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

**ROTURA PREMATURA DE MEMBRANAS PRÉ-TERMO E
CORIOAMNIONITE HISTOLÓGICA: ASPECTOS DA
RESPOSTA IMUNE INATA E DE REPERCUSSÕES NO
PERÍODO NEONATAL**

Jossimara Polettini

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista - UNESP, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Botucatu - SP
2011

Jossimara Poletini

**ROTURA PREMATURA DE MEMBRANAS PRÉ-TERMO E
CORIOAMNIONITE HISTOLÓGICA: ASPECTOS DA
RESPOSTA IMUNE INATA E DE REPERCUSSÕES NO
PERÍODO NEONATAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista - UNESP, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Botucatu - SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Polettini, Jossimara.

Rotura prematura de membranas pré-termo e corioamnionite histológica :
aspectos da resposta imune inata e de repercussões no período neonatal /
Jossimara Polettini. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2011

Orientador: Márcia Guimarães da Silva

Capes: 40105008

1. Membranas fetais - Infecção. 2. Emergências neonatais.

Palavras-chave: Corioamnionite; Defensinas; Interleucina 18; Membranas
corioamnióticas; Repercussões neonatais; Rotura prematura de membranas pré-
termo.

Agradecimentos especiais

A Deus,

Pelas diversas situações que me faz vivenciar a cada dia e que se reflete em aprendizado, pela força que me faz perseverar, por cuidar de mim e dos meus amados...

Ao meu marido, Leonardo

Por somar aos meus dias alegrias, sonhos e planos. Por dividir as angústias e incertezas, pela garantia de um futuro feliz...

À minha família

Meus pais, João e Vera, meus irmãos, Jussara e Ismael e os seus, Luciano e Amanda, e minha Avó Benedita

À minha família do coração,

Oswaldo e Zulmira, Letícia e Leandro, Daniela e Marcelo, D. Lazineha

Pela acolhida sempre calorosa, conselhos, desabafos... Mesmo sem, às vezes, entender o porquê disso tudo, vocês me apoiaram incondicionalmente.

Aos pequenos e amados Davi e Henrique

Por trazerem a alegria mais intensa vivida até agora, por tornarem esses meses finais mais inspiradores. Vocês são apaixonantes.

À Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Pelos ensinamentos diários e pela paciência em ouvir e ensinar. Profissional exemplar, dedicada e sempre solícita. Sou privilegiada por ter sido você a responsável pela minha formação profissional e pessoal. É difícil expressar em palavras minha gratidão e admiração, obrigada pela confiança e por permitir que eu participasse da constituição e consolidação do seu grupo de pesquisa desde o início. Espero ter correspondido às suas expectativas, e sei que nossa cumplicidade e amizade serão para a vida toda.

Agradecimentos

Às pós-graduandas do Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal, Camila Marconi, Mariana Santos-Greatti, Ana Carolina Pereira, Eliane P. Vieira, Bruna R. A. Ramos, Larissa D. Marcolino, Nathalia Mayumi Noda, Natália P. Moço e Laura F. Martin, por dividirem o dia a dia, as conquistas, alegrias, PCR's errados... Entre risos, algumas lágrimas e muitas comidinhas, soubemos conviver com nossas diferenças a favor da realização da pesquisa, o que nos impulsiona nessa caminhada. Foi bom ensinar o pouco que sei e também aprender com vocês. Se faltou alguma oportunidade, faço-a agora. obrigada!

A todas as alunas de Iniciação Científica que estiveram conosco, em especial às 'japinhas' Juliana Takitane e Nathalia Mayumi Noda, e à Mariana P. Santos, que contribuíram diretamente com a realização desse trabalho.

Pelos amigos e companheiros de Pós-Graduação, que dividiram muitos momentos, angústias e experiências nesse tempo único. Cada um sabe sua importância e participação em minha vida.

À Profa. Dra. Vera Lucia Mores Hall e Profa. Dra. Cristiane Pereira Gomes pelas considerações no Exame Geral de Qualificação.

À Profa. Dra. Denise Fecchio, pela gentileza, amizade e empréstimo de espaço físico, sempre que necessário.

Aos amigos e professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, que estiveram sempre prontos a auxiliar nas dúvidas técnicas e metodológicas. Em especial ao Laboratório de Virologia Humana e Animal, onde iniciei minha formação, e às pós-graduandas Taís Fukuda e Andreza Soriano Figueiredo, que sempre me auxiliaram quanto às técnicas de Biologia Molecular.

Às Secretárias do Programa de Pós-Graduação em Patologia, Tânia Andrade e, atualmente, Vânia Soler, e aos funcionários da Seção De Pós-Graduação, sempre solícitos e carinhosos conosco e com nossos papéis.

Aos professores do Departamento de Patologia, que muito contribuíram para minha formação acadêmica, em especial à Dra. Kunie Iabuki R. Coelho, pelas orientações na análise histológica das membranas corioamnióticas.

Aos funcionários do Departamento de Patologia, em especial ao Luciano Donini e José Carlos Pedroso de Lima, dispostos a auxiliar em qualquer momento, nas mais simples tarefas.

Às gestantes, que, mesmo num momento vulnerável, aceitaram a participar desse estudo.

À Capes, pela bolsa de estudos concedida, e à FAPESP, pelos auxílios financeiros (Processos 2008/55417-5 e 2009/52317-2).

Cada um de nós compõe a sua história,
cada ser em si, carrega o dom de ser capaz,
e ser feliz.

Renato Teixeira e Almir Sater

SUMÁRIO

Capítulo I

Revisão da Literatura.....	01
----------------------------	----

Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo e corioamnionite histológica: aspectos da resposta imune inata e de repercussões no período neonatal

Resumo.....	23
-------------	----

Abstract.....	25
---------------	----

Capítulo II

Artigo Científico I. “Expression of β defensins 1, 3 and 4 in chorioamniotic membranes of preterm pregnancies complicated by chorioamnionitis”	27
--	----

Capítulo III

Artigo Científico II. “Interleukin 18 messenger RNA and protein expression in chorioamniotic membranes from pregnant women with preterm premature rupture of membranes”	33
---	----

Capítulo IV

Artigo Científico III. “Repercussões no período neonatal de gestações complicadas por corioamnionite histológica”	49
---	----

Conclusões	66
-------------------------	----

Anexos	67
---------------------	----

Capítulo I

Revisão da Literatura

Revisão da Literatura

1. Introdução

O útero é um órgão do sistema reprodutivo feminino, composto de parede muscular espessa, epitélio de revestimento (endométrio) e colo do útero, por onde se comunica com o trato genital inferior. É um órgão oco, situado profundamente na cavidade pélvica, entre a bexiga e o reto. Sua parte superior comunica-se com as tubas uterinas, por onde os óvulos são transportados a partir dos ovários até o útero. Se ao chegar à cavidade uterina o óvulo estiver fecundado, ocorre a nidação na parede uterina, e esta então passa por mudanças no tamanho e estrutura para acomodar-se às necessidades do embrião em crescimento^{1, 2}. Assim, em torno da 12^a semana de gravidez, a placenta e seus anexos já se desenvolveram o suficiente, e delimitam, portanto, a cavidade amniótica^{1, 2}.

A visão tradicional é que a cavidade amniótica durante a gravidez normal seja estéril, e não contenha bactérias viáveis³ apesar da grande quantidade de microorganismos que colonizam o trato genital inferior (vagina e ectocérvice). O estado estéril da cavidade amniótica é, presumivelmente, realizado pela participação do sistema imune inato, incluindo a presença e composição do muco cervical⁴, componentes celulares e proteicos presentes nos tecidos gestacionais, como células inflamatórias, mediadores e antimicrobianos, e a própria estrutura física da cavidade amniótica. Nesse contexto, as membranas corioamnióticas, que constituem a “bolsa das águas” que abriga o feto, são tecidos de extrema importância para o desenvolvimento fetal ao proporcionarem a manutenção do volume do líquido amniótico (LA) e a proteção do feto e do cordão umbilical contra compressão e traumas. Além de atuarem também como barreira física

contra infecções vindas do trato genital inferior, as membranas corioamnióticas desempenham importante função secretora⁵.

2. Estrutura das membranas corioamnióticas

A placenta é um órgão materno-fetal constituído de uma porção fetal que se origina a partir do saco coriônico, de origem fetal, e uma porção materna de origem endometrial. O componente fetal da placenta corresponde ao cório viloso e o componente materno é formado pela decídua basal⁶. A decídua, que corresponde ao endométrio gravídico, possui três regiões distintas: decídua basal, a qual constitui a parte mais distante do feto; decídua capsular, que corresponde à porção superficial que cobre o feto; e decídua parietal, que representa o restante da placenta que delimita a cavidade uterina^{1, 6, 7}.

Durante o desenvolvimento embrionário, por volta da 17^a semana de gestação, com o aumento do tamanho do feto e conseqüente crescimento do saco coriônico, as vilosidades coriônicas sofrem compressão e são associadas à decídua parietal. A redução no suprimento sanguíneo das vilosidades coriônicas leva à rápida degeneração das mesmas, formando uma região relativamente avascular denominada de cório liso. Após a formação do cório liso, as vilosidades associadas à decídua basal aumentam em número e se ramificam, constituindo o cório viloso, também chamado de cório placentário ou frondoso¹.

O terceiro tecido placentário corresponde ao âmnio, que delimita a superfície interna do trofoblasto⁶. Morfológicamente, possui uma porção membranosa, que se acopla ao cório liso; uma porção placentária, que recobre o cório viloso e uma porção funicular, que circunda o cordão umbilical².

O crescimento do saco coriônico é acompanhado por crescimento ainda mais rápido do saco amniótico¹. Em decorrência desse crescimento, ocorre a fusão dessas duas membranas, originando as membranas corioamnióticas⁸. Tal estrutura se torna, então, composta por duas camadas adjacentes, o âmnio e o cório, que, por sua vez, são constituídos por diversos tipos celulares⁵. No epitélio amniótico, uma monocamada de células epiteliais colunares reveste a cavidade amniótica, e tais células apresentam conexões intercelulares especializadas em suas superfícies laterais e basais, para ligação com a membrana basal, a próxima camada do âmnio^{9, 10}. As células epiteliais amnióticas secretam colágenos tipos III e IV e glicoproteínas não colágenas que formam a membrana basal. Essas subcamadas são alicerçadas por uma camada compacta, formada por uma trama de colágeno, com densidades variadas¹¹, os quais são secretados por células mesenquimais e fibroblastos¹². As fibras intersticiais (colágenos tipos I e III) formam feixes paralelos que mantêm a integridade mecânica do âmnio, já os tipos V e VI formam filamentos conectivos entre o colágeno intersticial e a membrana basal epitelial¹³.

A camada intermediária entre o âmnio e o cório tem aspecto histológico esponjoso, pois é livre de figuras celulares e apresenta grande quantidade de glicoproteínas hidratadas, além de conter uma malha não fibrilar de colágeno tipo IV¹³. Esta camada absorve estresse físico, pois permite que o âmnio deslize sobre o cório, o qual é firmemente aderido à decídua⁵. O cório é mais externo, liga-se ao âmnio pela matriz extracelular (MEC) - camada intermediária, e apresenta sua primeira porção composta por células reticulares e tecido conectivo coriônico, o qual é constituído por escassas fibras colágenas apoiadas em uma membrana basal¹⁰. Sua camada celular assemelha-se a uma típica membrana epitelial, com o citotrofoblasto polarizado em direção à decídua. A camada

citotrofoblástica é multicelular, podendo assim, variar em espessura⁹, e o contato direto entre as células parece ser mais evidente que no âmnio¹⁰.

A camada decidual é associada externamente ao corioâmnio, deriva da decídua parietal e localiza-se internamente à parede uterina. Embora apresente pouca função mecânica, desempenha importante papel hormonal e imunológico¹⁴. Essa conformação final das membranas fetais, com o âmnio internamente fundido ao cório, que por sua vez, se alicerça na decídua, ocorre após três fases distintas de desenvolvimento e dois processos de fusão, os quais se acreditam acontecer por volta da 20ª semana de gestação⁹.

As fibras colágenas que compõem a MEC sofrem constante remodelação ao longo da gestação para acomodar o volume e tensão crescentes, uma vez que a manutenção da integridade estrutural das membranas fetais é essencial para o sucesso gestacional. Durante as últimas oito semanas de gestação, este processo de remodelação resulta em diminuição do teor de colágeno no âmnio⁵, alteração que favorece o fenômeno biológico subsequente, a rotura das membranas no momento do parto. Em mais de 90% das gestações, a rotura das membranas fetais segue o início do trabalho de parto¹⁵, e o aumento da separação espontânea, associado à diminuição da adesão das camadas amniótica e coriodescidual, contribuem para o enfraquecimento das mesmas durante o processo de trabalho de parto¹⁶.

