esses autores, o fato de não se encontrar elevadas concentrações de IL-8 no soro materno sugere que a resposta inflamatória ao *U. urealyticum* parece afetar mais os compartimentos fetais que o materno.

O TNF- α é detectado nas células de Hofbauer e deciduais, atuando como regulador da proliferação celular na unidade feto-placentária, estando bem documentado o papel dessa citocina no aumento do mecanismo de apoptose⁶⁷. Fortunato & Menon⁵³ demonstraram que a estimulação das membranas corioamnióticas com TNF- α leva a 80% de apoptose nesses tecidos.

O TNF- α tem propriedades semelhantes a IL-1 β , sendo secretado por macrófagos ativados. A identificação de TNF- α na decídua humana e de seus receptores nas células placentárias, sugere que essa citocina desempenha papel fundamental na rede de citocinas produzidas na gestação⁶⁸. A presença de corioamnionite está associada à alta expressão de citocinas, como o TNF- α , nas membranas fetais, devido à intensa infiltração de células polimorfonucleares. Assim, no líquido amniótico de gestantes com infecção intra-amniótica, os níveis dessa citocina encontram-se mais elevados que em gestantes sem infecção⁶⁹.

Segundo Fortunato et al.⁷⁰, o lipopolissacarídeo (LPS) induz a 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 . A IL-10 é uma citocina padrão Th2 e inibe a produção de citocinas Th1⁷¹, reduzindo a apresentação de antígenos pelos monócitos⁷². Holmes et al.⁷³ mostraram que a concentração plasmática de IL-10 foi maior em mulheres grávidas em relação às não-grávidas, nos três trimestres de gestação até o terceiro dia de puerpério, confirmando o papel imunorregulatório da IL-10.

A decídua materna é fonte potencial de TNF- α . Casey et al.⁷⁴ mostraram que cultura de células decíduais estimuladas com LPS produzem TNF- α . Vince et al.⁷⁵ observaram que TNF- α , no primeiro trimestre de gestação, é produzido primariamente em macrófagos decíduais, enquanto que no terceiro trimestre células decíduais e células trofoblásticas contêm RNAm de TNF- α .

Em conjunto, os dados da literatura apontam uma interação complexa entre citocinas inflamatórias na unidade feto-placentária. A quantificação dessas citocinas poderá contribuir para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na RPMPT.

Referências Bibliográficas*

1. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Tolerance, suppression and the fetal allograft. *J Mol Med.* 2005;83:88-96.
2. Qiu Q, Yang M, Tsang BK, Gruslin A. Fas ligand expression by maternal decidual cells is negatively correlated with the abundance of leukocytes present at the maternal-fetal interface. *J Reprod Immunol.* 2005;65:121-132.
3. Trowsdale J, Betz AG. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nat Immunol.* 2006;7:241-246.
4. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, et al. Prevention of allogenic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science.* 1998;281:1191-1193.
5. Steinborn A, Schmitt E, Stein Y, Klee A, Gonser M, Seifried E, et al. Prolonged preterm rupture of fetal membranes, a consequence of an increased maternal anti-fetal T cell responsiveness. *Pediatr Res.* 2005;58:648-653.
6. Steinborn A, Rebmann V, Scharf A, Sohn C, Grosse-Wilde H. Soluble HLA-DR levels in the maternal circulation of normal and pathologic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:473-479.
7. van der Meer A, Lukassen HGM, van Lierop MJC, Wijnands F, Mosselman S, Braat DDM, et al. Membrane-bound HLA-G activates proliferation and interferon- γ production by uterine natural killer cells. *Mol Hum Reprod.* 2004;10:189-195.
8. Kopcow HD, Allan DS, Chen X, Rybalov B, Andzelm MM, Strominger JL. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:15563-15568.
9. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon?. *Immunol Today.* 1993;14:353-356.
10. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. *J Immunol.* 1986;136:2348-2357.

* Referências bibliográficas apresentadas segundo as normas de Vancouver.

11. Jarnicki AG, Fallon PG. T helper type-2 cytokine responses: potential therapeutic targets. *Cur Opin Pharmacology*. 2003;3:449–455.
12. 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;98:122-126.
13. Hollier LM, Rivera MK, Henninger E, Gilstrap LC, Marshall Jr GD. T helper cell cytokine profiles in preterm labor. *Am J Reprod Immunol*. 2004; 52:192-196.
14. Doria A, Ghirardello A, Iaccarino L, Zampieri S, Punzi L, Tarricore E, et al. Pregnancy, cytokines, and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004;51:989-995.
15. Al-Shammri S, Rawoob P, Aziziehb F, AbuQoorac A, Hannac M, Saminathan TR. Th1/Th2 cytokines patterns and clinical profiles during and after pregnancy in women with multiple sclerosis. *J Neur Sciences*. 2004;222:21-27.
16. Daher S, Denardi KAG, Blotta MHS, Mamoni RL, Reck APM, Camano L, et al. Cytokines in recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol*. 2004;62:151-157.
17. 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. *Fertility and Sterility*. 2001;76:707-711.
18. Lim JK, Odukoya OA, Ajjan RA, Li TC, Weetman AP, Cooke ID. Profile of cytokine mRNA expression in peri-implantation human endometrium. *Mol Reprod*. 1998;4:77-81.
19. Lee T, Silver H. Etiology and epidemiology of preterm premature rupture of the membranes. *Clin Perinatol*. 2001;28:721-734.
20. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol*. 2003;101:178-193.
21. Gunn GC, Mishell Jr DR, Morton DG. Premature rupture of the fetal membranes: a review. *Am J Obstet Gynecol*. 1970;106:469-483.
22. Beydoun SN, Yasin SY. Premature rupture of membranes before 28 weeks: conservative management. *Am J Obstet Gynecol*. 1986;155:471-479.

23. Polzin WJ, Brady K. Mechanical factors in the etiology of premature rupture of the membranes. *Clin Obstet Gynecol.* 1991;34:702-714.
24. Kyrklund-Blomberg NB, Granath F, Cnattingius S. Maternal smoking and causes of very preterm birth. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005;84:572-577.
25. Simhan HN, Caritis SN, Krohn MA, Hillier SL. The vaginal inflammatory milieu and risk of early premature preterm rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192:213-218.
26. Naeye RL. Factors that predispose to premature rupture of the fetal membranes. *Obstet Gynecol.* 1982;60:93-98.
27. Mercer BM, Goldenberg RL, Meis PJ, Moawad AH, Shellhass C, Das A, et al. The preterm prediction study: prediction of preterm premature rupture of membranes through clinical findings and ancillary testing. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183:738-745.
28. Soper DE, Mayhall CG, Dalton HP. Risk factors for intraamniotic infection: A prospective epidemiologic study. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;161:562-568.
29. Vergani P, Locatelli A, Ratti M, Scian A, Zangheri G, Pezzullo J, et al. Predictors of adverse perinatal outcome in twins delivery at < 37 weeks. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2004;16:343-347.
30. Newton ER. Chorioamnionitis and intraamniotic infection. *Clin Obstet Gynecol.* 1993;36:795-808.
31. Üstün C, Kocak I, Baris S, Uzel A, Saltik F. Subclinical chorioamnionitis as an etiologic factor in preterm deliveries. *Int J Gynaecol Obstet.* 2001;72:109-115.
32. Simhan HN, Caritis SN, Krohn MA, Tejada BM, Landers AV, Hillier SL. Decreased cervical pro-inflammatory cytokines permit subsequent upper genital tract infection during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189:560-567.
33. 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;164:859-862.
34. Galask RP, Varner MW, Petzold CR, Wilbur SL. Bacterial attachment to the chorioamniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1984;148:915-928.

35. Gyr TN, Malek A, Mathez-Loic F, Altermatt HJ, Bodmer T, Nicolaidis K, et al. Permeation of human chorioamniotic membranes by *Escherichia coli* in vitro. Am J Obstet Gynecol 1994;170: 223-227.
36. Lockwood CJ, Toti P, Arcuri F, Paidas M, Buchwalder L, Krikun G, et al. Mechanisms of abruption-induced premature rupture of the membranes. Am J Pathol. 2005;167:1443-1449.
37. 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;81:175-182.
38. Ramsey PS, Lieman JM, Brumfield CG, Carlo W. Chorioamnionitis increases neonatal morbidity in pregnancies complicated by preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol. 2005;192:1162-1166.
39. Fortunato SJ, Menon R. Distinct molecular events suggest different pathways for preterm labor and premature rupture of the membranes. Am J Obstet Gynecol. 2001;184:1399-1406.
40. Puchner T, Egarter C, Wimmer C. Amniotic fluid interleukin-8 as a marker of intra-amniotic infection. Arch Gynecol Obstet. 1993;253:9-14.
41. 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.
42. 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;169:1467-1471.
43. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T. Cytokine production in chorioamnionitis. J Reprod Immunol. 2000;47:185-196.
44. Kauma SW, Johnson DE. The expression and localization of IL-1 β mRNA in chorioamnionitis. Am J Obstet Gynecol. 1994;163:1430-1437.
45. Dollner H, Vatten L, Halgunset J, Rahimipoor S, Austgulen R. Histologic chorioamnionitis and umbilical serum levels of pro-inflammatory cytokines and cytokine inhibitors. Br J Obstet Gynaecol. 2002;109:534-539.

46. Hill JA. Cytokines considered critical in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 1992;28:123-126.
47. Axemo P, Brauner A, Petterson M, Eriksson L, Rwamushajja E, Bergström, A. Amniotic fluid interleukins in Swedish and Mozambican pregnant women. *Gynecol Obstet Invest.* 1996;41:113-117.
48. Leviton A. Preterm birth and cerebral palsy: is tumor necrosis factor the missing link?. *Dev Med Child Neurol.* 1993;35:553-558.
49. Yoon BH, Romero R, Jun JK, Park KH, Park JD, Ghezzi F, et al. Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;177:19-26.
50. Rodts-Palenik S, Pang Y, Barrilleaux PS, Thigpen B, Cai Z, Rodes P, et al. Maternal interleukin-10/antibiotic therapy suppresses the fetal brain inflammatory response. *Proceedings of the Society for Maternal-Fetal Medicine; 2003, Feb:3-8; San Francisco, California.*
51. Bry K, Hallman M. Synergistic stimulation of amnion cell prostaglandin E2 synthesis by interleukin-1, tumor necrosis factor and products from activated human granulocytes. *Fatty Acids.* 1991;44:241-245.
52. 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;74:184-191.
53. Fortunato SJ, Menon R. IL-1 β is a better inducer of apoptosis in human fetal membranes than IL-6. *Placenta.* 2003;24:922-928.
54. Hebisch G, Neumaier-Wagner PM, Huch R, von Mandach U. Maternal serum interleukin-1 β , -6 and -8 levels and potential determinants in pregnancy and peripartum. *J Perinat Med.* 2004;32:475-480.
55. Murtha AP, Greig PC, Jimmerson CE, Herbert WNP. Maternal serum interleukin-6 concentration as a marker for impending preterm delivery. *Obstet Gynecol.* 1998;91:161-164.

56. 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;171:1097-1102.
57. 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. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005;123:167-173.
58. Goepfert AR, Andrewa WW, Carlo W, Ramsey PS, Cliver SP, Goldenberg RL, et al. Umbilical cord plasma interleukin-6 concentrations in preterm infants and risk of neonatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191:1375-1381.
59. 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;77:123-129.
60. Hatzidaki E, Gourgiotis D, Manoura A, Korakaki E, Bossios A, Galanakis E, et al. Interleukin-6 in preterm premature rupture of membranes as an indicator of neonatal outcome. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005;84:632-638.
61. Shobokshi A, Shaarawy M. Maternal serum and fluid amniotic cytokines in patients with preterm premature rupture of membranes with and without intrauterine infection. *Int J Gynecol Obstet.* 2002;79:209-215.
62. Shimoya K, Moriyama A, Matsuzaki N, Ogata I, Koyama M, Azuma C, et al. Human placental cells show enhanced production of interleukin IL-8 in response to lipopolysaccharide (LPS), IL-1 and tumor necrosis factor (TNF-alpha), but not to IL-6. *Mol Hum Reprod.* 1999;5:885-891.
63. Laham N, Brennecke SP, Rice GE. Interleukin-8 release from human gestational tissue explants: effect of gestation, labor, and chorioamnionitis. *Biol Reprod* 1999;61:823-827.
64. Cherouny PH, Pankuch GA, Romero R, Botti JJ, Kuhn DC, Demers LM, et al. Neutrophil attractant/activating peptide-1/interleukin-8: association with histologic chorioamnionitis, preterm delivery, and bioactive amniotic fluid leukoattractants. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;169:1299-1303.