3. Mecanismos envolvidos no enfraquecimento das membranas corioamnióticas na

Rotura Prematura de Membranas

Propõe-se que o enfraquecimento estrutural das membranas fetais ao final da gestação decorra, inicialmente, de mudanças no tipo de colágeno da MEC (revisado por

McParland & Bell⁹), processo que se deve não somente a processos físicos, como força mecânica advinda das contrações uterinas e separação das camadas celulares, mas também de processos bioquímicos caracterizados pela transcrição e ativação de proteínas que promovem apoptose e remodelamento da matriz extracelular¹⁷⁻¹⁹. Já foi sugerido na literatura que exista uma zona de enfraquecimento nas membranas fetais (ZAM – *zone of altered morphology*), a qual apresenta morfologia alterada, ou seja, características histológicas próprias em relação ao restante das membranas, e é neste local que ocorre a rotura^{20, 21}. Trabalhos recentes sustentam essa hipótese, uma vez que o remodelamento de colágeno na ZAM foi correlacionado com o enfraquecimento físico das membranas fetais¹⁷. Além disso, Reti et al.²² demonstraram que a ZAM apresenta super regulação de proteínas pró-apoptóticas, e, concomitante, subexpressão de proteínas anti-apoptóticas. Moore et al.¹⁸ integraram estudos bioquímicos e histológicos com conceitos de engenharia e observaram que, na maioria dos casos estudados, a sequência da rotura das membranas corioamnióticas se apresenta como a) distensão das membranas intactas, b) separação do âmnio da coriodecídua, c) rotura da coriodecídua, d) distensão não elástica do âmnio e e) rotura subsequente do âmnio. Tal sequência de eventos normalmente acontece sincronizado ao trabalho de parto, no entanto, a ativação precoce da perda arquitetônica e força mecânica das membranas, ou seja, em momento anterior ao início do trabalho de parto, caracterizam a rotura prematura de membranas (RPM)²³. Alterações na cascata bioquímica de controle de remodelação tecidual e apoptose, acompanhados da ação da força física uterina, têm sido considerados os principais mecanismos envolvidos no enfraquecimento e rotura das membranas fetais¹⁷. É conhecido que casos de RPM apresentam redução na síntese de colágeno e elevada atividade colagenolítica nas

membranas quando comparadas a casos de rotura no momento do trabalho de parto, salientando que a RPM está associada à degradação da matriz extracelular²⁴.

O entendimento dos mecanismos envolvidos na RPM é de fundamental importância uma vez que tal processo pode ocorrer ao longo da gestação, em idades gestacionais inferiores a 37 semanas, quando passa a ser denominada de rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT)²³. Essa intercorrência obstétrica, que acomete de 25 a 40% das gestações pré-termo⁵, representa a maior causa de trabalho de parto e parto pré-termo e também de morbimortalidade perinatal^{23, 25}, especialmente por aumentar a compressão do cordão umbilical e o potencial para infecção perinatal²⁶. Muitos fatores clínicos e associações são comumente atribuídos à RPM-PT e parto pré-termo, o que faz aumentar as questões sobre os potenciais mecanismos que conduzem a essas complicações gestacionais.

3.1. Metaloproteinases e Apoptose

Os componentes moleculares da MEC são altamente resistentes à ação das proteases extracelulares e a degradação fisiológica exige participação de um grupo específico de proteases, as metaloproteinases (MMPs), que são enzimas endógenas zinco dependentes e possuem a capacidade de degradar componentes da MEC através da hidrólise dos mesmos^{27, 28}. Assim, as MMPs apresentam importante papel no processo de remodelamento e acomodação das membranas fetais com o avanço da gestação²⁹.

Dentre as MMPs com possível envolvimento em complicações gestacionais, destacam-se as MMP-2 e MMP-9, (gelatinases A e B respectivamente), além das MMP-8 e MMP-13 (colagenases 2 e 3, respectivamente), pois são enzimas capazes de degradar a elastina, fibronectina e o colágeno tipo IV²⁸, um dos principais componentes das

membranas corioamnióticas¹³. Muitos estudos têm demonstrado que a MMP-2 é constitutivamente expressa pelo âmnio³⁰⁻³² e decídua³³, independente da presença do trabalho de parto. Por outro lado, estudos recentes encontraram forte imunoexpressão da forma ativa da MMP-2 no epitélio amniótico³⁴ e aumento da sua concentração nesse tecido durante o trabalho de parto³⁵, e foi sugerido pelos autores que essa enzima possa ter papel nos mecanismos envolvidos no desencadeamento do parto. A MMP-9 tem sua expressão e atividade pronunciadas ao final da gravidez pelos tecidos gestacionais^{21, 30, 31, 36}, com pronunciado aumento durante o trabalho de parto³², fazendo com que essa enzima possa ser um marcador para a iniciação desse processo³¹. Embora a MMP-13 tenha afinidade pelos colágenos I, III e VI das membranas corioamnióticas³⁷, sua expressão diminuiu no tecido decidual com o avanço da idade gestacional³³, e seu papel nos mecanismos do parto ainda permanece obscuro. Já a MMP-8, juntamente com a MMP-2, foi a enzima mais abundante encontrada nos tecidos corioamnióticos³⁸ e sua presença na secreção cervical³⁹ e no tampão cervical de gestante de termo⁴⁰ sugerem sua participação na dilatação cervical e rotura das membranas durante o trabalho de parto.

Evidências da degradação de colágeno por ação das MMPs nas membranas corioamnióticas estão nas observações de que níveis dessas enzimas estão aumentados no líquido amniótico de gestantes com RPM, tanto a termo como pré-termo, sugerindo o papel-chave dessa enzima nos mecanismos de rotura *per se* ^{36, 41-44}.

A ausência do equilíbrio entre a produção de enzimas ativas e seus inibidores pode resultar em doenças associadas com a remodelação descontrolada da MEC, inflamação, crescimento e migração celular. Os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) são inibidores endógenos dessas enzimas e, assim, controlam a quantidade e atividade de MMP ativa⁴⁵. Os TIMPs são produzidos por células secretoras de metaloproteinases⁴⁶ e

compreendem uma família de quatro membros estruturalmente relacionados, TIMP-1, -2, -3 e -4, que inibem MMPs, mas com afinidades que variam entre os diferentes pares MMP/TIMP. Entre os quatro TIMPs, o TIMP-3 tem o mais amplo espectro de inibição, enquanto que TIMP-1 forma preferencialmente complexo com a MMP-9, e o TIMP-2 atua sobre a MMP-2. O TIMP-4 pode formar complexo com a proMMP-2, porém não atua sobre a ativação dessa metaloproteinase (revisado por Brew & Nagase⁴⁵). O principal papel dos TIMPs na remodelação tecidual é o equilíbrio entre eles e as MMPs, com a formação de complexos na razão de 1:1, inibindo a atividade proteolítica das últimas²⁸. Durante o parto e/ou RPM, os níveis de TIMPs estão diminuídos no LA^{42, 44, 47}, âmnio e cório⁴⁸, o que favorece a atividade das MMPs e conseqüentemente permite a desagregação dos componentes da MEC, facilitando a rotura das membranas fetais. Dessa forma, a RPM-PT tem sido associada principalmente com o desbalanço em favor da expressão e ativação de MMPs em relação a seus reguladores⁴².

Considerando as suas capacidades destrutivas, o nível de transcrição das MMPs é estreitamente regulado por fatores de crescimento, hormônios, interação celular ou citocinas (revisado por Yan & Boyd⁴⁹). As citocinas, pequenos peptídeos catiônicos atuantes no sistema imune, possuem potencial de modular a expressão de MMPs nas membranas fetais (Tabela 1) (revisado por Vadillo-Ortega & Estrada-Gutierrez³⁷), e trabalhos recentes consolidam tais observações^{50, 51}.

Tabela 1. Resumo da modulação de metaloproteinases nas membranas fetais por citocinas inflamatórias (Vadillo-Ortega & Estrada-Gutiérrez, 2005³⁷).

Citocina	Célula-alvo	Ação resultante
IL-1 β	Células epiteliais amnióticas	Aumento na expressão e atividade de MMP-9
	Trofoblastos	Secreção de MMP-9
TNF- α	Células coriônicas	Expressão de MMP-9
	Trofoblastos	Aumento de atividade de MMP-9 e diminuição de atividade de MMP-2
IL-6	Células amnióticas	Aumento da secreção e atividade de MMP-9
	Trofoblastos	Aumento da atividade de MMP-9 e MMP-2

Menon & Fortunato⁵² hipotetizaram que a RPM-PT é uma alteração endógena, na qual a resposta inflamatória e seus mediadores ativam MMPs, conduzindo ao enfraquecimento e predisposição à rotura. Dessa forma, o aumento da expressão de MMPs associado à RPM pode ainda estar ligado ao processo de apoptose, uma vez que a ativação de ambos os mecanismos pode ser desencadeado por citocinas^{17, 50} e prostaglandinas^{53, 54}. Nesse sentido, a participação interligada dos mecanismos de ativação de MMPs e apoptose nos casos de RPM e RPM-PT se evidencia, pois tais membranas apresentam elevados níveis de genes e proteínas pró-apoptóticos, quando comparado com membranas intactas^{55, 56}. Assim, o efeito sinérgico de ativação de MMPs e mudanças apoptóticas que conduzem à rotura das membranas tem sido proposto por diversos grupos de pesquisa⁵⁷⁻⁶⁰.

Dependendo do estímulo, a apoptose nas membranas fetais pode ser iniciada por duas vias intrínsecas principais, a via TNF receptor/Fas e a via do gene p53⁵², ou ainda em

resposta a estímulos exógenos como as citocinas pró-inflamatórias⁶¹. Uma vez que os níveis desses mediadores estão aumentados nos casos de RPM-PT⁶², torna-se evidente sua interligação com o desencadeamento do processo de apoptose nas membranas fetais. É sugerido que a interleucina (IL)-1 β participe do processo de apoptose nas membranas fetais^{50, 63} através da indução da atividade de caspases, principais mediadores das vias apoptóticas. Estudos *in vitro* consolidam essas observações⁶³. A participação do Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) no processo de apoptose também já está bem estabelecida, e envolve diversas vias de ativação⁶⁴. A ação dessas duas citocinas no processo de remodelamento do colágeno e apoptose é alicerçada nas observações de que elas provocam aumento da atividade de MMPs e decréscimo na ação de TIMPs em membranas fetais^{50, 51, 65}. Devido a IL-18 estimular a apoptose via Fas ligante em células *natural killer* e células T *helper* 1⁶⁶, foi sugerido que o mesmo acontecesse nas membranas fetais, porém tal mecanismo foi encontrado ser incompleto nesses tecidos⁶⁷.

4. RPM-PT, corioamnionite e invasão microbiana da cavidade amniótica

A etiologia da RPM-PT é multifatorial, já que muitos fatores de risco podem estar envolvidos e atuando conjuntamente até a instalação deste processo⁶⁸. Fatores como raça, tabagismo, doenças sexualmente transmissíveis⁶⁹⁻⁷¹, deficiência materna de vitamina C⁷², complicações obstétricas anteriores^{15, 70, 73} e vaginose bacteriana⁷⁴ já foram associados à ocorrência de RPM-PT. No entanto, a infecção da cavidade amniótica parece ser o evento chave na sua patogênese^{52, 75}.

O possível mecanismo de infecção da cavidade amniótica, já bem consolidado na literatura, considera que a ascensão de micro-organismos do trato genital inferior para a

cavidade amniótica pode incitar infecção e inflamação da placenta e das membranas corioamnióticas⁷⁶. Outra hipótese é que muitos micro-organismos comumente presentes na microbiota vaginal também secretem proteases que podem desencadear resposta inflamatória na interface materno-fetal⁷⁷. De uma forma ou de outra, micro-organismos têm sido associados ao desencadeamento de uma mudança na cascata inflamatória, que pode levar ao enfraquecimento e degradação das membranas corioamnióticas precocemente, especialmente através de processos como alteração na estrutura das junções celulares⁷⁸, aumento dos índices apoptóticos, modulação de MMPs nas membranas fetais e produção de prostaglandinas na interface materno-fetal³⁷. Estudos recentes indicam que o parto espontâneo a termo é caracterizado por um perfil inflamatório na decídua, membranas corioamnióticas e na cérvix uterina⁷⁹, porém, na vigência de infecção intra-amniótica durante a gestação, ocorrem subseqüentes recrutamento e ativação de leucócitos para as membranas fetais⁸⁰, resultando em amplificação da resposta inflamatória e corioamnionite histológica, considerada importante indicador de infecção da cavidade amniótica⁸¹.

O papel da inflamação aguda com liberação de enzimas proteolíticas e citocinas ativadoras certamente deve ser considerada no subgrupo de recém-nascidos prematuros com RPM-PT e corioamnionite, uma vez que sepse, pneumonia, estresse respiratório e óbito neonatal estão entre as complicações decorrentes de infecção e/ou inflamação intra-amniótica⁸². A corioamnionite histológica, definida pela infiltração das membranas fetais por leucócitos polimorfonucleares, ocorre na maioria dos casos, na ausência de sinais clínicos e sintomas de infecção, e este diagnóstico pode ser feito em mais de 20% das gestações de termo e em mais de 50% dos partos pré-termo⁸³⁻⁸⁵. Casos de RPM-PT

apresentam maior incidência de corioamnionite em relação à ausência dessa complicação obstétrica⁸⁶, ou em relação a gestações de termo⁸⁷.

Na presença de infecção da cavidade amniótica as células inflamatórias que infiltram os tecidos maternos aumentam a produção das citocinas⁸⁸, e essa observação foi evidenciada no aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias no líquido amniótico quando comparado com ausência de processo inflamatório⁸⁹. A IL-8 é uma citocina que induz quimiotaxia neutrofílica e níveis elevados de IL-8 são detectados no líquido amniótico e cordão umbilical durante infecções por micro-organismos presentes nos tecidos materno-fetais^{89, 90}, assim como no muco cervical de pacientes com RPM-PT⁹¹.

As análises do líquido amniótico⁹² e do cordão umbilical⁹³ revelaram que, em casos de RPM e parto prematuro, o aumento da concentração de IL-6 foi maior que em casos de parto prematuro e bolsa íntegra, demonstrando que a RPM está associada com aumento de IL-6. Na presença de corioamnionite, os níveis dessa citocina no cordão umbilical estão aumentados⁹⁴, podendo ser considerado preditor de sepse neonatal em casos de RPM-PT⁹⁵.

Nas mulheres com RPM-PT, na ausência de infecção detectada, maiores níveis de IL-18 foram detectados no LA em comparação a mulheres com parto pré-termo ou termo⁶⁷. Segundo Pacora et al.⁹⁶, gestantes com trabalho de parto pré-termo e invasão da cavidade amniótica apresentam níveis elevados de IL-18, mas tal relação não foi encontrada nos casos de RPM-PT^{96, 97}. Assim, a participação dessa citocina no processo de RPM-PT ainda é inconclusiva.

Ainda como primeira linha de defesa durante a gestação, a IL-1 β pode regular outros mediadores inflamatórios com conseqüente promoção de infiltração de macrófagos no tecido decidual⁹⁸. Nesse sentido, Lockwood et al.⁹⁹ evidenciaram que, durante a

corioamnionite, a infiltração neutrofílica nas células decíduais deriva, pelo menos em parte, da indução de IL-1 β e TNF- α sobre a produção de IL-8 nesse tecido. Salientando o papel do TNF- α como participante da defesa do hospedeiro, a estimulação de membranas fetais com LPS induz aumento de TNF- α nesse tecido¹⁰⁰, e tecidos gestacionais complicados por corioamnionite apresentam aumento da expressão da enzima conversora de TNF- α ⁹⁸.

Nesse contexto, a participação dos mediadores inflamatórios nos mecanismos de RPM-PT pode ser melhor compreendida pela elucidação da interação entre os mesmos. Assim, os trabalhos *in vitro* que mimetizam a infecção intra-amniótica revelam que os tecidos gestacionais, especialmente o epitélio amniótico e as células coriônicas e decíduais, respondem ao estímulo bacteriano com o aumento da produção de citocinas^{81, 101-103}, e de MMPs^{31, 43, 104}. Esses dados salientam que a presença de micro-organismos na cavidade amniótica pode alterar a produção de uma variedade de mediadores importantes na defesa materno-fetal e na integridade física e funcional dos tecidos gestacionais¹⁰⁵. Holmlund et al.¹⁰⁶ descreveram que células trofoblásticas de placenta de termo estimuladas com zimozam ou lipopolissacáride (LPS) produzem IL-6 e IL-8, e isso foi sugerido através da ligação de receptores *Toll-like* (TLR)-2 e TLR-4, respectivamente.

Fortunato et al.¹⁰⁷ relataram produção de RNA mensageiro (RNAm) de MMP-9 nas membranas fetais em resposta à toxinas bacterianas. Nos casos de RPM, na presença de infecção na cavidade amniótica, a concentração da forma ativa da MMP-9 encontra-se aumentada em relação aos casos de trabalho de parto pré-termo (TPP) e bolsa íntegra³⁶, sendo considerada marcador sensível para infecção intra-amniótica¹⁰⁸. Esses dados sugerem o papel das MMPs nos mecanismos responsáveis pela rotura das membranas corioamnióticas na presença de infecção⁵⁸.

Outros componentes da resposta imune inata também participam como mediadores durante a infecção da cavidade amniótica. Células amnióticas e coriônicas, obtidas de gestação de termo, foram descritas como tendo efeito inibitório sobre o crescimento de muitas bactérias e isto foi sugerido, em parte, pela produção de antimicrobianos naturais (AN) endógenos por esse tecido¹⁰⁹.

Estudos recentes mostraram que vários AN são superestimulados por citocinas inflamatórias em tecidos gestacionais¹¹⁰⁻¹¹², e, nesse sentido, outros trabalhos encontraram relação positiva entre a presença de defensinas neutrofílicas no líquido amniótico e no plasma materno de gestação pré-termo, na presença de infecção intra-amniótica^{113, 114}. Soto et al.¹¹⁵ descreveram aumento de *human beta defensin* (HBD)-2 no líquido amniótico na presença de infecção e/ou inflamação na cavidade amniótica em pacientes em trabalho de parto pré-termo e rotura prematura de membranas pré-termo, demonstrando que essa defensina é constituinte do líquido amniótico e participa da resposta antimicrobiana. Sob estímulos inflamatórios, a HBD-3 foi a β -defensina mais abundante e mais expressa em células de epitélio amniótico¹¹⁶. Nesse contexto, Szukiewicz et al.¹¹⁷ descreveram que na presença de rotura prematura de membranas pré-termo e corioamnionite, as células amnióticas estimuladas com LPS apresentam significativo aumento de expressão de HBD-3 em relação à gestação de termo. A fonte de HBDs no líquido amniótico ainda é incerta, porém sugere-se que as membranas corioamnióticas contribuam como fonte de ANs, uma vez que a expressão de RNAm de HBDs já foi relatada pelas células coriônicas e do epitélio amniótico^{116, 118}.

De acordo com o exposto, os estímulos bacterianos ou inflamatórios podem desencadear liberação de citocinas nas membranas corioamnióticas, o que deflagra alteração na cascata inflamatória precocemente na interface materno-fetal, com

consequente enfraquecimento e remodelação tecidual, culminando na RPM-PT. Assim, é possível determinar que as citocinas, assim como outros mediadores do sistema imune inato, sejam considerados preditores bioquímicos do parto pré-termo e RPM-PT. Portanto, os estudos de expressão gênica e protéica de mediadores envolvidos na resposta inflamatória nas membranas corioamnióticas podem contribuir para o entendimento do conjunto de interações que ocorrem na cavidade amniótica e que deflagram a RPM-PT.

5. Referências Bibliográficas

- 1 Moore KL, Persaud, TVN. Embriologia clínica. volume 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- 2 Rezende J. Obstetrícia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- 3 Romero R, Gotsch F, Pineles B, Kusanovic JP. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. *Nutr Rev* 2007; 65: S194-202.
- 4 Hein M, Valore EV, Helmig RB, Ulbjerg N, Ganz T. Antimicrobial factors in the cervical mucus plug. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 137-44.
- 5 Parry S, Strauss JF, 3rd. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998; 338: 663-70.
- 6 Benirschke K, Pekarske SL. Placental pathology casebook. Extensive calcification of the umbilical cord and placenta. *J Perinatol* 1995; 15: 81-3.
- 7 Kierszenbaum AL. Histologia e Biologia celular: uma introdução à patologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- 8 Chua WK, Oyen ML. Do we know the strength of the chorioamnion? A critical review and analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 144 Suppl 1: S128-33.
- 9 McParland PC, Bell SC. The fetal membranes and mechanisms underlying their labour-associated and pre-labour rupture during pregnancy. *Fetal and Maternal Medicine Review* 2004; 15: 73-108.
- 10 Sánchez RV, Castrejón MC, Orozco YH, López NG, Montoya JB, Vadillo-Ortega F. Análisis tridimensional de la estructura de las membranas corioamnióticas humanas al término de la gestación. *Ginecol Obstet Mex* 2008; 76: 38-44.
- 11 Oyen ML, Cook RF, Stylianopoulos T, Barocas VH, Calvin SE, Landers DV. Uniaxial and biaxial mechanical behavior of human amnion. *Journal of Materials Research* 2005; 20: 2902-2909.
- 12 Casey ML, MacDonald PC. Interstitial collagen synthesis and processing in human amnion: a property of the mesenchymal cells. *Biol Reprod* 1996; 55: 1253-60.
- 13 Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, Dalglish R, Bright N, Macvicar J. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta* 1993; 14: 385-406.

- 14 Calvin SE, Oyen ML. Microstructure and mechanics of the chorioamnion membrane with an emphasis on fracture properties. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1101: 166-85.
- 15 Lee T, Silver H. Etiology and epidemiology of preterm premature rupture of the membranes. *Clin Perinatol* 2001; 28: 721-34.
- 16 Strohl A, Kumar D, Novince R, Shaniuk P, Smith J, Bryant K, et al. Decreased adherence and spontaneous separation of fetal membrane layers--amnion and chorion--a possible part of the normal weakening process. *Placenta* 2010; 31: 18-24.
- 17 El Khwad M, Stetzer B, Moore RM, Kumar D, Mercer B, Arikat S, et al. Term human fetal membranes have a weak zone overlying the lower uterine pole and cervix before onset of labor. *Biol Reprod* 2005; 72: 720-6.
- 18 Moore RM, Mansour JM, Redline RW, Mercer BM, Moore JJ. The physiology of fetal membrane rupture: insight gained from the determination of physical properties. *Placenta* 2006; 27: 1037-51.
- 19 Pandey V, Jaremko K, Moore RM, Mercer BM, Stetzer B, Kumar D, et al. The force required to rupture fetal membranes paradoxically increases with acute in vitro repeated stretching. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196: 165 e1-7.
- 20 Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101: 375-86.
- 21 McLaren J, Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: identification of an area of altered morphology overlying the cervix. *Hum Reprod* 1999; 14: 237-41.
- 22 Reti NG, Lappas M, Riley C, Wlodek ME, Permezel M, Walker S, et al. Why do membranes rupture at term? Evidence of increased cellular apoptosis in the supracervical fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196: 484 e1-10.
- 23 Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 178-93.
- 24 Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Karchmer S, Cruz NM, Ayala-Ruiz A, Lama MS. Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes. *Obstet Gynecol* 1990; 75: 84-8.
- 25 Noor S, Nazar AF, Bashir R, Sultana R. Prevalance of PPRM and its outcome. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2007; 19: 14-7.
- 26 ACOG Practice Bulletin No. 80: premature rupture of membranes. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. *Obstet Gynecol* 2007; 109: 1007-19.
- 27 Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 290-308.
- 28 Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-39.
- 29 Bryant-Greenwood GD, Yamamoto SY. Control of peripartal collagenolysis in the human chorion-decidua. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 63-70.
- 30 Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Furth EE, Lei H, Muschel RJ, Stetler-Stevenson WG, et al. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 1995; 146: 148-56.
- 31 Vadillo-Ortega F, Sadowsky DW, Haluska GJ, Hernandez-Guerrero C, Guevara-Silva R, Gravett MG, et al. Identification of matrix metalloproteinase-9 in amniotic fluid and