65. Allbert JR, Naef RW, Perry KG, Magann EF, Whitworth NS, Morrison JC. Amniotic fluid interleukin-6 and interleukin-8 levels predict the success of tocolysis in patients with preterm labor. *J Soc Gynecol Invest.* 1994;1:264-268.
66. 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;33:22–26.
67. 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;187:1159-1162.
68. Eades DK, Corneium P, Pekala PH. Characterization of tumor necrosis factor receptor in human placenta. *Placenta.* 1988;9:247-251.
69. 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;161:336-341.
70. 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;179:794-799.
71. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989;170:2081-2095.
72. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.* 1991;174:915-924.
73. Holmes VA, Wallacea JMW, Gilmorea WS, McFaulb P, Alexander HD. Plasma levels of the immunomodulatory cytokine interleukin-10 during normal human pregnancy: a longitudinal study. *Cytokine.* 2003;21:265–269.

74. Casey ML, Cox SM, Beuther B, Milewich L, MacDonald PC. Cachectin/ tumor necrosis factor α formation in the human deciduas: potential role of cytokines in infection-induced preterm labor. *J Clin Invest.* 1989;83:430-436.
75. Vince G, Shorter S, Starkey P, Humphreys J, Clover L, Wilkins T, et al. Localization of tumor necrosis factor production in cells at the materno-fetal interface in human pregnancy. *Clin Exp Immunol.* 1992;88:174-180.

*“As adversidade despertam em nós capacidades que, em
circunstâncias favoráveis, teriam ficado adormecidas”*

(Horácio)



Capítulo II

– Manuscrito –

*Análise quantitativa da expressão de citocinas
inflamatórias em membranas corioamnióticas
de gestantes com rotura prematura de
membranas pré-termo.*

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 das citocinas inflamatórias interleucina (IL) -1β , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF- α) pelas membranas corioamnióticas de gestantes com RPM-PT, e avaliar a correlação dessa expressão com a presença e intensidade do infiltrado inflamatório nas membranas e decídua. **Material e Métodos:** Foram incluídas no estudo, 25 gestantes com RPM-PT em trabalho de parto e 15 gestantes com RPM-PT fora do trabalho de parto. Como grupo controle foram avaliadas 25 gestantes em trabalho de parto prematuro (TPP) e bolsa 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 RNA mensageiro (RNAm) das citocinas inflamatórias pela técnica de PCR em tempo real. Outros fragmentos das membranas foram submetidos à análise histopatológica para avaliação da presença e semi-quantificação do infiltrado inflamatório. **Resultados:** No período do estudo, a incidência de RPM-PT foi de 4,6%. A presença de infiltrado inflamatório nas membranas corioamnióticas e/ou decídua foi de 75% no grupo RPM-PT. A concentração relativa de RNAm de IL- 1β , IL-6 e IL-8 não foi estatisticamente diferente nos grupos estudados. Para TNF- α , a concentração relativa de RNA foi estatisticamente superior nas membranas de gestantes com TPP em relação aos grupos com RPM-PT. Na presença de infiltrado inflamatório nas membranas corioamnióticas, a concentração de RNAm de IL- 1β foi estatisticamente maior no grupo RPM-PT fora de trabalho de parto. Não houve diferença na intensidade de RNAm das citocinas de interesse em relação à intensidade do infiltrado inflamatório. Em 87,2% das membranas corioamnióticas das gestantes incluídas no estudo, foi detectado o RNAm para todas as citocinas estudadas. **Conclusão:** As membranas corioamnióticas são fontes de IL- 1β , IL-6, IL-8 e TNF- α e a concentração de RNAm dessas citocinas, na RPM-PT, não está relacionada à intensidade do infiltrado inflamatório presente nas membranas.

Abstract

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 inflammatory cytokines interleukin-1 (IL) -1 β , IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in the chorioamniotic membranes of pregnant women with PPRM and evaluate the correlation of this expression with the presence and intensity of the inflammatory infiltrates present in the membranes and decidua. **Material and Methods:** Twenty-five PPRM women in labor and 15 PPRM without labor women were studied. As a control group of 25 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 4.6% and in 75% of these samples the presence of inflammatory infiltrates in the chorioamniotic membranes and/or decidua was observed. mRNA expression of IL-1 β , IL-6 and IL-8 was not statistically different in the groups studied. For TNF- α , the expression of mRNA was statistically higher in the PTL group in relation to the groups with PPRM. In the presence of inflammatory infiltrates in the membranes, the concentration of mRNA of IL-1 β it was statistically greater in the PPRM without labor group. No difference occurred in the intensity of cytokine mRNA in relation to the intensity of the infiltrated inflammatory in the groups studied. In 87.2% of the chorioamniotic membranes included in the study, mRNA was expressed for all the cytokines studied. **Conclusion:** The chorioamniotic membranes are sources of IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α and the concentration of mRNA of these cytokines in PPRM is not related with the intensity of the inflammatory infiltrates present in the membranes.

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. 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 raça³, tabagismo^{4,5}, atividade sexual⁶, deficiência materna de zinco⁷ ou vitamina C⁸, cirurgia cervical prévia⁶, gemelaridade, sangramento vaginal durante a gestação, polidrâmnio, hipertensão e diabetes materna⁹⁻¹² e infecção da cavidade amniótica, sendo essa última associada à maioria dos casos de RPM-PT¹³⁻¹⁵.

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, como interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), no líquido amniótico^{16,17} e tecidos gestacionais¹⁸ de mulheres com infecção da cavidade amniótica e RPM-PT.

De acordo com Menon et al.¹⁸, as membranas corioamnióticas são locais de produção de citocinas inflamatórias. Esses mediadores do sistema imune são moléculas-chave no processo de indução da RPM-PT, pois segundo Fortunato et al.^{19,20}, a biodisponibilidade do 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^{21,22}. Na presença de infecção da cavidade amniótica, as células inflamatórias que infiltram os tecidos gestacionais aumentam a produção das citocinas²³.

Entretanto, em estudo *in vitro*, Laham et al.²⁴ descrevem que a liberação de IL-8 pelo âmnio, cório, decídua e placenta não foi significativamente diferente no pré-termo, na ausência ou presença de corioamnionite. Nesse mesmo sentido, Shimoya et al.²⁵ observaram níveis similares de intensidade de RNA mensageiro (RNAm) de IL-8 nos tecidos gestacionais de primeiro, segundo e terceiro trimestre e na presença de corioamnionite.

Silva²⁶, correlacionando a imunomarcagem de citocinas inflamatórias em membranas corioamnióticas de gestantes com RPM-PT, na presença ou não de corioamnionite, observou marcação discreta para IL-6 e IL-8, e moderada para IL-1 β e TNF- α na ausência de infiltrado inflamatório nas membranas corioamnióticas e/ou decídua capsular. Na presença de infiltrado inflamatório houve predomínio de membranas com marcação intensa para IL-1 β e TNF- α , enquanto que para IL-6 e IL-8 o predomínio foi de marcação moderada, considerando os critérios morfológicos para semi-quantificação dessa imunomarcagem.

Considerando a elevada frequência de corioamnionite nos casos de RPM-PT, o objetivo deste estudo foi quantificar a expressão das citocinas inflamatórias, IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , pelas membranas corioamnióticas de gestantes com RPM-PT, bem como avaliar a relação dessa expressão com a presença e a intensidade do infiltrado inflamatório presente nas membranas.

2. Material e Métodos

2.1. Casuística

Foram estudadas 25 pacientes com gestação única, cuja rotura de membranas ovulares ocorreu espontaneamente entre 26 e 36 semanas de gestação em trabalho de parto (RPM-PT em TP) e 15 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 avaliadas 25 gestantes, com gestação única, em trabalho de parto prematuro (TPP), com idade gestacional entre 26 e 36 semanas e bolsa das águas íntegra. Todas as gestantes incluídas no estudo foram atendidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

A idade gestacional foi estabelecida pela data da última menstruação e por exame ultra-sonográfico precoce (até 20 semanas). O tempo de rotura das membranas foi obtido por informação materna no momento da admissão hospitalar. As variáveis sócio-demográficas e os dados referentes às gestações anteriores foram obtidos pela análise dos prontuários médicos.

O diagnóstico de RPM-PT 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 Nilo.

O diagnóstico de trabalho de parto prematuro foi confirmado pela presença de contrações freqüentes, uma a cada cinco ou oito minutos,

acompanhadas de modificações cervicais caracterizadas por dilatação maior que 2cm e/ou esvaecimento maior que 50%, em gestação entre 22 e 37 semanas²⁷.

As pacientes permaneceram internadas na Enfermaria de Obstetrícia, sendo controladas clinicamente por meio de avaliação da frequência cardíaca e temperatura a cada 6 horas e, laboratorialmente por hemograma em dias alternados e cultura de secreção cervical semanal até a resolução da gestação.

Todas as pacientes envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (Protocolo 612/2004) (Anexo 2).

2.2. Colheita de membranas corioamnióticas

No momento da resolução da gestação, logo após a dequitação, foram colhidas membranas corioamnióticas de todas as pacientes incluídas no estudo. Foram retirados fragmentos de 1cm² da borda das membranas, que foram acondicionados a 4°C por 4 horas em tubos de 1,5mL tipo *ependorf* contendo *RNA later* (RNA Stabilization Reagent - Qiagen). Após esse período, os fragmentos foram transferidos para novo tubo e imediatamente armazenados a -70°C para posterior extração de RNA. Em seguida, as placentas e seus anexos foram pesados, 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 análise histopatológica.

2.3. Análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório nas membranas corioamnióticas

O infiltrado inflamatório presente nas membranas corioamnióticas e decídua capsular foi avaliado semi-quantitativamente de acordo com os seguintes critérios: (0) Ausente, quando não havia infiltrado inflamatório; (+) Discreto, quando poucas células polimorfonucleares (PMNs) estavam presentes e limitadas à decídua capsular; (++) Moderado, quando moderada quantidade de células PMNs estavam infiltrando o cório e o âmnio e (+++) Intenso, quando uma grande quantidade de PMNs estavam presentes no âmnio e freqüentemente acompanhados por ulceração do epitélio amniótico²⁸.

2.4. Detecção de citocinas por PCR em tempo real

2.4.1. Extração do RNA

Os fragmentos das membranas corioamnióticas, armazenados em tubos tipo *ependorf*, foram submetidos à extração de RNA total, por meio do kit RNeasy (Qiagen), segundo as instruções do fabricante e precedido de algumas modificações. Inicialmente foi determinada a quantidade de 30mg de tecido a ser macerado em nitrogênio líquido, com posterior adição de 1mL de Trizol Reagent® (Invitrogen) e incubação a temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir, 200µL de clorofórmio foram adicionados a cada tubo e, após agitação, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 12.000 rpm. A fase aquosa, contendo o RNA, foi coletada em novo tubo, ao qual foram adicionados 500µL de isopropanol. As amostras foram transferidas para a

coluna com membrana de sílica gel e centrifugadas por 1 minuto a 10.000 rpm. A seguir, foram adicionados 500µL de tampão RW1 na coluna, com posterior centrifugação por 1 minuto a temperatura ambiente para lavar a coluna. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e a coluna transferida para novo tubo de 2mL. Quinhentos microlitros de tampão RPE foram adicionados à coluna e esta foi novamente centrifugada por 1 minuto a 10.000 rpm, sendo descartado o conteúdo do tubo coletor. A última etapa foi repetida, porém com centrifugação por 2 minutos. Na ausência de tampão, as amostras foram novamente centrifugadas para eliminação de resíduos. As colunas foram transferidas para tubos de 1,5mL, aos quais foram adicionados 30µL de água RNase-free diretamente na membrana de gel-sílica, com posterior centrifugação por 1 minuto a 10.000 rpm. As colunas foram descartadas e o RNA extraído foi tratado com inibidor de RNase (RNA Guard - Amersham) durante 10 minutos a 56°C. As amostras foram então submetidas ao tratamento com a enzima DNase (Promega) livre de RNase, por 30 minutos a 37°C, para eliminação de possível contaminação de DNA. O RNA extraído foi quantificado pela leitura em biofotômetro (Eppendorf) no comprimento de onda de 260nm.

2.4.2. Obtenção do cDNA

Após a extração do 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), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA produzido foi quantificado por biofotômetro (Eppendorf), no comprimento de onda de 206 nm e armazenado a – 70°C para posterior

utilização na detecção e quantificação das citocinas pela técnica da PCR em tempo real.