- amniochorion in spontaneous labor and after experimental intrauterine infection or interleukin-1 beta infusion in pregnant rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 128-38.
- 32 Xu P, Alfaidy N, Challis JR. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1353-61.
- 33 Anacker J, Segerer SE, Hagemann C, Feix S, Kapp M, Bausch R, et al. Human decidua and invasive trophoblasts are rich sources of nearly all human matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod* 2011; doi: 10.1093/molehr/gar033.
- 34 Demir-Weusten AY, Seval Y, Kaufmann P, Demir R, Yucel G, Huppertz B. Matrix metalloproteinases-2, -3 and -9 in human term placenta. *Acta Histochem* 2007; 109: 403-12
- 35 Yonemoto H, Young CB, Ross JT, Guilbert LL, Fairclough RJ, Olson DM. Changes in matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the fetal amnion and chorion during gestation and at term and preterm labor. *Placenta* 2006; 27: 669-77.
- 36 Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Gomez R, Edwin SS, et al. Evidence of in vivo differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 887-94.
- 37 Vadillo-Ortega F, Estrada-Gutierrez G. Role of matrix metalloproteinases in preterm labour. *BJOG* 2005; 112 Suppl 1: 19-22.
- 38 Gomez Lopez N, Estrada Gutierrez G, Beltran Montoya J, Espejel Nunez A, Vadillo Ortega F. Extracellular matrix metalloproteases profile identification in chorioamniotic membranes of term and preterm pregnancies through soluble microarrays. *Ginecol Obstet Mex* 2008; 76: 32-7.
- 39 Rahkonen L, Rutanen EM, Nuutila M, Sainio S, Sorsa T, Paavonen J. Matrix metalloproteinase-8 in cervical fluid in early and mid pregnancy: relation to spontaneous preterm delivery. *Prenat Diagn* 2010; 30: 1079-85.
- 40 Becher N, Hein M, Uldbjerg N, Danielsen CC. Balance between matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in the cervical mucus plug estimated by determination of free non-complexed TIMP. *Reprod Biol Endocrinol* 2008; 6: 45.
- 41 Athayde N, Edwin SS, Romero R, Gomez R, Maymon E, Pacora P, et al. A role for matrix metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1248-53.
- 42 Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. MMP/TIMP imbalance in amniotic fluid during PROM: an indirect support for endogenous pathway to membrane rupture. *J Perinat Med* 1999; 27: 362-8.
- 43 Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Amniochorion gelatinase-gelatinase inhibitor imbalance in vitro: a possible infectious pathway to rupture. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 240-4.
- 44 Vadillo-Ortega F, Hernandez A, Gonzalez-Avila G, Bermejo L, Iwata K, Strauss JF. Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 1371-6.
- 45 Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803: 55-71.

- 46 Ruck P, Marzusch K, Horny HP, Dietl J, Kaiserling E. The distribution of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in the human placenta. *Placenta* 1996; 17: 263-6.
- 47 Riley SC, Leask R, Denison FC, Wisely K, Calder AA, Howe DC. Secretion of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by human fetal membranes, decidua and placenta at parturition. *J Endocrinol* 1999; 162: 351-9.
- 48 Nishihara S, Someya A, Yonemoto H, Ota A, Itoh S, Nagaoka I, et al. Evaluation of the expression and enzyme activity of matrix metalloproteinase-7 in fetal membranes during premature rupture of membranes at term in humans. *Reprod Sci* 2008; 15: 156-65.
- 49 Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol* 2007; 211: 19-26.
- 50 Kumar D, Fung W, Moore RM, Pandey V, Fox J, Stetzer B, et al. Proinflammatory cytokines found in amniotic fluid induce collagen remodeling, apoptosis, and biophysical weakening of cultured human fetal membranes. *Biol Reprod* 2006; 74: 29-34.
- 51 Oner C, Schatz F, Kizilay G, Murk W, Buchwalder LF, Kayisli UA, et al. Progesterin-inflammatory cytokine interactions affect matrix metalloproteinase-1 and -3 expression in term decidual cells: implications for treatment of chorioamnionitis-induced preterm delivery. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 252-9.
- 52 Menon R, Fortunato SJ. Fetal membrane inflammatory cytokines: a switching mechanism between the preterm premature rupture of the membranes and preterm labor pathways. *J Perinat Med* 2004; 32: 391-9.
- 53 Ulug U, Goldman S, Ben-Shlomo I, Shalev E. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 and their inhibitor, TIMP-1, in human term decidua and fetal membranes: the effect of prostaglandin F(2alpha) and indomethacin. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 1187-93.
- 54 Yoshida M, Sagawa N, Itoh H, Yura S, Takemura M, Wada Y, et al. Prostaglandin F(2alpha), cytokines and cyclic mechanical stretch augment matrix metalloproteinase-1 secretion from cultured human uterine cervical fibroblast cells. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 681-7.
- 55 Sagol S, Sagol O, Ozkal S, Asena U. Role of apoptosis, bcl-2 and bax protein expression in premature rupture of fetal membranes. *J Reprod Med* 2002; 47: 809-15.
- 56 Tanir HM, Sener T, Artan S, Kaytaz B, Sahin-Mutlu F, Ozen ME. Programmed cell death (apoptosis) in placentas from normal pregnancy and pregnancy complicated by term (t) and preterm (p) premature rupture of membranes (PROM). *Arch Gynecol Obstet* 2005; 273: 98-103.
- 57 Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta* 2002; 23: 257-73.
- 58 Fortunato SJ, Menon R. Distinct molecular events suggest different pathways for preterm labor and premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 1399-405; discussion 1405-6.
- 59 Lei H, Furth EE, Kalluri R, Chiou T, Tilly KI, Tilly JL, et al. A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor. *J Clin Invest* 1996; 98: 1971-8.
- 60 McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased concentration of pro-matrix metalloproteinase 9 in term fetal membranes overlying the cervix before labor: implications for membrane remodeling and rupture. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 409-16.

- 61 Menon R, Fortunato SJ. Infection and the role of inflammation in preterm premature rupture of the membranes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; 21: 467-78.
- 62 Gomez-Lopez N, Laresgoiti-Servitje E, Olson DM, Estrada-Gutierrez G, Vadillo-Ortega F. The role of chemokines in term and premature rupture of the fetal membranes: a review. *Biol Reprod*; 82: 809-14.
- 63 Fortunato SJ, Menon R. IL-1 beta is a better inducer of apoptosis in human fetal membranes than IL-6. *Placenta* 2003; 24: 922-8.
- 64 Haider S, Knofler M. Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta* 2009; 30: 111-23.
- 65 Kumar D, Schatz F, Moore RM, Mercer BM, Rangaswamy N, Mansour JM, et al. The effects of thrombin and cytokines upon the biomechanics and remodeling of isolated amnion membrane, in vitro. *Placenta* 2011; 32: 206-13.
- 66 Dao T, Ohashi K, Kayano T, Kurimoto M, Okamura H. Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. *Cell Immunol* 1996; 173: 230-5.
- 67 Menon R, Lombardi SJ, Fortunato SJ. IL-18, a product of chorionic decidua, increases during premature rupture of membranes but fails to turn on the Fas-FasL-mediated apoptosis pathway. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 276-84.
- 68 Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. *Bjog* 2006; 113 Suppl 3: 17-42.
- 69 Shen TT, DeFranco EA, Stamilio DM, Chang JJ, Muglia LJ. A population-based study of race-specific risk for preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199: 373 e1-7.
- 70 Silverman RK, Wojtowycz M. Risk factors in premature rupture of membranes. *Prim Care Update Ob Gyns* 1998; 5: 181.
- 71 Simhan HN, Caritis SN, Krohn MA, Hillier SL. The vaginal inflammatory milieu and the risk of early premature preterm rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 213-8.
- 72 Casanueva E, Ripoll C, Meza-Camacho C, Coutino B, Ramirez-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: 241-7.
- 73 Yang J, Hartmann KE, Savitz DA, Herring AH, Dole N, Olshan AF, et al. Vaginal bleeding during pregnancy and preterm birth. *Am J Epidemiol* 2004; 160: 118-25.
- 74 Camargo RP, Simoes JA, Cecatti JG, Alves VM, Faro S. Impact of treatment for bacterial vaginosis on prematurity among Brazilian pregnant women: a retrospective cohort study. *Sao Paulo Med J* 2005; 123: 108-12.
- 75 Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002; 8: 3-13.
- 76 Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006; 11: 317-26.
- 77 McGregor JA, French JL, Lawellin D, Franco-Buff A, Smith C, Todd JK. Bacterial protease-induced reduction of chorioamniotic membrane strength and elasticity. *Obstet Gynecol* 1987; 69: 167-74.
- 78 Kobayashi K, Miwa H, Yasui M. Inflammatory mediators weaken the amniotic membrane barrier through disruption of tight junctions. *J Physiol* 2010; 588: 4859-69.

- 79 Haddad R, Gould BR, Romero R, Tromp G, Farookhi R, Edwin SS, et al. Uterine transcriptomes of bacteria-induced and ovariectomy-induced preterm labor in mice are characterized by differential expression of arachidonate metabolism genes. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 822-8.
- 80 Andrews WW, Goldenberg RL, Faye-Petersen O, Cliver S, Goepfert AR, Hauth JC. The Alabama Preterm Birth study: polymorphonuclear and mononuclear cell placental infiltrations, other markers of inflammation, and outcomes in 23- to 32-week preterm newborn infants. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 803-8.
- 81 Menon R, Peltier MR, Eckardt J, Fortunato SJ. Diversity in cytokine response to bacteria associated with preterm birth by fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201: 306 e1-6
- 82 Fahey JO. Clinical management of intra-amniotic infection and chorioamnionitis: a review of the literature. *J Midwifery Womens Health* 2008; 53: 227-35.
- 83 Edwards RK. Chorioamnionitis and labor. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2005; 32: 287-96.
- 84 Polettini J, Peracoli JC, Candeias JM, Araujo Junior JP, Silva MG. Inflammatory cytokine mRNA detection by real time PCR in chorioamniotic membranes from pregnant women with preterm premature rupture of membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 144: 27-31.
- 85 Silva MG, Peracoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Peracoli MT. Cervical Lactobacillus and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynaecol Obstet* 2003; 81: 175-82.
- 86 Furman B, Shoham-Vardi I, Bashiri A, Erez O, Mazor M. Clinical significance and outcome of preterm prelabor rupture of membranes: population-based study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 92: 209-16.
- 87 Kim CJ, Romero R, Kusanovic JP, Yoo W, Dong Z, Topping V, et al. The frequency, clinical significance, and pathological features of chronic chorioamnionitis: a lesion associated with spontaneous preterm birth. *Mod Pathol* 2010; 23: 1000-11.
- 88 Osman I, Young A, Jordan F, Greer IA, Norman JE. Leukocyte density and proinflammatory mediator expression in regional human fetal membranes and decidua before and during labor at term. *J Soc Gynecol Investig* 2006; 13: 97-103.
- 89 Holst RM, Laurini R, Jacobsson B, Samuelsson E, Savman K, Doverhag C, et al. Expression of cytokines and chemokines in cervical and amniotic fluid: relationship to histological chorioamnionitis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007; 20: 885-93.
- 90 Witt A, Berger A, Gruber CJ, Petricevic L, Apfalter P, Worda C, et al. Increased intrauterine frequency of *Ureaplasma urealyticum* in women with preterm labor and preterm premature rupture of the membranes and subsequent cesarean delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 1663-9.
- 91 Sakai M, Sasaki Y, Yoneda S, Kasahara T, Arai T, Okada M, et al. Elevated interleukin-8 in cervical mucus as an indicator for treatment to prevent premature birth and preterm, pre-labor rupture of membranes: a prospective study. *Am J Reprod Immunol* 2004; 51: 220-5.
- 92 Shobokshi A, Shaarawy M. Maternal serum and amniotic fluid cytokines in patients with preterm premature rupture of membranes with and without intrauterine infection. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 79: 209-15.
- 93 Gharehbaghi MM, Peirovifar A, Gharehbaghi PM. Comparison of umbilical cord interleukin-6 in preterm infants with premature rupture of membranes and intact membranes. *Saudi Med J* 2008; 29: 224-8.

- 94 Andrys C, Drahosova M, Hornychova H, Tambor V, Musilova I, Tosner J, et al. Umbilical cord blood concentrations of IL-6, IL-8, and MMP-8 in pregnancy complicated by preterm premature rupture of the membranes and histological chorioamnionitis. *Neuro Endocrinol Lett* 2010; 31: 857-63.
- 95 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: 632-8.
- 96 Pacora P, Romero R, Maymon E, Gervasi MT, Gomez R, Edwin SS, et al. Participation of the novel cytokine interleukin 18 in the host response to intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 1138-43.
- 97 Jacobsson B, Holst RM, Mattsby-Baltzer I, Nikolaitchouk N, Wennerholm UB, Hagberg H. Interleukin-18 in cervical mucus and amniotic fluid: relationship to microbial invasion of the amniotic fluid, intra-amniotic inflammation and preterm delivery. *Bjog* 2003; 110: 598-603.
- 98 Huang SJ, Schatz F, Masch R, Rahman M, Buchwalder L, Niven-Fairchild T, et al. Regulation of chemokine production in response to pro-inflammatory cytokines in first trimester decidual cells. *J Reprod Immunol* 2006; 72: 60-73.
- 99 Lockwood CJ, Arcuri F, Toti P, Felice CD, Krikun G, Guller S, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta regulate interleukin-8 expression in third trimester decidual cells: implications for the genesis of chorioamnionitis. *Am J Pathol* 2006; 169: 1294-302.
- 100 Leroy MJ, Dallot E, Czerkiewicz I, Schmitz T, Breuiller-Fouche M. Inflammation of choriodecidua induces tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of human myometrial cells. *Biol Reprod* 2007; 76: 769-76.
- 101 Adams KM, Lucas J, Kapur RP, Stevens AM. LPS induces translocation of TLR4 in amniotic epithelium. *Placenta* 2007; 28: 477-81.
- 102 Holcberg G, Amash A, Sapir O, Sheiner E, Levy S, Myatt L, et al. Perfusion with lipopolysaccharide differently affects the secretion of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist by term and preterm human placentae. *Placenta* 2008; 29: 593-601.
- 103 Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera H, Espejel-Nunez A, Flores-Pliego A, Soriano-Becerril D, et al. In vitro secretion profiles of interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF alpha after selective infection with *Escherichia coli* in human fetal membranes. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; 5: 46.
- 104 Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Pliego A, Merchant-Larios H, Vadillo-Ortega F. In vitro secretion and activity profiles of matrix metalloproteinases, MMP-9 and MMP-2, in human term extra-placental membranes after exposure to *Escherichia coli*. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 13.
- 105 McGregor JA, Lawellin D, Franco-Buff A, Todd JK, Makowski EL. Protease production by microorganisms associated with reproductive tract infection. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154: 109-14.
- 106 Holmlund U, Cebers G, Dahlfors AR, Sandstedt B, Bremme K, Ekstrom ES, et al. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. *Immunology* 2002; 107: 145-51.
- 107 Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Collagenolytic enzymes (gelatinases) and their inhibitors in human amniochorionic membrane. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 731-41.

- 108 Di Ferdinando A, Patacchiola F, Perilli MG, Amicosante G, Carta G. Expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human midpregnancy amniotic fluid and risk of preterm labor. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2010; 37: 193-6.
- 109 Kjaergaard N, Hein M, Hyttel L, Helmig RB, Schonheyder HC, Uldbjerg N, et al. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 94: 224-9.
- 110 King AE, Fleming DC, Critchley HO, Kelly RW. Regulation of natural antibiotic expression by inflammatory mediators and mimics of infection in human endometrial epithelial cells. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 341-9.
- 111 King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta* 2007; 28: 161-9.
- 112 Stock SJ, Kelly RW, Riley SC, Calder AA. Natural antimicrobial production by the amnion. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196: 255 e1-6.
- 113 Grable IA, Heine RP. Neutrophil granule products: can they identify subclinical chorioamnionitis in patients with preterm premature rupture of membranes? *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 808-12.
- 114 Espinoza J, Chaiworapongsa T, Romero R, Edwin S, Rathnasabapathy C, Gomez R, et al. Antimicrobial peptides in amniotic fluid: defensins, calprotectin and bacterial/permeability-increasing protein in patients with microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, preterm labor and premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003; 13: 2-21.
- 115 Soto E, Espinoza J, Nien JK, Kusanovic JP, Erez O, Richani K, et al. Human beta-defensin-2: a natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007; 20: 15-22.
- 116 Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, Petkova AP, Weiner CP, Saed GM. The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 1678-87.
- 117 Szukiewicz D, Szewczyk G, Pyzlak M, Klimkiewicz J, Maslinska D. Increased production of beta-defensin 3 (hBD-3) by human amniotic epithelial cells (HAEC) after activation of toll-like receptor 4 in chorioamnionitis. *Inflamm Res* 2008; 57 Suppl 1: S67-8.
- 118 Feng Y, Pan X, Huang N, Feng Y, Wu Q, Wang B. The human beta-defensins expression in female genital tract and pregnancy-related tissues. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2003; 34: 217-9.

**Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo
e corioamnionite histológica: aspectos da resposta
imune inata e de repercussões no período neonatal**

Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo e corioamnionite histológica: Aspectos da resposta imune inata e de repercussões no período neonatal

Resumo

Introdução: A rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT) é uma importante intercorrência obstétrica e a infecção da cavidade amniótica advinda do trato genital inferior é um dos principais fatores associados à sua fisiopatologia. As membranas corioamnióticas são barreiras mecânicas contra a ascensão de micro-organismos e possuem papel fundamental no sistema imune, pois são importantes fontes de mediadores inflamatórios como as citocinas e também de antimicrobianos naturais, como as defensinas. Em resposta à infecção, ocorrem recrutamento e ativação de leucócitos para as membranas fetais, o que caracteriza a corioamnionite histológica, que ativa a cascata inflamatória na interface materno-fetal e contribui com os mecanismos de enfraquecimento e rotura das membranas. Além acometer os tecidos gestacionais de gestações complicadas por RPM-PT, a corioamnionite histológica é um fator de risco para resultados adversos maternos e morbidades neonatais. **Objetivos:** 1) Quantificar a expressão de β defensinas (HBD1, 3 e 4) por membranas corioamnióticas de gestações complicadas por prematuridade associada à corioamnionite histológica; 2) Quantificar a expressão de RNA mensageiro (RNAm) e proteína de IL-18 em membranas corioamnióticas de mulheres com RPM-PT e correlacionar a expressão com a presença de corioamnionite histológica; 3) Avaliar os resultados neonatais adversos de gestações pré-termo complicadas por corioamnionite histológica. **Material e Métodos:** Foram incluídas no estudo, gestantes com parto pré-termo e diagnóstico histológico de corioamnionite. Para o estudo da expressão de β defensinas, 40 fragmentos de membranas corioamnióticas, com diagnóstico histológico de corioamnionite, provenientes de gestações complicadas por rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT) ou trabalho de parto prematuro com bolsa íntegra (TPP), que apresentaram parto prematuro como desfecho gestacional, constituíram o grupo estudo. Como grupo controle, foram avaliadas 40 membranas corioamnióticas, com ausência de corioamnionite e pareadas pela idade gestacional ao grupo estudo. Para a avaliação da expressão de IL-18 foram incluídas no estudo 42 mulheres nos seguintes grupos: RPM-PT fora de trabalho de parto (n = 28) e

gestantes de termo, com membranas íntegras, fora de trabalho de parto, que foram submetidas à cesárea eletiva (n = 14), constituindo o grupo controle do estudo. Para a avaliação dos resultados neonatais adversos de gestações complicadas por corioamnionite histológica foram avaliadas 284 gestantes, com idade gestacional inferior a 37 semanas, no momento do parto. Fragmentos das membranas corioamnióticas incluídos em cada estudo foram encaminhados à análise histopatológica. A expressão de RNA mensageiro (RNAm) de β defensinas e de IL-18 pelas membranas corioamnióticas foi avaliada pela técnica de PCR em tempo real. A expressão proteica e imunolocalização de IL-18 foram analisadas pelas técnicas de *western blot* e imunistoquímica, respectivamente. Os dados sócio-demográficos e gestacionais das pacientes com parto pré-termo, bem como as repercussões, no período neonatal, foram coletadas a partir da análise dos prontuários médicos das gestantes e dos respectivos recém-nascidos incluídos no estudo. **Resultados:** A expressão de RNAm de β defensinas e IL-18 pelas membranas corioamnióticas não foi estatisticamente diferente entre os grupos de estudo considerados em cada avaliação, bem como em relação à presença de corioamnionite histológica. ProIL-18 foi expressa constitutivamente em todas as amostras de membranas corioamnióticas avaliadas. A imunolocalização de IL-18 mostrou presença da proteína no epitélio amniótico, células coriônicas e deciduais. O estudo retrospectivo demonstrou que a corioamnionite histológica esteve relacionada com menor peso do recém-nascido, menor Apgar de 5 minutos, necessidade de ventilação mecânica e pneumonia. **Conclusões:** As membranas corioamnióticas são fontes de RNAm de β defensinas e IL-18, e de proIL-18, e as expressões desses mediadores não está relacionada à presença de corioamnionite histológica nos casos de RPM-PT. Os dados do presente estudo ainda nos permitem concluir que a corioamnionite histológica está associada a repercussões neonatais adversas.

Preterm premature rupture of membranes and histological chorioamnionitis: Aspects of the innate immune response and of outcomes in the neonatal period

Abstract

Introduction: The preterm premature rupture of membranes (PPROM) is an important obstetric issue, and infection in the amniotic cavity from the lower genital tract is one of the main factors associated with its physiology. Chorioamniotic membranes are mechanical barriers against the microorganism's ascension, and they play a fundamental role in the immune system, since they are important sources of inflammatory mediators, such as cytokines, and of natural antimicrobials, like as defensins. In response to infection, leukocytes are recruited and activated in fetal membranes, which characterizes histological chorioamnionitis. This condition activates the inflammatory cascade on the maternal-fetal interface and contributes to weakening mechanisms and membrane rupture. In addition to affecting the gestational tissues of pregnancies complicated by PPRM, histological chorioamnionitis is a risk factor for adverse maternal outcomes and neonatal morbidities.

Objectives: 1) To quantify the expression of β defensins (HBD1, 3 and 4) by chorioamniotic membranes of pregnancies complicated by prematurity associated with histological chorioamnionitis; 2) To quantify the expression of IL-18 mRNA and protein in the chorioamniotic membranes of pregnant women with PPRM and correlate expression with histological chorioamnionitis; 3) To evaluate adverse neonatal outcomes in preterm pregnancies complicated by histological chorioamnionitis. **Materials and Methods:** Pregnant women with preterm delivery and histological diagnosis of chorioamnionitis were included in the study. In order to study the expression of β defensins, 40 fragments of chorioamniotic membranes with histological diagnosis of chorioamnionitis from pregnancies complicated by PPRM or preterm labor with intact membranes (PTL), and with preterm labor as a gestational outcome, comprised the study group. As a control group, 40 chorioamniotic membranes without chorioamnionitis and paired by gestational age to the study group were evaluated. The IL-18 expression study included 42 pregnant women not in labor in the following groups: PPRM (n=28) and controls with intact membranes who underwent selective cesarean section at term (n=14). In order to evaluate adverse neonatal outcomes of pregnancies complicated by histological chorioamnionitis,

284 pregnant women at gestational age lower than 37 weeks were evaluated at the moment of delivery. Fragments of the chorioamniotic membranes included in each study were sent for histopathological analysis. Expression of messenger RNA (mRNA) of β defensins and of IL-18 in chorioamniotic membranes was determined by real time polymerase chain reaction, and IL-18 protein expression was measured by western blot. Histopathological analyses and immunolocalization of IL-18 by immunohistochemistry were also performed. The socio-demographic and gestational data of patients with preterm delivery as well as the outcomes in the neonatal period were collected from the analysis of the pregnant women's medical records and from those of their respective newborns included in the study. **Results:** The expression of β defensin and IL-18 mRNA in chorioamniotic membranes was not statistically different between the study groups considered in each evaluation or in relation to the presence of histological chorioamnionitis. ProIL-18 was constitutively expressed in all chorioamniotic membrane samples evaluated. IL-18 immunolocalization showed the presence of protein in the amniotic epithelium, chorionic and decidual cells. The retrospective study showed that histological chorioamnionitis is associated with neonatal outcomes such as newborns' low weight, lower 5-minute Apgar, use of mechanical ventilation and pneumonia. **Conclusions:** Chorioamniotic membranes are sources of β defensin and IL-18 mRNA, and of proIL-18, and the expression of these mediators is unrelated to the histological chorioamnionitis in PPRM cases. The data in the present study also allow us to conclude that histological chorioamnionitis is associated with adverse neonatal outcomes.