2.4.3. PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real foi realizada em volume final de 20 μ L contendo 1X Taq Man Universal PCR Máster Mix No AmpErase-UNG (Applied Biosystems, cat nº 4304437), 250ng de cDNA e água livre de RNase, em ABI Prism® 7300 Sequence Detector. Os genes das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α foram amplificados usando-se 20X TaqMan® Gene Expression Assays - cat nº Hs 99999029_m1, Hs 99999032_m1, Hs 99999034_m1 e Hs 99999043_m1, respectivamente. As sondas específicas foram marcadas com substância fluorescente FAM para detectar os produtos de PCR diretamente, e as condições de 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 das citocinas 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 cada uma das citocinas de interesse e para o gene da β -actina. 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), produzidos por cada diluição. 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 das citocinas pró-inflamatórias. Para normalizar a expressão dos genes das citocinas, a maior expressão de β actina, em relação a cada citocina, foi adotada como referência, a qual foi dividida pelo valor da β actina da amostra e o valor obtido foi então multiplicado pelo valor da expressão da citocina na referida amostra.

2.5. 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 via de parto, paridade e frequência de intercorrências gestacionais anteriores foram submetidos ao teste de comparação de proporção (Teste de Tukey). A idade gestacional da ocorrência de RPM-PT foi submetida ao teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos, e o tempo de rotura das membranas, ao teste z de proporção. O nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5%²⁹.

3. Resultados

3.1. Características das pacientes

No período do estudo foram realizados 1038 partos no Centro Obstétrico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp. Deste total, 4,6% corresponderam a gestantes portadoras de RPM-PT (Tabela 1).

Tabela 1. Incidência de rotura prematura de membranas e de trabalho de parto prematuro no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, no período de junho de 2005 a julho de 2006.

	Número	(%)
RPM-PT	48	4,6
RPM-T	61	5,9
TPP	82	7,9
Outros	847	81,6
Total	1038	100,0

RPM-PT=rotura prematura de membranas pré-termo; RPM-T =rotura prematura de membranas a termo; TPP = trabalho de parto prematuro

As variáveis sócio-demográficas das pacientes incluídas no estudo estão apresentadas na Tabela 2. A mediana da idade materna foi estatisticamente maior no grupo RPM-PT fora de TP em comparação ao grupo TPP ($p=0,03$).

Tabela 2. Variáveis sócio-demográficas das gestantes incluídas no estudo, no período de junho de 2005 a julho de 2006.

Variáveis	RPM-PT em TP (n=25)	RPM-PT fora TP (n=15)	TPP (n=25)
Idade (anos)	22 (19-31) ^{ab}	25,5 (23-31) ^a	19 (16-24,5) ^b
Estado civil			
Solteira	9 (36%) ^a	6 (40%) ^a	9 (36%) ^a
Casada	11 (44%) ^a	3 (20%) ^a	9 (36%) ^a
União estável	5 (20%) ^a	6 (40%) ^a	7 (28%) ^a
Raça			
Branca	22 (88%) ^a	11 (75%) ^a	19 (76%) ^a
Negra	1 (4%) ^a	-	1 (4%) ^a
Parda	2 (8%) ^a	4 (25%) ^a	5 (20%) ^a
Tabagismo	3 (12%) ^a	1 (6%) ^a	3 (12%) ^a

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

Os dados referentes à gestação atual, bem como às gestações anteriores das pacientes incluídas no estudo, estão apresentados na Tabela 3. A mediana da idade gestacional, no momento do parto, foi estatisticamente maior no grupo RPM-PT fora de TP em comparação ao grupo TPP ($p=0,02$).

Em relação ao tempo de rotura das membranas ovulares, podemos observar que 54,0% das gestantes apresentavam mais de 24 horas de rotura no momento da resolução da gestação. A idade gestacional, no momento da rotura, foi estatisticamente superior no grupo RPM-PT fora de TP (Tabela 4).

Tabela 3. Características obstétricas das pacientes incluídas no estudo no período de junho de 2005 a julho de 2006.

Características obstétricas	RPM-PT em TP (n=25)	RPM-PT fora TP (n=15)	TPP (n=25)
Via de parto			
Vaginal	19 (76%) ^a	-	19 (76%) ^a
Cesárea	6 (24%) ^b	15 (100%) ^a	6 (24%) ^b
Idade gestacional no momento do parto	33s1d (30s3d – 34s1d) ^{ab}	35s2d (34s1d – 36s2d) ^a	32s4d (29s6d – 34s6d) ^b
Paridade			
Primigesta	12(48%) ^a	5 (33%) ^a	10 (40%) ^a
Secundigesta	4 (16%) ^a	4 (27%) ^a	8 (32%) ^a
Multigesta	9 (36%) ^a	6 (40%) ^a	7 (28%) ^a
Intercorrências gestacionais anteriores			
RPM	3/13 ^a	0/10 ^a	3/15 ^a
Aborto	5/13 ^a	4/10 ^a	4/15 ^a
TPP	4/13 ^a	1/10 ^a	8/15 ^a

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

Tabela 4. Distribuição das gestantes em relação à idade gestacional e ao tempo de rotura das membranas corioamnióticas.

	RPM-PT em TP (n=25)	RPM-PT fora TP (n=15)	Estatística
Idade gestacional no momento da RPM	33s (30s1d - 34s) ^b	35s2d (34s - 36s1d) ^a	p=0,01
Tempo RPM			
< 6 horas	2 (8,0%)	1 (6,0%)	p=0,69
6-12 horas	4 (16,0%)	3 (20,0%)	p=0,91
12-24 horas	5 (20,0%)	3 (20,0%)	p=0,68
> 24 horas	14 (56,0%)	8 (54,0%)	p=0,83

3.2. Análise histopatológica das membranas corioamnióticas

A análise histopatológica das membranas corioamnióticas foi realizada em todas as amostras incluídas no estudo. No grupo RPM-PT em TP a presença de infiltrado inflamatório nas membranas corioamnióticas e/ou decídua capsular esteve presente em 88% dos casos, nos quais 45,5% das membranas apresentaram infiltrado inflamatório de intensidade discreta. O infiltrado inflamatório esteve presente em 53% dos casos de RPM-PT fora de TP, nos quais 62,5% das membranas apresentaram discreto infiltrado inflamatório. No grupo TPP, 42,8% apresentaram infiltrado discreto, seguido de 28,6% de infiltrado moderado e intenso (Tabela 5, Figura 1).

Tabela 5. Porcentagem de corioamnionite e intensidade do infiltrado inflamatório presente nas membranas corioamnióticas e/ou decídua nos grupos estudados.

Grupos	Corioamnionite	Intensidade do infiltrado inflamatório		
		+	++	+++
RPM-PT em TP	22 (88%)	10 (45,5%)	7 (31,8%)	5 (22,7%)
RPM-PT fora TP	8 (53%)	5 (62,5%)	-	3 (37,5%)
TPP	21 (84%)	9 (42,8%)	6 (28,6%)	6 (28,6%)

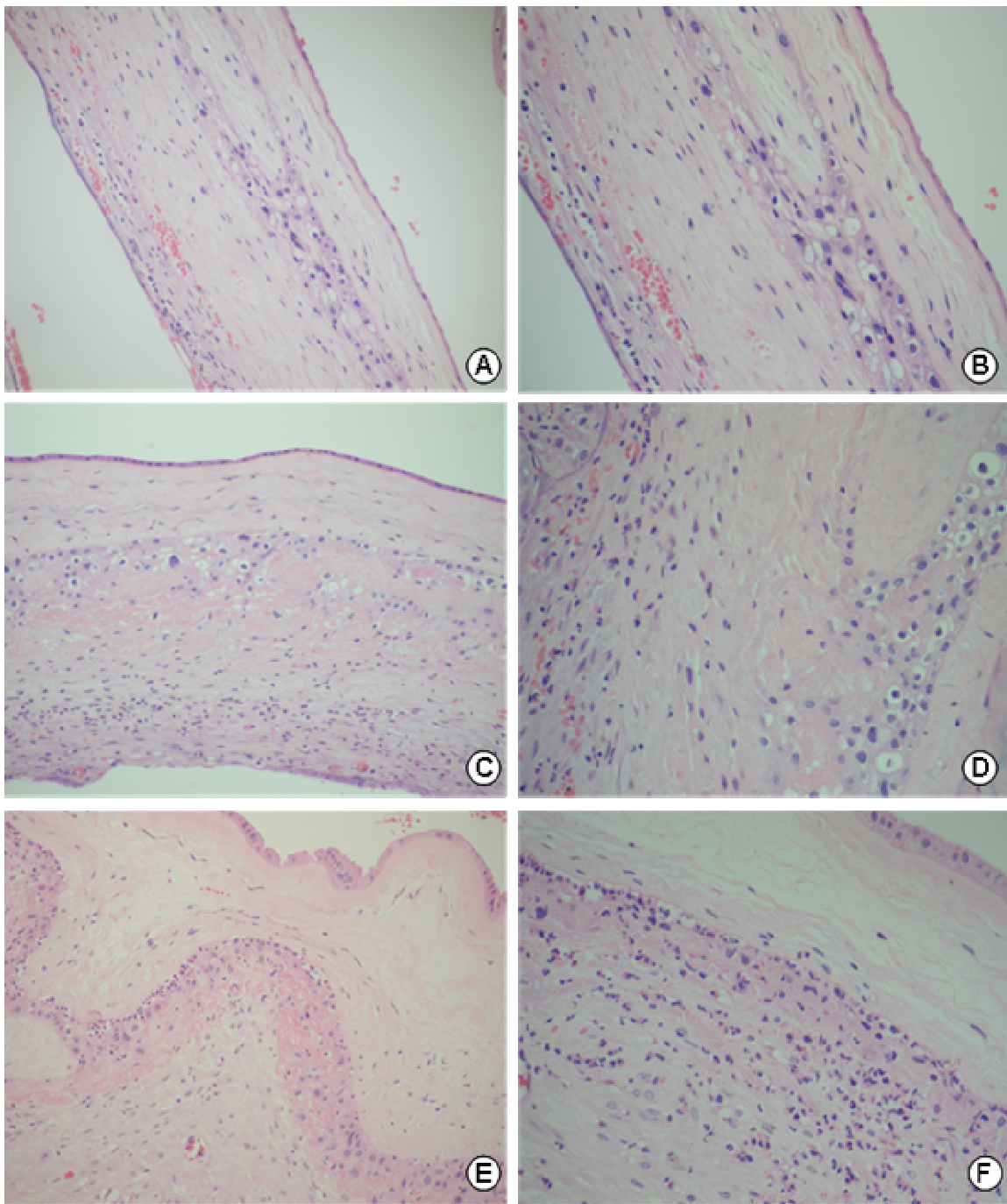


Figura 1 Fotomicrografias das membranas conoamnióticas de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo com diferentes intensidades de infiltrado inflamatório. A) Infiltrado inflamatório discreto (+) com poucas células polimorfonucleares (PMN) limitadas à decídua capsular. HE. 100X; B) Detalhe da fotomicrografia anterior. HE. 200X; C) Infiltrado inflamatório moderado (++) com moderada quantidade de PMN infiltrando o cório. HE 100X; D) Detalhe da fotomicrografia anterior. HE 200X; E) Infiltrado inflamatório intenso (+++) com presença de grande quantidade de PMN ao longo das membranas corioamnióticas. HE. 100X; F) Detalhe da fotomicrografia anterior. HE. 200X.

3.3. Quantificação relativa da expressão das citocinas inflamatórias

3.3.1. Determinação da curva padrão na PCR em tempo real para os genes da IL-1 β , IL-8 e β actina com TaqMan[®]

As diluições do cDNA de referência testadas para serem utilizadas na quantificação relativa da expressão de IL-1 β , IL-8 e β actina estão representadas na Tabela 6 e nas Figuras 2 a 4. Para isso, foram selecionadas quatro diluições (1:8, 1:16, 1:32 e 1:64), com o *threshold* determinado na fase exponencial da curva de amplificação.

Tabela 6. Valor relativo e Ct do cDNA de referência para IL-1 β , IL-8 e β actina obtidos, em diferentes diluições, pela PCR em tempo real das amostras de membranas corioamnióticas.

cDNA	Valor relativo	Ct IL-1 β	Ct IL-8	Ct β actina
1:8	100	31,4	28,1	29,3
1:16	50	32,4	29,2	30,3
1:32	25	33,9	30,2	31,3
1:64	12,5	35,1	31,7	32,3

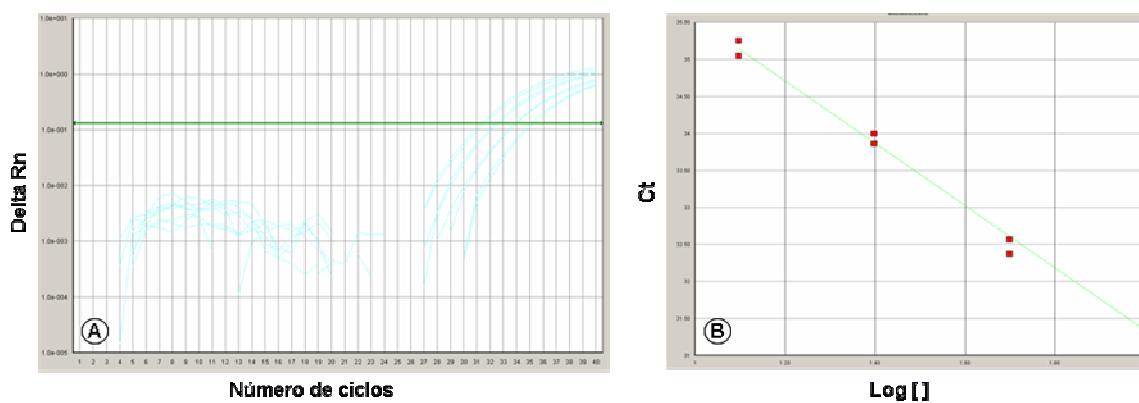


Figura 2. **A.** Gráfico da curva de amplificação da PCR em tempo real para IL-1 β das diluições do cDNA de referência utilizado como padrão nas reações. Em ordem decrescente de diluição, da esquerda para a direita, apresentam-se as diluições 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64. **B.** Gráfico da curva padrão, construída com quatro pontos nas referidas diluições, obtida a partir da PCR em tempo real para IL-1 β .

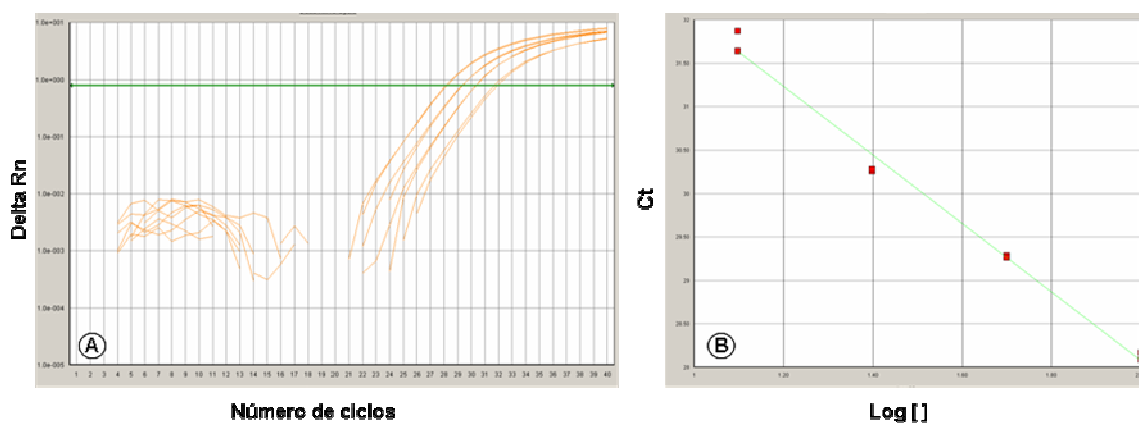


Figura 3. **A.** Gráfico da curva de amplificação da PCR em tempo real para IL-8 das diluições do cDNA de referência utilizado como padrão nas reações. Em ordem decrescente de diluição, da esquerda para a direita, apresentam-se as diluições 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64. **B.** Gráfico da curva padrão, construída com quatro pontos nas referidas diluições, obtida a partir da PCR em tempo real para IL-8.

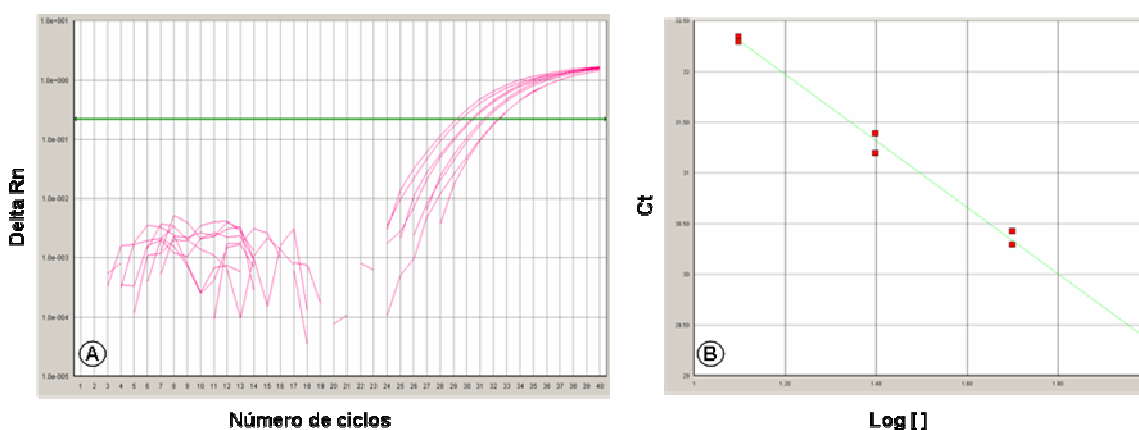


Figura 4. **A.** Gráfico da curva de amplificação da PCR em tempo real para β actina das diluições do cDNA de referência utilizado como padrão nas reações. Em ordem decrescente de diluição, da esquerda para a direita, apresentam-se as diluições 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64. **B.** Gráfico da curva padrão construída com quatro pontos nas referidas diluições obtido a partir da PCR em tempo real para β actina.

3.3.2. Determinação da curva padrão na PCR em tempo real para os genes da IL-6 e TNF- α com TaqMan[®]

As diluições do cDNA de referência testadas para serem utilizadas na quantificação relativa da expressão de IL-6 e TNF- α estão representadas na Tabela 7 e nas Figuras 5 e 6. 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 7. Valor relativo e Ct do cDNA de referência para IL-6 e TNF- α obtidos, em diferentes diluições, pela PCR em tempo real das amostras de membranas corioamnióticas.

cDNA	Valor relativo	Ct IL-6	Ct TNF- α
1:2	100	29,5	26,9
1:4	50	30,5	28,6
1:8	25	31,6	30,4
1:16	12,5	33,1	32,5

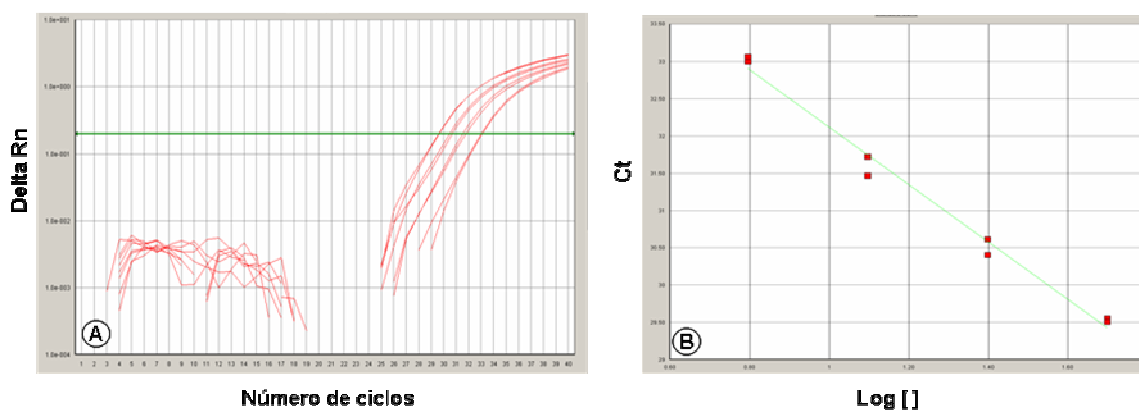


Figura 5. **A.** Gráfico da curva de amplificação da PCR em tempo real para IL-6 das diluições do cDNA de referência utilizado como padrão nas reações. Em ordem decrescente de diluição, da esquerda para a direita, apresenta-se as diluições 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16. **B.** Gráfico da curva padrão construída com quatro pontos nas referidas diluições obtido a partir da PCR em tempo real para IL-6.

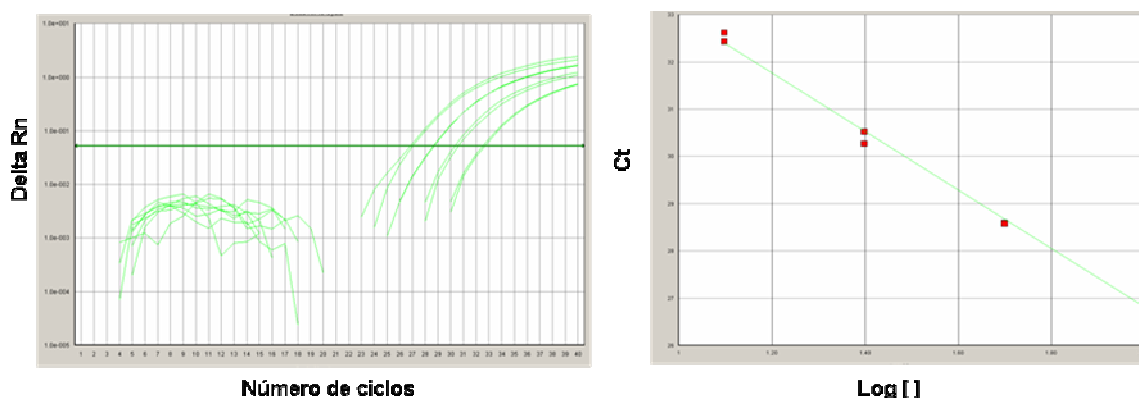


Figura 6. **A.** Gráfico da curva de amplificação da PCR em tempo real para TNF- α das diluições do cDNA de referência utilizado como padrão nas reações. Em ordem decrescente de diluição, da esquerda para a direita, apresentam-se as diluições 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16. **B.** Gráfico da curva padrão construída com quatro pontos nas referidas diluições obtido a partir da PCR em tempo real para TNF- α .

3.3.3. Detecção de RNAm de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α nas membranas corioamnióticas

Do total de amostras processadas em cada grupo, o RNAm para todas as citocinas avaliadas foi detectado em 95,8% no grupo RPM-PT em TP, 83,3% no grupo RPM-PT fora de TP e em 82,6% em TPP.

3.3.4. Quantificação relativa de RNAm de IL-1 β nas membranas corioamnióticas

A quantificação relativa de RNAm de IL-1 β nas membranas corioamnióticas das gestantes com RPM-PT em TP, RPM-PT fora de TP e em TPP está apresentada na Figura 7. Podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de IL-1 β entre os grupos ($p=0,09$).

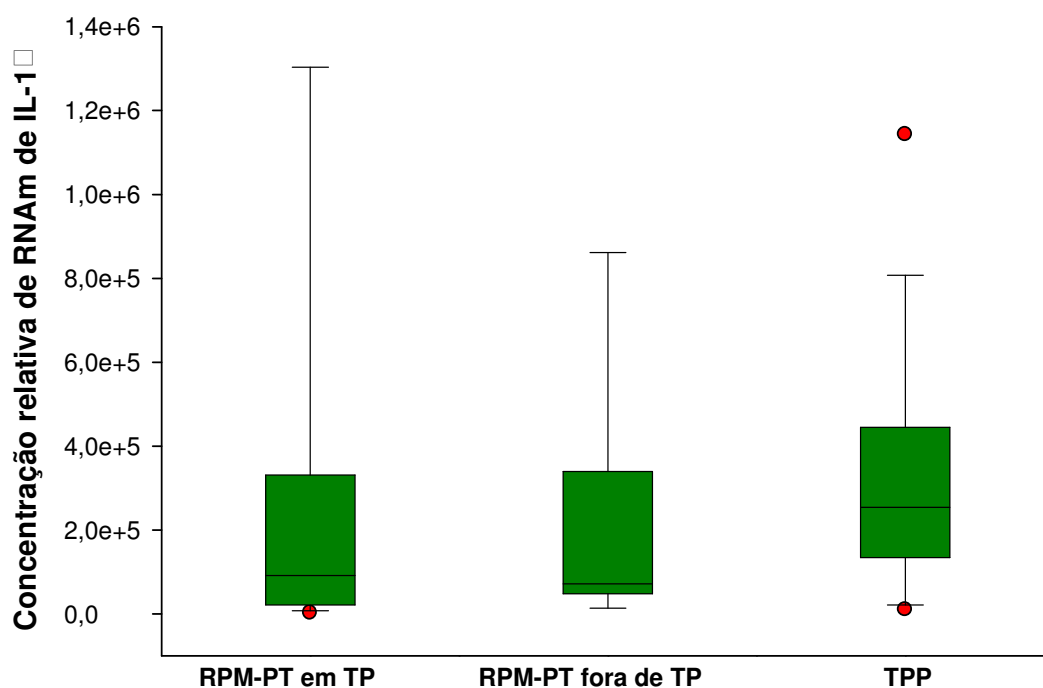


Figura 7. *Box-Plot* representando a concentração relativa de RNAm de IL-1 β em membranas corioamnióticas de gestantes pertencentes aos grupos RPM-PT em TP, RPM-PT fora de TP e TPP. No *Box-plot*, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores, o traço horizontal, a mediana; as barras de erro correspondem aos percentis 5 e 95; e os círculos, os valores *outliers*.