Capítulo II

Artigo Científico I

Artigo Científico I

G Model
EURO-7268; No. of Pages 6

ARTICLE IN PRESS

European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology xxx (2011) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Obstetrics & Gynecology and
Reproductive Biologyjournal homepage: www.elsevier.com/locate/ejogrbExpression of β defensins 1, 3 and 4 in chorioamniotic membranes of preterm pregnancies complicated by chorioamnionitisJossimara Polettini^{a,*}, Juliana Takitane^a, José C. Peraçoli^b, Márcia G. Silva^{a,*}^aFaculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Patologia, São Paulo, Brazil^bFaculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 August 2010

Received in revised form 21 February 2011

Accepted 20 March 2011

Keywords:

Chorioamniotic membranes

Chorioamnionitis

Defensins

Preterm delivery

Real time PCR

ABSTRACT

Objective: To quantify the expression of human β -defensins (HBDs) 1, 3 and 4 in chorioamniotic membranes in pregnancies complicated by prematurity associated with histologic chorioamnionitis.**Study design:** The study group included 23 fragments of chorioamniotic membranes with histologic chorioamnionitis from women with preterm premature rupture of membranes (PPROM) and preterm labor (PTL) with intact membranes, who had preterm deliveries. As a control group, 30 chorioamniotic membranes without chorioamnionitis at the same gestational age as those in the study group were included. Chorioamniotic membranes were collected for histopathological analyses, and HBD mRNA expression quantification was analyzed by real time PCR. Comparisons were performed using the Mann-Whitney or Kruskal–Wallis tests and all the women were informed and provided written consent.**Results:** The expression of HBDs mRNA in the fetal membranes was similar in patients without histologic chorioamnionitis (HBD1: 0.7-fold, HBD3: 0.9-fold, HBD4: 0.3-fold) compared to patients with chorioamnionitis (HBD1: 1.1-fold, HBD3: 0.9-fold, HBD4: 0.4-fold; $p > 0.05$). Regarding the gestational complications that resulted in premature delivery, PPRM or PTL, the relative quantification of HBD1, HBD3 and HBD4 showed no statistically significant differences in either the absence or presence of chorioamnionitis. Among patients with histologic chorioamnionitis, patients with PPRM (HBD1: 2.7-fold, HBD3: 0.3-fold, HBD4: 0.7-fold) presented similar mRNA expression to those with PTL (HBD1: 0.7-fold, HBD3: 1.2-fold, HBD4: 0.13-fold; $p > 0.05$).**Conclusions:** Chorioamniotic membranes are sources of β defensins 1, 3 and 4; however, considering the sample size and the methodology applied, mRNA concentrations were not related to the presence of histologic chorioamnionitis.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chorioamniotic membranes compose a structure of great importance for fetal development. Among its principal functions are protection of the fetus from trauma, maintenance of amniotic fluid volume and protection of the umbilical cord and fetal blood from compression, as well as serving as a barrier against lower genital tract infections [1]. In addition to coating the placental surface and forming the amniotic sac, fetal membranes act to maintain ideal sterile conditions of the amniotic fluid and are an immunological barrier [1]. Recent studies have also suggested this role for fetal membranes, demonstrating that this tissue expresses

antimicrobial agents [2] and components of the innate immune system, such as Toll-like receptors [3,4].

The principal characteristic of innate immunity is its ability to recognize a broad range of microorganisms, including Gram-positive and -negative bacteria, fungi and viruses. In this context, natural antimicrobials participate in the primary host defence through the recognition and neutralization of invading microorganisms [5].

Small cationic antimicrobial peptides called human α -defensins (or human neutrophil peptides, HNP) and human β -defensins (HBDs) have been described. HNPs 1–4 are present in azurophilic granules in neutrophils and have an integral role in the oxygen-independent extermination of bacteria [6], while HBDs constitute the largest group of natural antimicrobials and are produced primarily by epithelial cells [7]. There are 28 HBD sequences that have already been detected in the human genome [8], but HBDs 1–4 have been most extensively studied in the last decade [9]. The first, HBD1, was isolated from hemofiltrate [10] and, among other tissues, is expressed in the genitourinary tract [11,12], respiratory

* Corresponding authors at: Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University, Distrito de Rubião Júnior, CEP: 13618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 14 3811 6238; fax: +55 14 3815 2348.
E-mail address: mgsilva@fmb.unesp.br (M.G. Silva).

tract [13] and placental tissue [2]. The constitutive expression of HBD1 is well established in several tissues [14–16] and in these cases, its expression is not affected by the production of inflammatory mediators. Recent studies, however, show that this natural antimicrobial can also be produced under microbial stimuli [17–19]. With the particular advantage of forming dimers, the expression of HBD3 has already been related to non-reproducing tissues, such as those in the oral cavity [20], lungs [8] and bone [21]. Recently, HBD3 was detected in myometrial and endometrial tissue [22,23], with its highest expression in the early and late secretory phase of the menstrual cycle. HBD4 was characterized through the genome and, although already detected in endometrium [24] and other tissues, the highest HBD4 expression was verified in the testis, followed by expression in the gastric antrum [25]. In the uterus, neutrophils, thyroid glands, lungs and kidneys, however, low HBD4 expression was verified and little is known regarding the expression and regulation of this defensin in other biological systems [25].

In the reproductive tract of nonpregnant women, natural antimicrobials are present in the vagina, cervix, endometrium and fallopian tubes [26,27]. In term pregnancies, antimicrobial agents are present in the amniotic fluid [28,29], chorion trophoblast layers and amniotic epithelium of fetal membranes and placenta [2,16,30,31]. This expression particularly by the fetal membranes may be important during labor and delivery, when the cervix is dilated, making the uterus more susceptible to infections. Amniotic and chorionic cells obtained from term pregnancies were described as having an inhibitory effect on the growth of many bacterial species and this was suggested, in part, by the production of endogenous antimicrobials by these tissues [32].

Histologic chorioamnionitis, defined by the infiltration of fetal membranes by polymorphonuclear leukocytes, occurs in most cases in the absence of clinical signs and symptoms of infection and this diagnosis can be made in more than 20% of term pregnancies and in more than 50% of preterm births [33–35]. Recent studies have determined a positive correlation between the presence of neutrophil defensins in amniotic fluid and maternal plasma in preterm pregnancies, in the presence of infection of the amniotic cavity [36,37]. Under inflammatory stimuli, HBD3 is the most abundant and most highly expressed β -defensin in amniotic epithelial cells [30]. Reports in the literature affirm that in preterm premature rupture of membranes (PPROM) and in clinical and histologic chorioamnionitis, amniotic cells stimulated with lipopolysaccharide exhibit increased expression of HBD3 compared to term pregnancies. Studies are still lacking, however, regarding the activity and expression of HBDs in the chorioamniotic membranes of preterm pregnancies and/or in the presence of infection of the amniotic cavity [38].

Considering that inflammatory events in the amniotic cavity are pronounced in pregnancies complicated by PPRM or preterm labor (PTL) associated with histologic chorioamnionitis and that chorioamniotic membranes have an inhibitory effect on the growth of many bacteria, in part due to the production of β defensins, the objective of this study was to quantify the expression of HBDs 1, 3 and 4 by chorioamniotic membranes in pregnancies complicated by prematurity associated with histologic chorioamnionitis.

2. Materials and methods

The study group consisted of women with singleton pregnancies who presented with PPRM or PTL between 26 and 36 weeks gestation and were admitted to the Obstetrics Unit of the Clinical Hospital of Botucatu Medical School, State of São Paulo, Brazil. Gestational age was calculated from the first day of the last menstruation and/or from the first trimester ultrasound. PROM

was diagnosed by sterile speculum examination confirming pooling of amniotic fluid in the vagina, positive nitrazine paper test, positive fern test and the search for fetal cells in cervicovaginal secretion. PTL was defined as the presence of regular uterine contractions every 10 min or less and cervical effacement equal or superior to 50% confirmed by two observers and/or cervical dilatation of at least 2 cm at less than 37 weeks of gestation. PPRM and PTL were defined according to the Brazilian Ministry of Health guidelines, available at: (<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Manual%20Puerperio%202006.pdf>).

Exclusion criteria were multiple pregnancies, pre-eclampsia, diabetes, fetal anomalies and placenta previa. No pregnant woman included in this study presented with *Chlamydia trachomatis* cervicitis or urinary tract infection during the pregnancy. Chorioamnionitis was confirmed in 23 chorioamniotic membranes from the study group by histopathological evaluation. The control group consisted of 30 chorioamniotic membranes from women with singleton pregnancies without histopathologic chorioamnionitis, with the same gestational age as the study group. In both groups, all pregnant women had preterm delivery.

The Human Research Ethics Committee of the institution approved the study (Protocol 3161-2009), and written informed consent was obtained from all participants.

All the chorioamniotic membranes collected were stored in RNA later[®] (RNA Stabilization Reagent, Ambion) using 10 μ l/mg tissue at -80°C . Samples of the membranes were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin and eosin for histopathological analyses. Histologic chorioamnionitis was diagnosed by the presence of neutrophilic infiltration present in chorioamniotic membranes, according to Yoon et al. [39].

Total RNA was extracted from chorioamniotic membrane samples using Illustra RNAspin Mini Isolation kit (GE Healthcare). To preclude genomic DNA contamination, all RNA samples were treated with RNase-free DNase I (New England Biolabs[®]) before amplification. The quality and concentration of extracted total RNA were measured with a Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer. Sample RNA (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) was subjected to reverse transcription using the High-Capacity cDNA Archive Kit, in accordance with the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Real time quantitative PCR was used to quantify mRNA expression of β defensins, and TaqMan-validated primers and TaqMan MGB probes were used to amplify HBD1, HBD3 and HBD4 (ID Hs00174765_m1, Hs00218678_m1, and Hs00175474_m1, respectively). Expression levels of the relevant genes in each sample were normalized to TBP (TATA box binding protein, ID Hs99999910_m1), which was used as the housekeeping gene. Amplification was performed using an ABI Prism[®] 7300 Sequence Detector (Applied Biosystems), with an optical unit that permits real-time monitoring of increased PCR product concentration. The threshold cycle number (CT) is the PCR cycle number at which fluorescence release achieves a threshold level and was used to determine relative HBD mRNA expression, using the ddCT method [40]. The mean of CT from samples of patients without chorioamnionitis was used as calibrator. Thermal cycling was initiated with a denaturation step of 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. All reactions were performed in duplicate and no template controls were included in each run.

Statistical analyses were performed with SigmaStat Software version 3.1. After checking for normality of the data using the Kolmogorov-Smirnov test (with Lilliefors' correction), comparisons of each HBD mRNA concentration in relation to the presence or absence of chorioamnionitis were performed using the nonparametric Mann-Whitney test. For comparisons between

pregnancy complications that resulted in preterm delivery in the presence or absence of chorioamnionitis, the test used was Kruskal–Wallis. A p value <0.05 was considered to be statistically significant.

3. Results

In relation to demographic data of the study population, no statistically significant differences concerning median maternal age [25 (14–34) vs. 19 (14–44); $p > 0.05$] and gestational age at delivery [34w (26w–36w6d) vs. 33w2d (28w–36w3d); $p > 0.05$] were observed between the patients without and with chorioamnionitis, respectively. The results were stratified in two subgroups: less than 32 weeks' gestation and between 32 and 36 weeks. In this analysis, no difference was verified in relation to maternal and gestational age at delivery and other demographic and obstetric characteristics (Table 1).

Relative quantification of HBD1, HBD3, and HBD4 mRNA in chorioamniotic membranes included in the study is presented in Fig. 1. Observation determined that no statistically significant difference occurred in the expression of evaluated defensins between the groups without (HBD1: 0.7-fold, HBD3: 0.9-fold, HBD4: 0.3-fold) or with chorioamnionitis (HBD1: 1.1-fold, HBD3: 0.9-fold, HBD4: 0.4-fold; $p > 0.05$). The same results were verified in gestational age stratified groups (Fig. 2). HBD4 mRNA was undetectable in 8 (34.8%) chorioamniotic membranes samples from study group and in 10 (33.3%) from control group.

Regarding the pregnancy complications that resulted in preterm delivery (PPROM or PTL with intact membranes), the relative amounts of HBD1, HBD3, and HBD4 were not significantly different, independent of the presence of chorioamnionitis (Fig. 3). Among patients with histologic chorioamnionitis, patients with PPROM (HBD1: 2.7-fold, HBD3: 0.3-fold, HBD4: 0.7-fold) presented similar mRNA expression than those with PTL (HBD1: 0.7-fold, HBD3: 1.2-fold, HBD4: 0.13-fold; $p > 0.05$) (Fig. 4).

4. Comment

Considering that human β defensins exhibit antimicrobial activity against a broad spectrum of bacteria [5], we hypothesized that the expression of β defensins would be increased in chorioamniotic membranes complicated by chorioamnionitis, assuming that, in the presence of infection and inflammatory response, higher concentrations of these natural antimicrobials

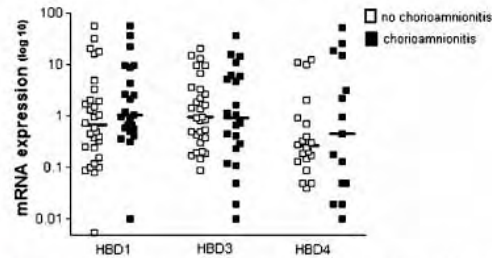


Fig. 1. Relative quantification of human beta defensin (HBD) 1, 3 and 4 mRNA in chorioamniotic membranes from pregnancies complicated or not by histologic chorioamnionitis. Medians (horizontal lines) are shown. Mann–Whitney test ($p > 0.05$).

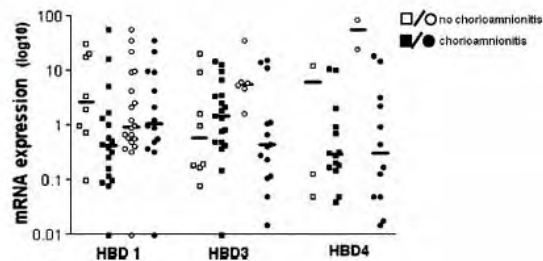


Fig. 2. Relative quantification of human beta defensin (HBD) 1, 3 and 4 mRNA in chorioamniotic membranes from pregnancies complicated or not by histologic chorioamnionitis. The squares represent cases with less than 32 week's gestation, and the circles represent cases with 32–36 full week's gestation. Medians (horizontal lines) are shown. Kruskal–Wallis test ($p > 0.05$).

would be important at the maternal–fetal interface. Supporting this hypothesis, Heine et al. [41] reported that levels of neutrophil defensins increase exponentially in amniotic fluid with increasing severity of histologic chorioamnionitis. Moreover, Gankovskaia et al. [11] reported that the presence of urogenital infection was associated with increased expression of HBD1 by the cervical mucosa.

In the present study, however, the relative amounts of HBD1, HBD3, and HBD4 in membranes with chorioamnionitis were not

Table 1
Clinical and demographic characteristics of the study population.

Week's gestation	Without chorioamnionitis		With chorioamnionitis		p Value
	<32 weeks (n=8)	32w1d–36w6d (n=18)	<32 weeks (n=6)	32w1d–36w6d (n=14)	
Maternal age (years)	20.5 (16–20.5)	24.5 (14–24.5)	16.5 (14–16.5)	19 (14–19)	0.11 ^b
Ethnicity					
Caucasian	6 (75)	17 (94.4)	5 (83.3)	11 (78.6)	0.51 ^c
Not caucasian	2 (25)	1 (5.6)	1 (16.4)	3 (21.4)	
Smoking habits					
Yes	1 (12.5)	7 (31.8)	1 (16.6)	1 (6.6)	0.14 ^c
No	7 (87.5)	11 (68.2)	5 (83.4)	13 (93.4)	
Gestational age at delivery (weeks, days)	28w3d (25w2d–31w6d) a	34w3d (33w–36w6d) b	30w1d (28w–31w5d) a	34w (32w2d–36w3d) b	0.001 ^b
Parity					
1	2 (25)	9 (50)	3 (50)	9 (64.3)	0.37 ^c
>1	6 (75)	9 (50)	3 (50)	5 (35.7)	
Prior adverse gestational outcomes ^a					
Yes	4/6 (66.6)	8/9 (88.9)	3/3 (100)	3/5 (60)	0.40 ^c
No	2/6 (33.4)	1/9 (11.1)	0	2/5 (40)	

Values are expressed as median (range) or number (%).

In the line, in comparison between groups, proportions followed by the same letter (a,b) did not statistically differ ($p > 0.05$).

^a Preterm births, abortion or PPROM.

^b Kruskal–Wallis test.

^c Chi-square test.

Please cite this article in press as: Poletini J, et al. Expression of β defensins 1, 3 and 4 in chorioamniotic membranes of preterm pregnancies complicated by chorioamnionitis. Eur J Obstet Gynecol (2011), doi:10.1016/j.ejogrb.2011.03.014

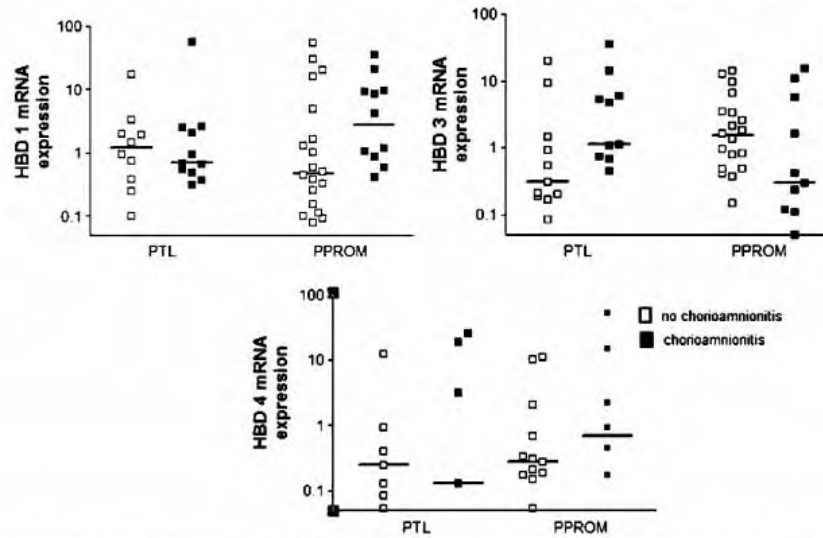


Fig. 3. Relative quantification of human beta defensin (HBD) 1, 3 and 4 mRNA in chorioamniotic membranes from pregnancies complicated by PTL or PPROM in relation to the presence of histologic chorioamnionitis. Medians (horizontal lines) are shown. Kruskal-Wallis test ($p > 0.05$).

significantly higher than in membranes without chorioamnionitis in PPROM or PTL. Since preterm births can also be subdivided according to gestational age [42], expression of the HBDs was stratified in two subgroups: less than 32 weeks gestation and between 32 and 36 full weeks gestation, and the same results were verified, either in the absence or presence of chorioamnionitis. The first point to consider is the constitution of the control group; even though there was no chorioamnionitis, it consisted of chorioamniotic membranes from patients in PTL or PPROM without histological chorioamnionitis. Recently, Kim et al. [43] proposed a new model of intra-amniotic microbial invasion that can explain our results, based on the kinetics of this pathophysiological process. As proposed by the authors, intra-amniotic bacterial invasion occurs through a discrete region of the chorioamniotic membranes, followed by intra-amniotic proliferation, and bacterial invasion of membranes primarily extends from the amniotic fluid. Thus, focal histologic chorioamnionitis could be present in the membranes from the control group (since intra-amniotic infection is the principal cause of PTL or PPROM [44,45]), but it was not detected in such cases. Some consideration should be given to

the fact that the infection could be restricted to the amniotic fluid at the moment of the delivery of these patients and that the presence of bacteria and their products in the amniotic fluid can activate cell-surface receptors that bind to the pathogen and initiate a signal leading to the release of effector molecules, such as interleukins and cytokines, and consequently, to increased HBD expression (reviewed by Froy [46]). Thus, the present results may have been affected by this condition. Although it was not the ideal control, comparing HBD expression to term pregnancies would be inappropriate, since striking differences have been reported between term and preterm births, like cytokine bias [47], myometrial gene expression [48] and species of infectious organisms [49].

Besides the absence of chorioamnionitis but possible intra-amniotic infection, another issue should be considered regarding the control group. There is increasing evidence for a genetic predisposition of the mother as a potential cause for preterm delivery: preterm born mothers have a higher risk of delivering prematurely themselves [50]. A medical history of preterm delivery multiplies the risk of another preterm delivery [51]. Consequently, recent studies have led to increasing speculation that variations in the maternal immune response, mediated by genetic variation in the inflammatory response, might be integrally involved in the pathophysiology of spontaneous preterm labor and preterm birth [52]. The issues regarding HBD genetic variations and pregnancy have not yet been consistently explored, however, and only a large study of clinically well-defined cases would permit the elucidation of the molecular mechanisms responsible for the role of HBDs in PTL of different causes.

Another thing to consider is that the regulation of β defensin synthesis is not the same in different systems and that in chorioamniotic membranes in vivo, it is poorly understood. In some cells, such as uterine macrophages, peripheral blood monocytes [53] and amniotic cells in culture [54], stimulation with inflammatory cytokines induces the synthesis of certain β defensins. King et al. [55] reported that endometrial epithelial cells increase the production of natural antimicrobial after stimulation with IL-1 β , a cytokine rapidly produced after the exposure of

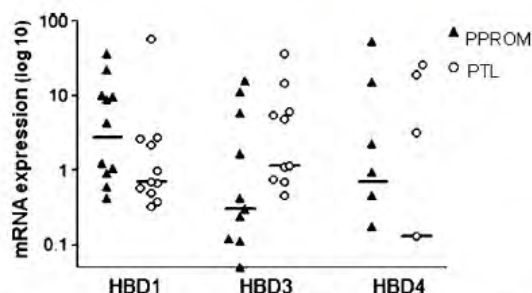


Fig. 4. Relative quantification of human beta defensin (HBD) 1, 3 and 4 mRNA in chorioamniotic membranes from pregnancies with histologic chorioamnionitis and preterm premature rupture of membranes (PPROM) or preterm labor (PTL). Kruskal-Wallis test ($p > 0.05$).

macrophages to endotoxins [56] and increased in maternal–fetal interface in preterm pregnancies [57]. In chorioamniotic membranes, the expression of HBDs 1 and 3 may be influenced by cytokines, regardless of the presence of chorioamnionitis. In contrast, HBD4 may not be totally affected by proinflammatory cytokine stimuli in chorioamniotic membranes, similar to that already verified in amniotic cells [54], intestinal epithelia [58] and in lung epithelial cell line [25]. This could explain the lack of HBD-4 expression in some samples in this study.

In addition to the differences in the presence and production of β defensins in various tissue and cell types, the transcription factor can justify the results obtained, given that the difference in the amount of a specific mRNA between two biological samples is not necessarily reflected by quantitative differences in the amount of protein. It could also be explained by temporal differences between mRNA synthesis and protein expression and the shorter half-life of mRNA than protein [59]. This study only evaluated mRNA expression of HBDs 1, 3 and 4 in chorioamniotic membranes using a highly specific quantitative PCR method. Clearly, studies of protein expression are needed to clarify their role, although this is hampered by the high levels of structural homology between the various defensin family members [8].

In conclusion, analysis of the results based on mRNA expression revealed that chorioamniotic membranes from preterm births are sources of β defensins and that, bearing in mind the sample size and the methodology applied, the expression of HBD1, HBD3, and HBD4 is not associated with the presence of histologic chorioamnionitis in PPROM or PTL.

Acknowledgment

This study was supported by the State of São Paulo Science Foundation (FAPESP); Grants 2009/52317-2 and 2009/50663-0.