3.3.5. Quantificação relativa de RNAm de IL-6 nas membranas corioamnióticas

A quantificação relativa de RNAm de IL-6 nas membranas corioamnióticas das gestantes com RPM-PT em TP, RPM-PT fora de TP e em TPP está apresentada na Figura 8. Podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de IL-6 entre os grupos ($p=0,18$).

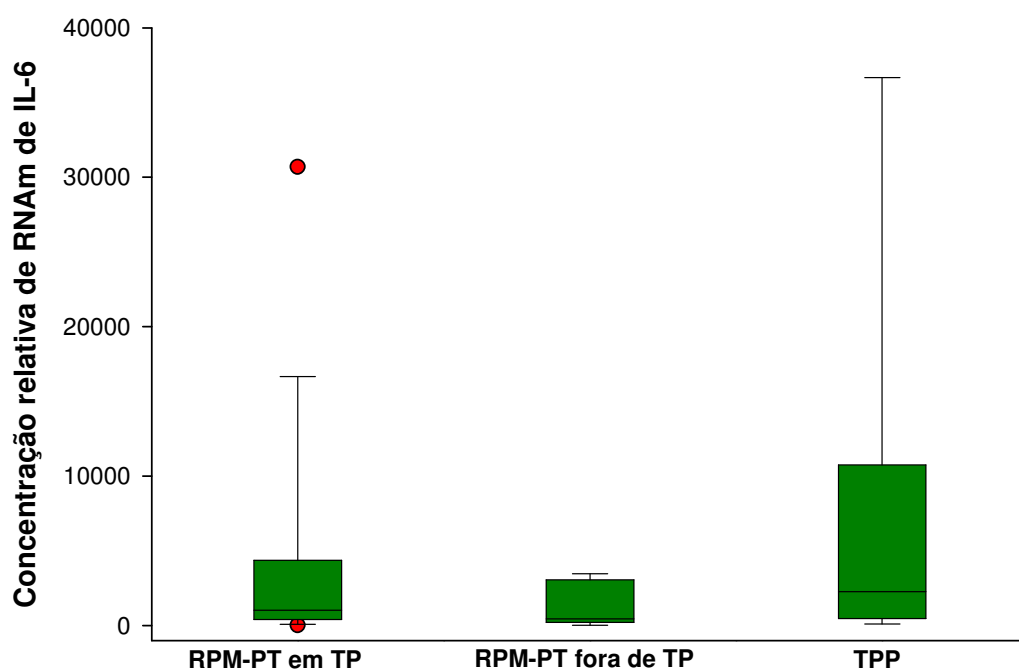


Figura 8. *Box-Plot* representando a concentração relativa de RNAm de IL-6 em membranas corioamnióticas de gestantes pertencentes aos grupos RPM-PT em TP, RPM-PT fora de TP e TPP. No *Box-plot*, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores, o traço horizontal, a mediana; as barras de erro correspondem aos percentis 5 e 95; e os círculos, os valores *outliers*.

3.3.6. Quantificação relativa de RNAm de IL-8 nas membranas corioamnióticas

A quantificação relativa de RNAm de IL-8 nas membranas corioamnióticas das gestantes com RPM-PT em TP, RPM-PT fora de TP e em TPP está apresentada na Figura 9. Podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos RPM-PT e TPP na expressão de IL-8, porém, nesse último grupo, existe uma tendência à significância ($p=0,053$) (Figura 9).

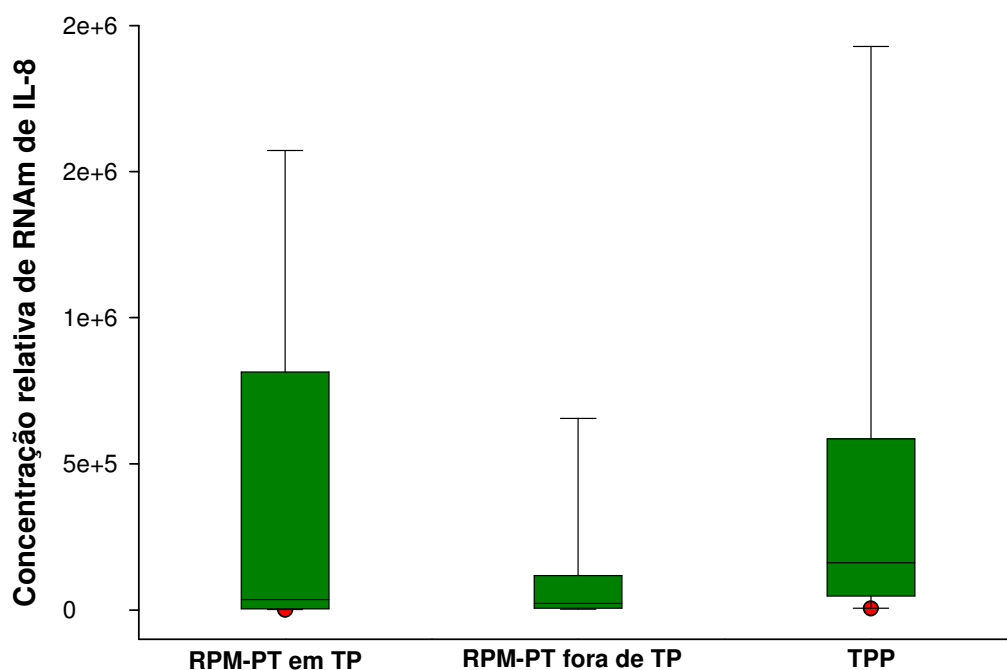
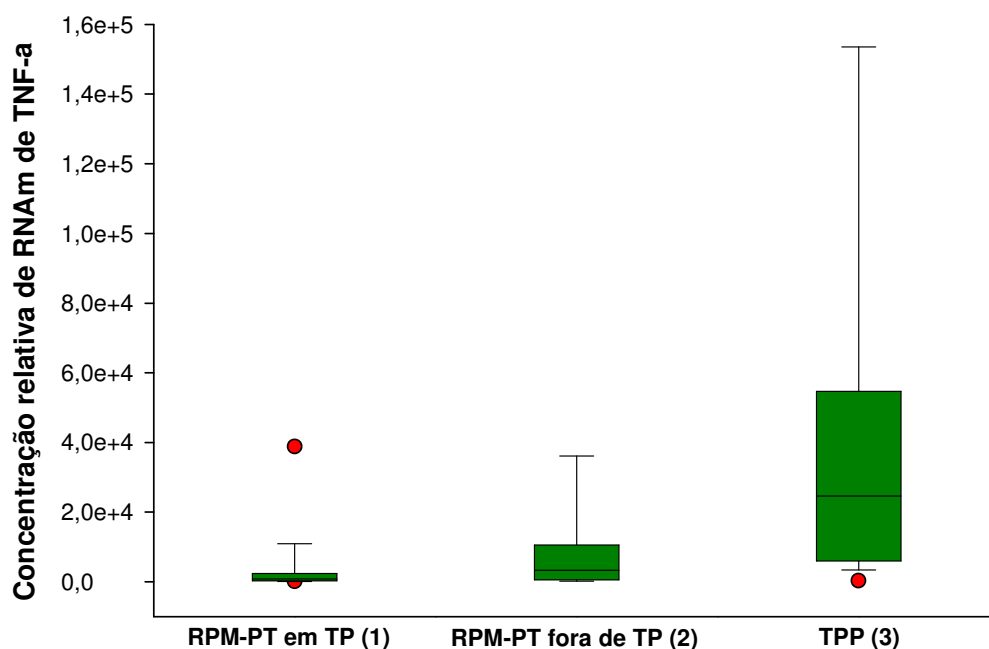


Figura 9. *Box-Plot* representando a concentração relativa de RNAm de IL-8 em membranas corioamnióticas de gestantes pertencentes aos grupos RPM-PT em TP, RPM-PT fora de TP e TPP. No *Box-plot*, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores, o traço horizontal, a mediana; as barras de erro correspondem aos percentis 5 e 95; e os círculos, os valores *outliers*.

3.3.7. Quantificação relativa de RNAm de TNF- α nas membranas corioamnióticas

A quantificação relativa de RNAm de TNF- α nas membranas corioamnióticas das gestantes com RPM-PT em TP, RPM-PT fora de TP e em TPP está apresentada na Figura 10. Podemos observar que a quantificação relativa foi significativamente maior no grupo TPP em relação aos grupos RPM-PT em TP e RPM-PT fora de TP e não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de TNF- α entre os grupos com RPM-PT.



(3) \neq (2), (3) \neq (1), (2) = (1), $p < 0,001$; Teste de Dunn.

Figura 10. *Box-Plot* representando a concentração relativa de RNAm de TNF- α em membranas corioamnióticas de gestantes pertencentes aos grupos RPM-PT em TP, RPM-PT fora de 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*.

3.3.8. Quantificação relativa de RNAm de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α nas membranas corioamnióticas em relação à presença do infiltrado inflamatório

A quantificação relativa de RNAm de IL-6, IL-8 e TNF- α foi avaliada em relação a presença do infiltrado inflamatório nas membranas corioamnióticas. A análise estatística não apontou diferença significativa entre a expressão dessas citocinas e presença do infiltrado inflamatório dentro dos grupos RPM-PT em TP, RPM-PT fora de TP e em TPP (Figuras 11, 12 e 13). Para a IL-1 β , no grupo RPM-PT fora de TP, existe relação entre a concentração de RNAm e presença de infiltrado inflamatório (Figura 14).

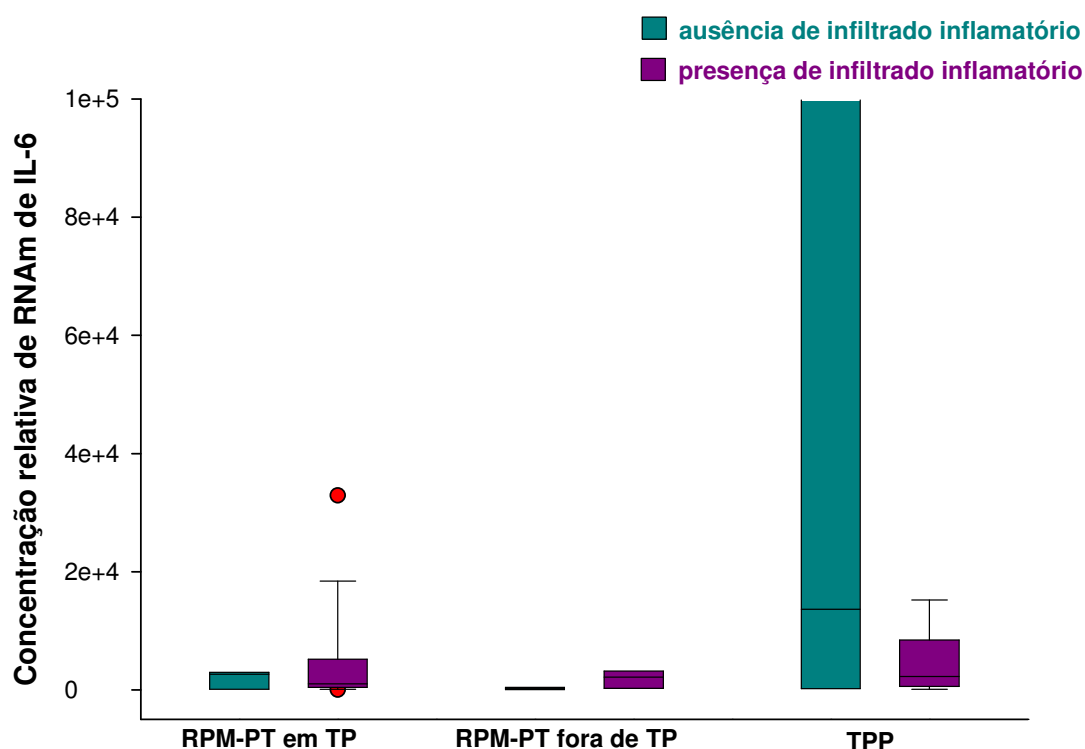


Figura 11. *Box-Plot* representando a concentração relativa de RNAm de IL-6 em membranas corioamnióticas de gestantes pertencentes aos grupos RPM -PT em TP, RPM-PT fora de TP e TPP em relação à presença do infiltrado inflamatório. No *Box-plot*, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores, o traço horizontal, a mediana; as barras de erro correspondem aos percentis 5 e 95; e os círculos, os valores *outliers*.

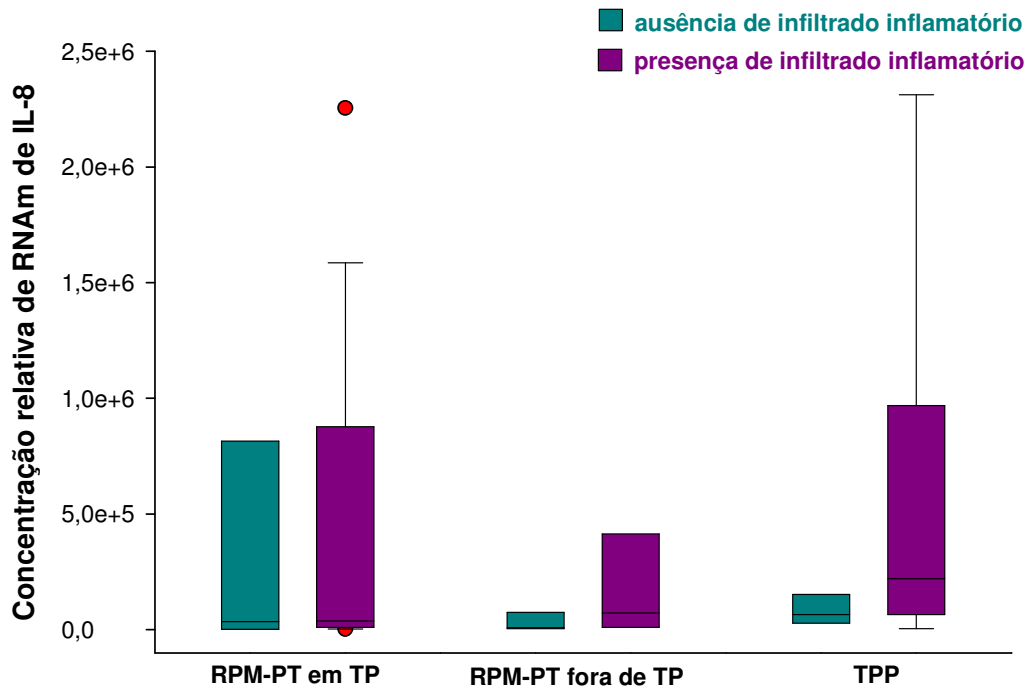


Figura 12. *Box-Plot* representando a concentração relativa de RNAm de IL-8 em membranas corioamnióticas de gestantes pertencentes aos grupos RPM -PT em TP, RPM-PT fora de TP e TPP em relação à presença do infiltrado inflamatório. No *Box-plot*, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores, o traço horizontal, a mediana; as barras de erro correspondem aos percentis 5 e 95; e os círculos, os valores *outliers*.

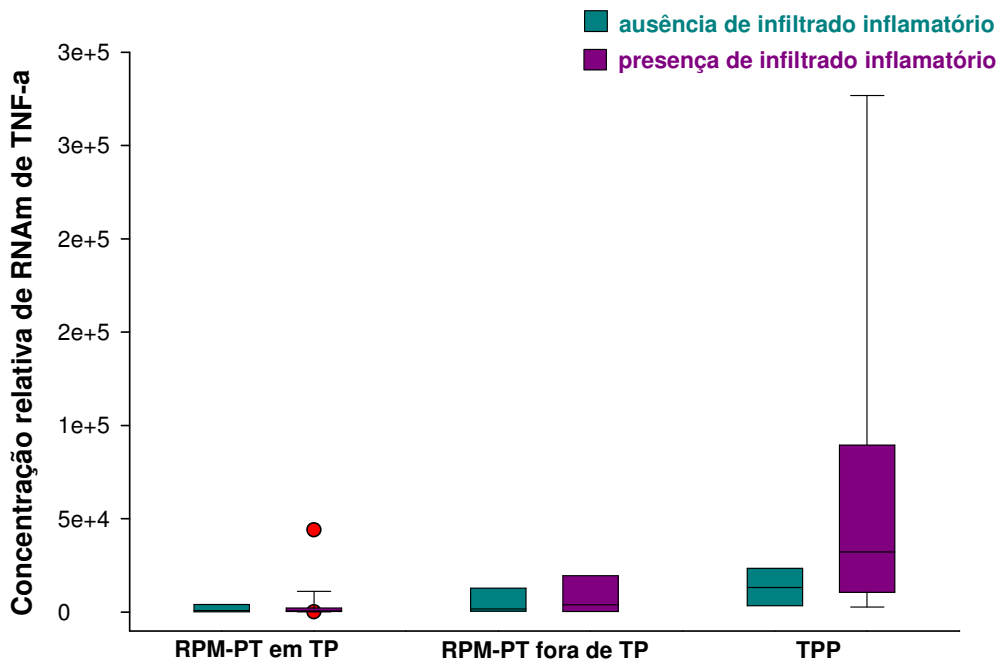


Figura 13. *Box-Plot* representando a concentração relativa de RNAm de TNF- α em membranas corioamnióticas de gestantes pertencentes aos grupos RPM -PT em TP, RPM-PT fora de TP e TPP em relação à intensidade do infiltrado inflamatório. No *Box-plot*, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores, o traço horizontal, a mediana; as barras de erro correspondem aos percentis 5 e 95; e os círculos, os valores *outliers*.

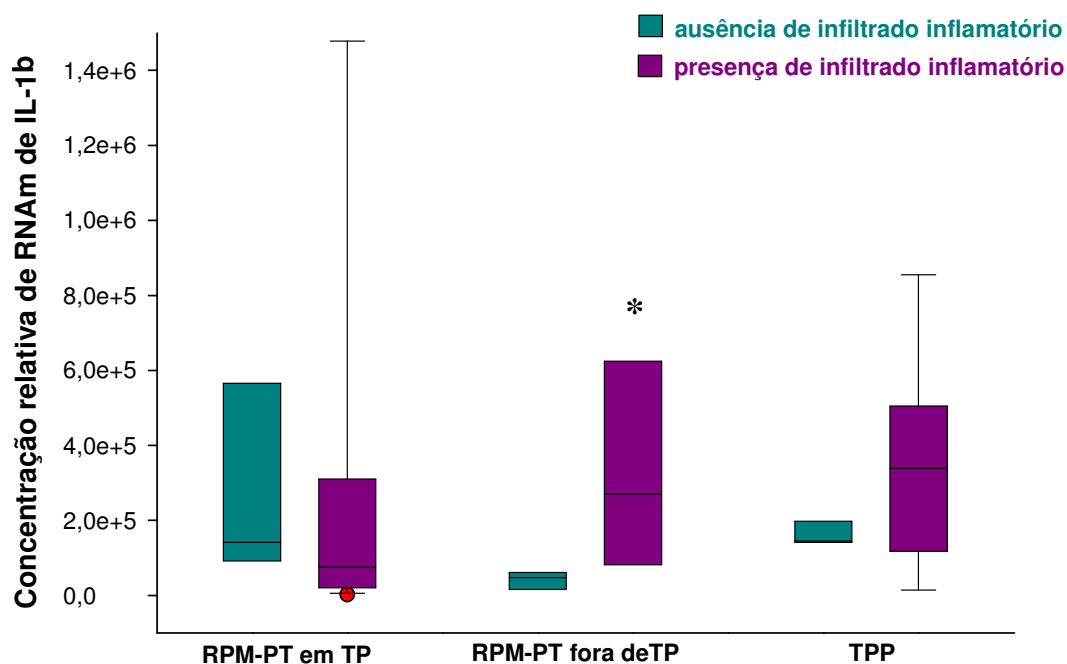


Figura 14. *Box-Plot* representando a concentração relativa de RNAm de IL-1 β em membranas corioamnióticas de gestantes pertencentes aos grupos RPM-PT em TP, RPM-PT fora de TP e TPP em relação à presença do infiltrado inflamatório. No *Box-plot*, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores, o traço horizontal, a mediana; as barras de erro correspondem aos percentis 5 e 95; e os círculos, os valores *outliers*.

3.3.9. Quantificação relativa de RNAm de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α nas membranas corioamnióticas em relação à intensidade do infiltrado inflamatório.

A quantificação relativa de RNAm para todas as citocinas avaliadas não esteve relacionada à intensidade do infiltrado inflamatório presente nas membranas corioamnióticas dentro dos grupos RPM-PT em TP, RPM-PT fora de TP e em TPP (Figuras 15 a 18). Para essa avaliação foram agrupados os achados histopatológicos de ausência de infiltrado inflamatório e intensidade discreta e os achados de infiltrado inflamatório moderado e intenso presente nas membranas.

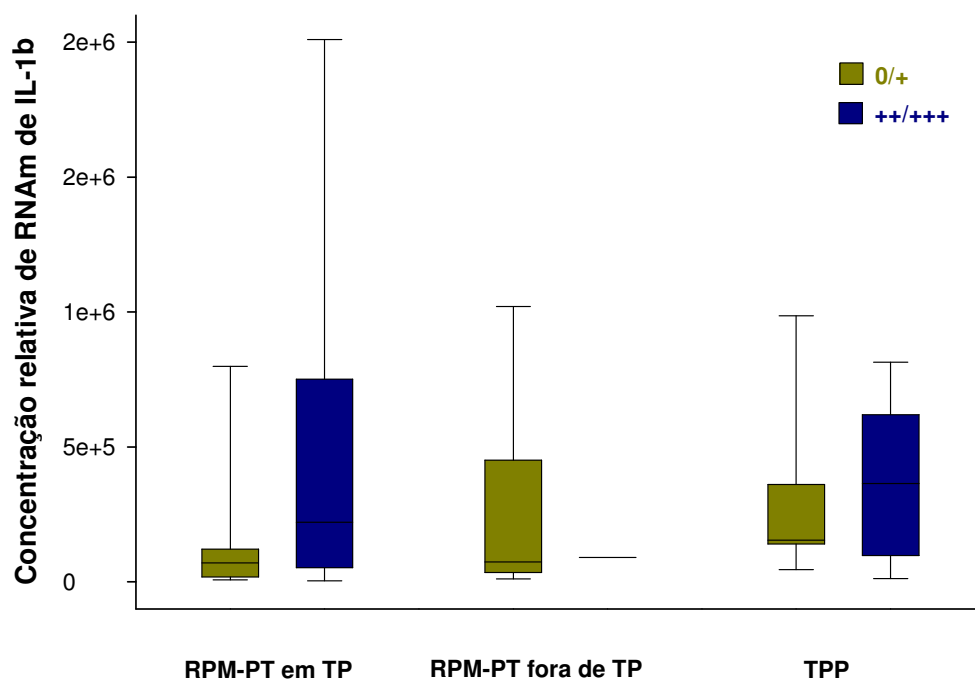


Figura 15. *Box-Plot* representando a concentração relativa de RNAm de IL-1 β em membranas corioamnióticas de gestantes pertencentes aos grupos RPM-PT em TP, RPM-PT fora de TP e TPP em relação à intensidade do infiltrado inflamatório. No *Box-plot*, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores, o traço horizontal, a mediana; as barras de erro correspondem aos percentis 5 e 95; e os círculos, os valores *outliers*.

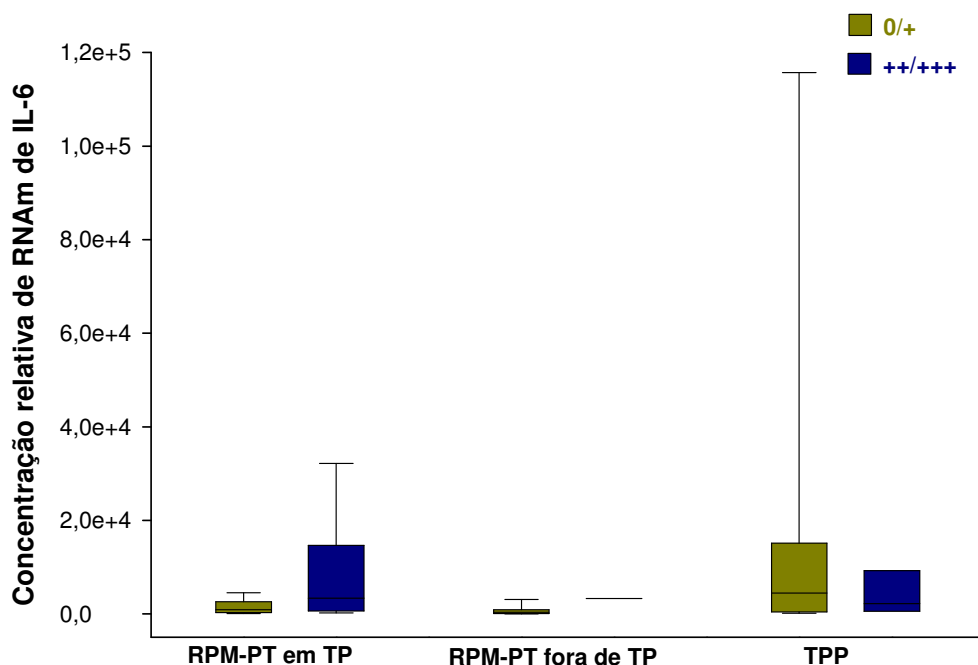


Figura 16. *Box-Plot* representando a concentração relativa de RNAm de IL-6 em membranas corioamnióticas de gestantes pertencentes aos grupos RPM-PT em TP, RPM-PT fora de TP e TPP em relação à intensidade do infiltrado inflamatório. No *Box-plot*, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores, o traço horizontal, a mediana; as barras de erro correspondem aos percentis 5 e 95; e os círculos, os valores *outliers*.