References

- [1] Parry S, Strauss 3rd JF. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998;338:663–70.
- [2] King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta* 2007;28:161–9.
- [3] Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. *Hum Pathol* 2004;35:47–54.
- [4] Koga K, Mor G. Toll-like receptors at the maternal–fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:587–600.
- [5] Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* 2000;8:402–10.
- [6] Ashitani J, Mukae H, Hiratsuka T, Nakazato M, Kumamoto K, Matsukura S. Plasma and BAL fluid concentrations of antimicrobial peptides in patients with *Mycobacterium avium*-intracellulare infection. *Chest* 2001;119:1131–7.
- [7] Huttner KM, Bevins CL. Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. *Pediatr Res* 1999;45:785–94.
- [8] Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, et al. Discovery of five conserved beta-defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:2129–33.
- [9] Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:1294–313.
- [10] Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 1995;368:331–5.
- [11] Gankovskaia OA, Kovalchuk LV, Gankovskaia LV, et al. Role of Toll-like receptors and defensins in antimicrobial protection of urogenital tract in females. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2008;46–50.
- [12] Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray Jr PB, Ganz T. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 1998;101:1633–42.
- [13] Singh PK, Jia HP, Wiles K, et al. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14961–6.
- [14] Ali RS, Falconer A, Ikram M, Bissett CE, Cerio R, Quinn AG. Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J Invest Dermatol* 2001;117:106–11.
- [15] Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun* 1998;66:4222–8.
- [16] Zhao C, Wang L, Lehrer RI. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* 1996;396:319–22.
- [17] Joly S, Organ CC, Johnson GK, McCray Jr PB, Guthmiller JM. Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. *Mol Immunol* 2005;42:1073–84.
- [18] Sorensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T. Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J Immunol* 2005;174:4870–9.
- [19] Zhu BD, Feng Y, Huang N, Wu Q, Wang BY. *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) enhances human beta-defensin-1 gene transcription in human pulmonary gland epithelial cells. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24:907–12.
- [20] Dunsche A, Acil Y, Dommisch H, Siebert R, Schroder JM, Jepsen S. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci* 2002;110:121–4.
- [21] Varoga D, Wruck CJ, Tohidnezhad M, et al. Osteoblasts participate in the innate immunity of the bone by producing human beta defensin-3. *Histochem Cell Biol* 2009;131:207–18.
- [22] Garcia JR, Jaumann F, Schulz S, et al. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res* 2001;306:257–64.
- [23] King AE, Critchley HO, Kelly RW. Innate immune defences in the human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:116.
- [24] King AE, Fleming DC, Critchley HO, Kelly RW. Differential expression of the natural antimicrobials, beta-defensins 3 and 4, in human endometrium. *J Reprod Immunol* 2003;59:1–16.
- [25] Garcia JR, Krause A, Schulz S, et al. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *Faseb J* 2001;15:1819–21.
- [26] Feng Y, Pan X, Huang N, Feng Y, Wu Q, Wang B. The human beta-defensins expression in female genital tract and pregnancy-related tissues. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2003;34:217–9.
- [27] Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, et al. Human-defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:18631–5.
- [28] Akinbi HT, Narendran V, Pass AK, Markart P, Hoath SB. Host defense proteins in vernix caseosa and amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:2090–6.
- [29] Soto E, Espinoza J, Nien JK, et al. Human beta-defensin-2: a natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007;20:15–22.
- [30] Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, Petkova AP, Weiner CP, Saed GM. The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:1678–87.
- [31] Svinarich DM, Gomez R, Romero R. Detection of human defensins in the placenta. *Am J Reprod Immunol* 1997;38:252–5.
- [32] Kjaergaard N, Hein M, Hyttel L, et al. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;94:224–9.
- [33] Edwards RK. Chorioamnionitis and labor. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2005;32:287–96.
- [34] Poletini J, Peracoli JC, Candeias JM, Araujo Junior JP, Silva MG. Inflammatory cytokine mRNA detection by real time PCR in chorioamniotic membranes from pregnant women with preterm premature rupture of membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;144:27–31.
- [35] Silva MG, Peracoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Peracoli MT. Cervical Lactobacillus and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynaecol Obstet* 2003;81:175–82.
- [36] Espinoza J, Chaiworapongsa T, Romero R, et al. Antimicrobial peptides in amniotic fluid: defensins, calprotectin and bacterial/permeability-increasing protein in patients with microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, preterm labor and premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003;13:2–21.
- [37] Grable IA, Heine RP. Neutrophil granule products: can they identify subclinical chorioamnionitis in patients with preterm premature rupture of membranes? *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:808–12.
- [38] Szukiewicz D, Szweczyk G, Pyzlak M, Klimkiewicz J, Maslinska D. Increased production of beta-defensin 3 (hBD-3) by human amniotic epithelial cells (HAEC) after activation of toll-like receptor 4 in chorioamnionitis. *Inflamm Res* 2008;57(Suppl. 1):S67–8.
- [39] Yoon BH, Romero R, Kim CJ, et al. Amniotic fluid interleukin-6: a sensitive test for antenatal diagnosis of acute inflammatory lesions of preterm placenta and prediction of perinatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:960–70.
- [40] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 2001;25:402–8.
- [41] Heine RP, Wiesenfeld H, Mortimer L, Greig PC. Amniotic fluid defensins: potential markers of subclinical intrauterine infection. *Clin Infect Dis* 1998;27:513–8.
- [42] Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008;371:75–84.
- [43] Kim MJ, Romero R, Gervasi MT, et al. Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection. *Lab Invest* 2009;89:924–36.
- [44] Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000;342:1500–7.

Please cite this article in press as: Poletini J, et al. Expression of β defensins 1, 3 and 4 in chorioamniotic membranes of preterm pregnancies complicated by chorioamnionitis. *Eur J Obstet Gynecol* (2011), doi:10.1016/j.ejogrb.2011.03.014

- [45] Yoon BH, Romero R, Kim M, et al. Clinical implications of detection of *Ureaplasma urealyticum* in the amniotic cavity with the polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1130-7.
- [46] Froy O. Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways. *Cell Microbiol* 2005;7:1387-97.
- [47] El-Shazly S, Makhseed M, Azizieh F, Raghupathy R. Increased expression of pro-inflammatory cytokines in placentas of women undergoing spontaneous preterm delivery or premature rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol* 2004;52:45-52.
- [48] Tattersall M, Engineer N, Khanjani S, et al. Pro-labour myometrial gene expression: are preterm labour and term labour the same? *Reproduction* 2008;135:569-79.
- [49] Jones HE, Harris KA, Azizia M, et al. Differing prevalence and diversity of bacterial species in fetal membranes from very preterm and term labor. *PLoS One* 2009;4:e8205.
- [50] Porter TF, Fraser AM, Hunter CY, Ward RH, Varner MW. The risk of preterm birth across generations. *Obstet Gynecol* 1997;90:63-7.
- [51] Bakketeg LS, Hoffman HJ, Harley EE. The tendency to repeat gestational age and birth weight in successive births. *Am J Obstet Gynecol* 1979;135:1086-103.
- [52] Varner MW, Esplin MS. Current understanding of genetic factors in preterm birth. *Bjog* 2005;112(Suppl. 1):28-31.
- [53] Pioli PA, Weaver LK, Schaefer TM, Wright JA, Wira CR, Guyre PM. Lipopolysaccharide-induced IL-1 beta production by human uterine macrophages up-regulates uterine epithelial cell expression of human beta-defensin 2. *J Immunol* 2006;176:6647-55.
- [54] Stock SJ, Kelly RW, Riley SC, Calder AA. Natural antimicrobial production by the amnion. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196(255):e1-6.
- [55] King AE, Fleming DC, Critchley HO, Kelly RW. Regulation of natural antibiotic expression by inflammatory mediators and mimics of infection in human endometrial epithelial cells. *Mol Hum Reprod* 2002;8:341-9.
- [56] Higgins GC, Foster JL, Postlethwaite AE. Interleukin 1 beta propeptide is detected intracellularly and extracellularly when human monocytes are stimulated with LPS in vitro. *J Exp Med* 1994;180:607-14.
- [57] Romero R, Brody DT, Oyarzun E, et al. Infection and labor, III. Interleukin-1: a signal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:1117-23.
- [58] Fahlgren A, Hammarstrom S, Danielsson A, Hammarstrom ML. Beta-defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2004;137:379-85.
- [59] Maier T, Guell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett* 2009;583:3966-73.

Capítulo III

Artigo Científico II

Artigo Científico II

Interleukin 18 messenger RNA and protein expression in chorioamniotic membranes from pregnant women with preterm premature rupture of membranes

Jossimara Polettini¹, Eliane Passarelli Vieira¹, Mariana Perlati dos Santos¹, José Carlos Peraçoli², Steven S. Witkin³, Márcia Guimarães da Silva^{1*}.

Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University.

¹ Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista. Departamento de Patologia, Botucatu, São Paulo, Brasil.

² Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista. Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Botucatu, São Paulo, Brasil.

³ Department of Obstetrics and Gynecology, Weill Medical College of Cornell University, New York, New York, USA

*Corresponding author

Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista.

Departamento de Patologia

Distrito de Rubião Júnior, CEP: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Telefone: +55 (14) 3811-6238 Fax: +55 (14) 3815-2348

E-mail: mgsilva@fmb.unesp.br

This article is written according to European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology (ISSN 0301-2115 – Impact Factor: 1.58).

Condensation:

Chorioamniotic membranes from women not in labor are sources of IL-18 mRNA and proIL-18 protein and their expression is not altered by PPRM or histological chorioamnionitis.

Abstract

Introduction: Preterm premature rupture of membranes (PPROM), one of the major causes of prematurity, can result from various mechanisms, including bacterial invasion of the amniotic cavity, histological chorioamnionitis and cytokine-mediated apoptosis. Interleukin (IL)-18 upregulates apoptosis in some tissues and participates in host defense against infections. **Objective:** To quantify the expression of IL-18 mRNA and protein in the chorioamniotic membranes of pregnant women with PPRM and correlate expression with histological chorioamnionitis. **Methods:** The study included 42 pregnant women not in labor in the following groups: PPRM (n=28) and controls with intact membranes who underwent selective cesarean section at term (n=14). Expression of IL-18 mRNA in chorioamniotic membranes was determined by real time polymerase chain reaction, and IL-18 protein expression was measured by western blot. Histopathological analyses and immunolocalization of IL-18 by immunohistochemistry were also performed. Analysis utilized the Mann-Whitney test or Fisher's exact test and the group effect was considered significant if the adjusted p-values were <0.05 and the magnitude of change was higher than 2-fold for mRNA expression. **Results:** IL-18 mRNA was present in 100% of samples and no difference in expression was observed between term *vs.* PPRM membranes (fold-change 0.12; p=0.88). In the PPRM group, no difference was observed in IL-18 mRNA regarding gestational age (fold-change 0.11; p=0.42) or the presence of histological chorioamnionitis (fold-change 0.26; p=0.15). ProIL-18 was present in all samples. IL-18 was immunolocalized to amnion, chorion and decidua cells, with intense immunohistochemical staining at the choriodecidual junction. **Conclusion:** Chorioamniotic membranes are sources of IL-18 mRNA and expression unrelated to PPRM or to histological chorioamnionitis.

Keywords: Preterm premature rupture of membranes, interleukin-18, proIL-18, histological chorioamnionitis.

Introduction

Rupture of membranes (ROM) is a physiologic process occurring during labor. When it occurs spontaneously before 37 weeks of gestation in the absence of labor, it is referred to as preterm premature rupture of membranes (PPROM) [1], and is one of the major causes of prematurity [2]. Premature rupture can result from various mechanisms, including bacterial invasion of the amniotic cavity and histological chorioamnionitis [3], physiological membrane weakening, decreased repair potential and in utero stretch forces with altered physical properties, which induce transcription and activation of proteins that promote apoptosis and remodeling of the chorioamniotic membranes [4]. Recent studies have demonstrated that fetal membranes from women with PPRM had a higher apoptotic index [5], and that there is an increase in apoptosis in the presence of histological chorioamnionitis as compared with its absence in PPRM [6] and term [7] membranes.

The two major pathways that trigger apoptosis in fetal membranes during PPRM are a p53-mediated pathway and the Fas-FasL/TNF-TNFR p55 (TNFR1) mediated pathway [8-10]. These activators can incite inflammatory changes, with fetal membrane degradation and weakening [11]. Moreover, apoptosis may also lead to matrix degrading enzyme activation, promoting membrane degradation and rupture [8]. Both mechanisms lead to the activation of nuclear factor (NF)- κ B, a transcription factor that is involved in the synthesis and regulation of proinflammatory cytokines and prostaglandins [12-14].

IL-18 is a novel multifunctional cytokine which paradoxically participates in the regulation of both Th1 and Th2 responses and augments both innate and acquired immunity [15, 16]. In driving the Th1 response, IL-18 appears to act in association with IL-12 in inducing IFN- γ [17, 18]. Moreover, IL-18 has the ability to induce the synthesis of TNF- α , IL-1 β , IL-8, and other cytokines as well as to activate effector cells and

molecules, like NF- κ B, [19]. IL-18 shares structural similarities with IL-1 β and is produced as a 24-kD inactive precursor lacking a signal peptide (proIL-18) [20, 21]. This form of IL-18 requires cleavage to an active cytokine by the IL-1 β -converting enzyme (caspase-1), an intracellular cysteine protease [22, 23].

IL-18 is expressed by human gestational tissues [24, 25], but studies of IL-18 in relation to its role in pregnancy have been inconclusive. Some investigations showed an increase in serum and amniotic fluid (AF) IL-18 levels throughout pregnancy and during labor [26, 27]. Ekelund et al. [28] found that serum from women delivering before 34 weeks of gestation had significantly lower levels of IL-18 compared with women delivering after 34 weeks. Conversely, Daskalais et al. [29] demonstrated recently that AF from preterm deliveries had significantly higher concentrations of IL-18 compared to term pregnancies. In non-infected women with PPRM, higher AF levels of IL-18 have been detected compared to women with preterm labor with intact membranes or with term delivery [25].

Considering that proinflammatory cytokine-induced collagen remodeling and apoptosis correlate directly with fetal membrane physical weakness [11], and that IL-18 has proinflammatory properties, the objective of the present study was to investigate the expression of IL-18 mRNA and protein in chorioamniotic membranes in relation to PPRM and chorioamnionitis.

Materials and methods

This was a cross-sectional study to evaluate the expression of IL-18 in chorioamniotic membranes from pregnant women with PPRM. All studied patients were admitted to the Obstetrics Unit of the Hospital of Botucatu Medical School, located in central São Paulo State, Brazil, in 2008. From a total of 1560 deliveries, 96 (6.2%) had PPRM. Incomplete labor and delivery information, difficulties in sample

collection and exclusion criteria resulted in the inclusion of 28 women with PPROM without labor and 14 control pregnant women at > 37 weeks of gestation. These women were scheduled for an elective caesarean section for the following indications: previous caesarean sections or breech presentation. None of the women at term were in labor or presented with rupture of membranes prior to surgery