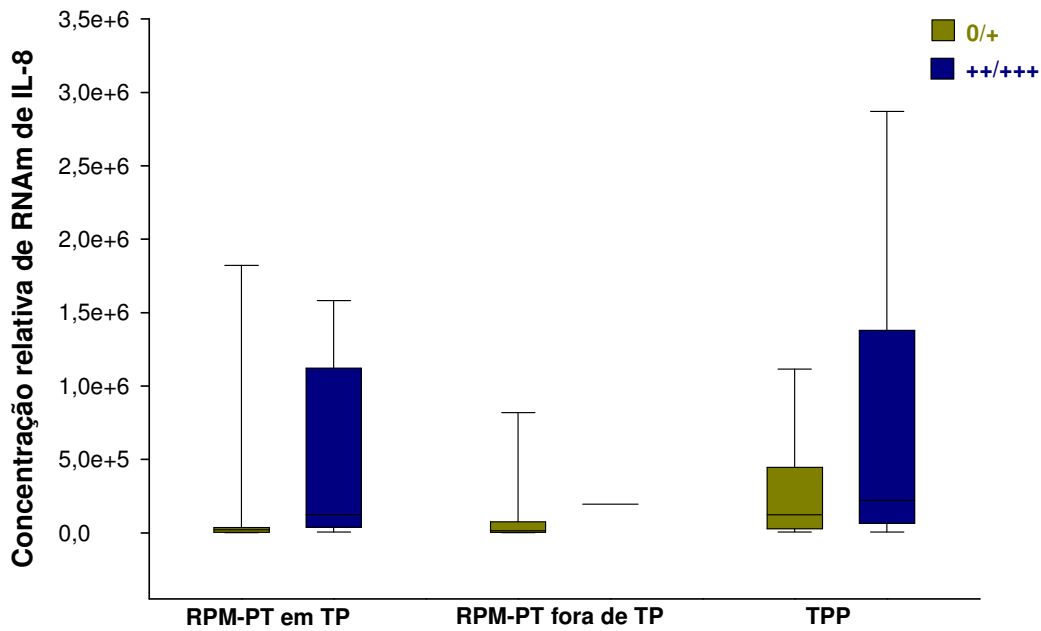


Figura 17. *Box-Plot* representando a concentração relativa de RNAm de IL-8 em membranas corioamnióticas de gestantes pertencentes aos grupos RPM-PT em TP, RPM-PT fora de TP e TPP em relação à intensidade do infiltrado inflamatório. No *Box-plot*, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores, o traço horizontal, a mediana; as barras de erro correspondem aos percentis 5 e 95; e os círculos, os valores *outliers*.

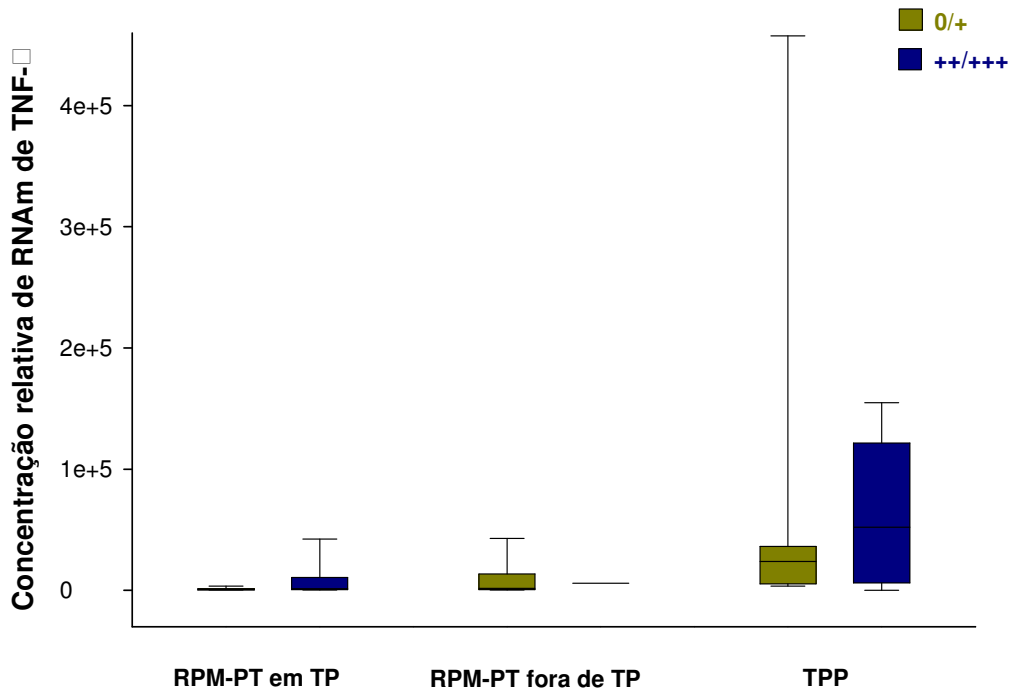


Figura 18. *Box-Plot* representando a concentração relativa de RNAm de TNF-α em membranas corioamnióticas de gestantes pertencentes aos grupos RPM-PT em TP, RPM-PT fora de TP e TPP em relação à intensidade do infiltrado inflamatório. No *Box-plot*, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores, o traço horizontal, a mediana; as barras de erro correspondem aos percentis 5 e 95; e os círculos, os valores *outliers*.

4. Discussão

No presente estudo foi analisado quantitativamente o RNAm de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α 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 íntegra, constituindo o grupo controle do estudo. Também foi objetivo desse trabalho avaliar a relação entre presença e intensidade do infiltrado inflamatório nas membranas corioamnióticas com a expressão das citocinas de interesse.

No período do estudo, a frequência de RPM foi de 5,9% em gestações de termo e 4,6% em gestações pré-termo. Segundo Polzin & Brady³⁰, 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. O trabalho de parto prematuro em gestantes com bolsa íntegra, no presente estudo, ocorreu em 7,9% das gestações, frequência similar à descrita pelo ACOG³¹ de 6 a 8% de todas as gestações. Nas gestações de termo e pré-termo, a literatura atual com dados do Serviço de Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, descreve frequências similares^{26,28}.

A similaridade das variáveis sócio-demográficas e obstétricas entre as pacientes constituintes dos grupos estudados demonstrou homogeneidade entre os mesmos. Em relação ao hábito de fumar, alguns autores^{4,5} consideram o tabagismo como sendo fator de risco para RPM-PT, porém, no presente estudo, a porcentagem de mulheres fumantes não foi diferente nos grupos RPM-PT e TPP. Esses dados estão de acordo com Naeye⁶ e Mercer et al.³²

que não demonstraram associação entre tabagismo e RPM-PT. Segundo Lee & Silver¹, esse aspecto ainda permanece controverso.

Quanto aos antecedentes obstétricos, a frequência de TPP, RPM e abortos anteriores foi a mesma nos 3 grupos estudados, demonstrando que complicações obstétricas anteriores podem ser consideradas como fator de risco para desencadeamento de RPM-PT, como sugerido por vários autores^{6,11,32}.

A concentração relativa de RNAm das citocinas avaliadas no presente estudo mostra que não houve diferença entre os grupos estudados, em relação a IL-1 β , IL-6 e IL-8, e esses resultados estão concordantes com a fisiopatologia da RPM-PT e do TPP. Embora já esteja bem estabelecido que a ascensão bacteriana do trato genital inferior para as membranas corioamnióticas e decídua é o evento chave na etiologia da RPM bem como no TPP, pois ambas são caracterizadas por elevadas concentrações de citocinas inflamatórias no líquido amniótico³³⁻³⁵, o mecanismo pelo qual se instala a RPM em determinadas gestações e o TPP em outras, não está completamente elucidado. Nesse sentido, Fortunato et al.¹⁹ descrevem que muitos fatores moleculares como a ativação de metaloproteinases (MMP) e elementos pró-apoptóticos estão aumentados, especificamente durante a RPM, quando comparada com o TPP. Em trabalho posterior, Fortunato et al.²⁰ examinando a influência de IL-1, IL-6 e TNF- α na expressão e atividade de MMP sobre as membranas corioamnióticas, descrevem que a MMP-9, colagenase do tipo IV, é influenciada apenas pelo TNF- α e não por outras citocinas pró-inflamatórias. Segundo esses autores, o TNF- α é a única citocina com capacidade de ativar MMP, aumentando a atividade gelatinase e enfraquecendo as membranas corioamnióticas, cujo principal componente da matriz extracelular que conecta

o âmnion ao córion é o colágeno do tipo IV. Também é capaz de induzir apoptose nas membranas fetais¹⁹, sugerindo que a biodisponibilidade do TNF, a apoptose e a atividade de MMP são os mecanismos responsáveis pela rotura prematura de membranas.

No presente trabalho, a concentração relativa de TNF- α está significativamente aumentada no grupo TPP. A literatura mostra que o TNF parece mediar uma série de eventos na gestação. Segundo Daher et al.³⁶, os achados de níveis aumentados de TNF fornecem evidências do papel dessa citocina na indução do trabalho de parto. Essa hipótese é defendida por outros autores, que demonstram que o TNF age em sinergismo com outras citocinas inflamatórias, estimulando a síntese e liberação de prostaglandinas, induzindo contratilidade uterina e o início do trabalho de parto³⁷⁻³⁹.

Em relação ao infiltrado inflamatório presente nas membranas corioamnióticas e/ou decídua, a freqüência em nosso estudo foi de 88% no grupo RPM-PT em TP; 53% em RPM-PT fora de TP e em 84% no grupo TPP. Incidência similar é descrita na literatura, variando de 30 a 80% nos casos de RPM⁴⁰⁻⁴², e atingindo até 75% nas pacientes em TPP^{13,43-45}. Segundo Ramsey et al.⁴⁶, a incidência de corioamnionite aumenta significativamente em idades gestacionais inferiores.

Quando analisamos a presença e intensidade do infiltrado inflamatório nas membranas corioamnióticas e/ou decídua não observamos associação entre esses achados e concentração relativa de RNAm de IL-6, IL-8 e TNF- α nos grupos RPM-PT e TPP. Nos grupos RPM-PT, esses resultados podem ser atribuídos ao tempo de rotura das membranas corioamnióticas no momento da resolução da gestação. Em relação a essa variável, no momento do parto pudemos observar que 56% das gestantes em RPM-PT em TP e 54% delas no

RPM-PT fora de TP tinham mais de 24 horas de rotura. Esse período se torna importante se considerarmos que, no momento da resolução da gestação, com períodos de latência superiores a 24 horas, chegando até 11 dias no grupo RPM-PT fora de TP, a produção de citocinas pró-inflamatórias pode estar sendo regulada pelas citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10. Esta citocina, que foi originalmente descrita como um produto de células TH2 é capaz de suprimir a produção de citocinas e proliferação das células TH1⁴⁷.

Somente no grupo RPM-PT fora de TP a concentração relativa de IL-1 β esteve significativamente aumentada na presença de infiltrado inflamatório. Nesse grupo, a expressão das demais citocinas estudadas pode estar sendo regulada no período pós-transcrição.

Em estudo anterior²⁶, utilizando imuno-histoquímica, estabeleceu-se critérios para análise semi-quantitativa da expressão de citocinas inflamatórias, na ausência e presença de corioamnionite, pelas células do epitélio amniótico, células coriônicas e deciduais. Observou-se predomínio de marcação variando de moderada à intensa para IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , havendo maior frequência de depósito intenso para IL-1 β e TNF- α nas membranas com corioamnionite. A diferença entre esse estudo e o atual é o tempo de rotura das membranas no momento do parto. No estudo anterior, 76,7% das gestantes apresentavam menos de 24 horas de rotura das membranas no momento do parto. Ainda nesse estudo²⁶, os dados relativos à imunomarcação das citocinas nas membranas corioamnióticas mostraram predomínio de discreto depósito de IL-1 β , IL-6, IL-8 em gestantes normais de termo. Portanto, as membranas corioamnióticas incluídas no presente estudo, por apresentarem um tempo de latência relativamente grande, podem estar apresentando níveis elevados de

citocinas anti-inflamatórias que já estariam regulando a cascata de produção das citocinas inflamatórias.

No grupo TPP também não observamos associação entre a concentração de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α e presença de infiltrado inflamatório. Segundo Laham et al.²⁴, estudos *in vitro* de produção de citocinas por tecidos gestacionais demonstraram que a liberação de IL-8 pelas células amnióticas e coriodecíduais, em gestações em trabalho de parto prematuro, não diferia na presença ou não de corioamnionite. Para esses autores, o efeito da presença de corioamnionite não pode ser confirmado em tecidos gestacionais pré-termo. Ainda em relação à concentração relativa de RNAm para as citocinas Shimoya et al.²⁵ descreveram resultados similares aos do presente estudo, não demonstrando aumento da expressão de RNAm para IL-8 na presença de corioamnionite. Por outro lado, Zhao et al.⁴⁸ relataram que a presença de infiltrado inflamatório intenso nas membranas corioamnióticas está associada com elevados níveis de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , quando comparada com membranas livres de infiltrado inflamatório.

Assim, não podemos deixar de considerar que a presença de RNAm não significa, necessariamente, produção de citocinas. A transcrição consiste na síntese do RNA e resulta em uma seqüência de RNA complementar ao comprimento total do gene⁴⁹.

A quantidade de proteína produzida depende da estabilidade dos RNAm correspondentes 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 seus RNAm geralmente têm uma meia-vida curta, em torno de 30 minutos ou menos⁵⁰.

Portanto, 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 correlacionado à quantidade da proteína; a sensibilidade e variação dinâmica dos métodos existentes são tais que os RNAm que estão em menor 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 RNAm⁵¹.

Os achados do presente estudo não permitem relacionar a intensidade do infiltrado inflamatório presente nas membranas corioamnióticas com a concentração relativa de RNAm para as citocinas de interesse. Sem dúvida, esses achados podem ser complementados com a quantificação das citocinas, por *Western Blott* seguido de *immunoblotting* com reagente quimioluminescente, presente nas membranas.

7. Referências Bibliográficas

1. Lee T, Silver H. Etiology and epidemiology of preterm premature rupture of the membranes. *Clin Perinatol.* 2001;28:721-734.
2. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol.* 2003;101:178-193.
3. Savitz DA, Blackmore CA, Thorp JM. Epidemiologic characteristics of preterm delivery: Etiologic heterogeneity. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;164:467-471.
4. Kyrklund-Blomberg NB, Granath F, Cnattingius S. Maternal smoking and causes of very preterm birth. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005;84:572-577.
5. Simhan HN, Caritis SN, Krohn MA, Hillier SL. The vaginal inflammatory milieu and risk of early premature preterm rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192:213-218.
6. Naeye RL. Factors that predispose to premature rupture of the fetal membranes. *Obstet Gynecol.* 1982;60:93-98.
7. Scholl TO, Hediger ML, Schall JI, Fisher RL, Khoo CS. Low zinc intake during pregnancy: its association with preterm and very preterm delivery. *Am J Epidemiol.* 1993;137:1115-1124.
8. Casanueva E, Ripoll C, Meza-Camacho C, Coutiño B, Ramírez-Peredo J, Parra A. Possible interplay between vitamin C deficiency and prolactin in pregnant women with premature rupture of membranes: facts and hypothesis. *Med Hypotheses.* 2005;64:241-247.
9. French JI, McGregor JA. The pathobiology of premature rupture of membranes. *Semin Perinatol.* 1996;20:344-368.
10. Spinillo A, Piazzzi NG, Ghazal K, Colonna L, Baltaro F. Epidemiological correlates of preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynecol Obstet.* 1994;4:7-15.

11. Harger JH, Hsing AW, Tuomala RE, Gibbs RS, Mead PB, Eschenbach DA, et al. Risk factors for preterm premature rupture of membranes: a multicenter case-control study. *Am J Obstet Gynecol.* 1990;163:130-137.
12. Parry S, Strauss JF. Mechanism of disease: Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med.* 1998;339:1434-1439.
13. Gonçalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002;8:3-13.
14. Gomez R, Romero R, Edwin SS, David C. Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. *Infect Dis Clin North Am.* 1997;11:135-176.
15. Menon R, Fortunato SJ. Fetal membranes inflammatory cytokines: a switching mechanism between the preterm premature rupture of membranes and preterm labor pathways. *J Perinat Med.* 2004;32:391-399.
16. Jacobsson B, Mattsby-Baltzer I, Andersch B, Bokström H, Holst R, Nikolaitchouk N, et al. Microbial invasion and cytokine response in amniotic fluid in a Swedish population of women with preterm prelabor rupture of membranes. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003;82:423-431.
17. Shobokshi A, Shaarawy M. Maternal serum and fluid cytokines in patients with preterm premature rupture of membranes with and without intrauterine infection. *Int J Gynecol Obstet.* 2002;79:209-215.
18. 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.
19. 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;182:1468-1476.
20. 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;187:1159-1162.

21. 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;169:1467-1471.
22. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T. Cytokine production in chorioamnionitis. *J Reprod Immunol.* 2000;47:185-196.
23. Kauma SW, Johnson DE. The expression and localization of IL-1 β mRNA in chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;163:1430-1437.
24. Laham N, Brennecke SP, Rice GE. Interleukin-8 release from human gestational tissue explants: effect of gestation, labor, and chorioamnionitis. *Biol Reprod* 1999;61:823-827.
25. Shimoya K, Matsuzaki N, Taniguchi T, Kameda T, Koyama M, Neki R, et al. Human placenta constitutively produces interleukin-8 during pregnancy and enhances its production in intrauterine infection. *Biol Reprod.* 1992;47:220-225.
26. MG Silva. Pesquisa de *Staphylococcus* toxigênicos e de citocinas inflamatórias em membranas corioamnióticas de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo. [Tese]. Botucatu. Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, 2003.
27. Gestação de Alto Risco/ Secretaria de Políticas, Área Técnica da Saúde da Mulher – Brasília: Ministério da Saúde, 2000.
28. 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;81:175-182.
29. Zar JH. *Bioestatistical Analysis.* 4th edition. New Jersey: Prentice Hall, 1999.
30. Polzin WJ, Brady K. Mechanical factors in the etiology of premature rupture of the membranes. *Clin Obstet Gynecol.* 1991;34:702-714.
31. American College of Obstetricians and Gynecologists – Preterm labor. *Techn Bull ACOG.* 1989;133:1-5.
32. Mercer BM, Goldenberg RL, Meis PJ, Moawad AH, Shellhass C, Das A, et al. The preterm prediction study: prediction of preterm premature rupture of

- membranes through clinical findings and ancillary testing. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183:738-745.
33. Casey ML, Cox SM, Beuther B, Milewich L, MacDonald PC. Cachectin/ tumor necrosis factor α formation in the human decidua: potential role of cytokines in infection-induced preterm labor. *J Clin Invest.* 1989;83:430-436.
 34. Romero R, Avila C, Santhanam U, Sehgal PB. Amniotic fluid interleukin-6 in PTL: association with infection. *J Clin Invest.* 1990;85:1392-1400.
 35. Romero R, Brody DT, Oyarzun E, Mazor M, Wu YK, Hobbins JC, et al. Infection and labor: III, interleukin-1: a signal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;160:1117-1123.
 36. Daher S, Fonseca F, Ribeiro OG, Musatti CC, Gerbase-DeLima M. Tumor necrosis factor during pregnancy and the onset of labor and spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;83:77-79.
 37. Halgunset J, Johnsen H, Kjollesdal AM, Qvigstad E, Espevik T, Austgulen R. Cytokine levels in amniotic fluid and inflammatory changes in the placenta from normal deliveries at term. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1994;56:153-160.
 38. Hunt JS, Chen HL, Miller L. Tumor necrosis factor: pivotal components of pregnancy?. *Biol Reprod.* 1996;54:554-562.
 39. Inglis SR, Jeremias J, Kuno K, Lescale K, Peeper Q, Chervenak FA, et al. Detection of tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and fetal fibronectin in the lower genital tract during pregnancy: relation to outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;171:5-10.
 40. Nguyen TM, Meyer WJ, Gauthier DW, Myles T. Chorioamnionitis does not affect fetal urine production in patients with premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Med.* 1997;6:96-98.
 41. Ghidini A, Salafia CM, Kirn V, Doria V, Spong CY. Biophysical profile in predicting acute ascending infection in preterm rupture of membranes before 32 weeks. *Obstet Gynecol.* 2000;96:201-206.

42. Hensch SA, Stephens L, Markenson G, Bsat F. Prediction of pregnancy outcome in preterm premature rupture of membranes using vaginal pool amniotic fluid markers. *Obstet Gynecol.* 2001;97:S5.
43. Fortunato SJ, Menon R. Distinct molecular events suggest different pathways for preterm labor and premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184:1399-1406.
44. Mueller-Heubach E, Rubinstein DW, Schwarz SS. Histologic chorioamnionitis and preterm delivery in different patients populations. *Obstet Gynecol.* 1990;75:622-626.
45. Gibbs S, Romero R, Hillier SL, Eschenbach DA, Sweet L. A review of premature birth and subclinical infection. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;166:1515-1528.
46. Ramsey PS, Lieman JM, Brumfield CG, Carlo W. Chorioamnionitis increases neonatal morbidity in pregnancies complicated by preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192:1162-1166.
47. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989;170:2081-2095.
48. Zhao Y, Li S, Tong X. Serum concentration of interleukin-6 in maternal serum and its expression in amniochorionic membranes of preterm premature rupture of membrane. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 1999;34:138-139.
49. Strachan T, Read AP. *Genética Molecular Humana.* 2ª edição. Porto Alegre: ArtMed, 2002.
50. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP. *Biologia Celular e Molecular.* 5ª edição. Porto Alegre: ArtMed, 2005.
51. Binneck E. As ômicas: integrando a bioinformação. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* (serial online). 2004; 32:28-37 [cited 2006 Dec 20]. Available from: [http:// www.biotecnologia.com.br/revista/bio32/omicas_32.pdf](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio32/omicas_32.pdf)

Anexos



UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA

Distrito de Rubião Júnior, s/nº - Caixa Postal 564 - CEP 18.618-000 – Botucatu - SP - Brasil
☎(014) 6 802-6238 - Ramais 6146/6042/6238 - Fax (014) 6821-2348

FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

A pesquisa intitulada “Análise quantitativa da expressão de citocinas inflamatórias em membranas corioamnióticas de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo” tem como objetivo entender os mecanismos responsáveis pela rotura prematura de membranas, uma complicação gestacional muito importante que tem como maior risco materno a infecção e como riscos fetais a prematuridade e a infecção fetal e neonatal.

Fui informada que no momento do parto, na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, serão colhidas amostras de placenta, membranas ovulares e cordão umbilical, de acordo com as técnicas de rotina padronizadas no serviço.

Eu
após ser devidamente esclarecida, aceito participar do projeto de pesquisa podendo a qualquer momento esclarecer dúvidas e desistir de participar do mesmo, sem prejuízo do atendimento que necessitar.

Também fui informada que meu nome não aparecerá quando os resultados forem divulgados.

Botucatu, de de 2005.

Assinatura do Paciente: _____.

Assinatura do Pesquisador

Jossimara Polettini

Endereço: Avenida Camilo Mazzoni, 1055 – Apto C42 – Jardim Paraíso, Botucatu
Telefone (14)38147513 / (19) 9736 24 11

Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Endereço: Rua Izidoro Bertaglia, 746 – Jardim Chácara dos Pinheiros, Botucatu
Telefone (14) 3815 -2551/ 3815 -2417



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



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



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 06 de dezembro de 2004

OF 612/2004-CEP
MACAH/asc

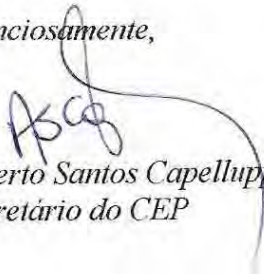
*Ilustríssima Senhora
Profª Drª Márcia Guimarães da Silva
Departamento de Patologia
Faculdade de Medicina de Botucatu*

Prezada Drª Márcia,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o projeto de pesquisa intitulado "Análise quantitativa da expressão de citocinas inflamatórias em membranas corioamnióticas de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo" de autoria de Jossimara Poletini, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 06/12/2004.

Situação do Projeto: APROVADO

Atenciosamente,



*Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP*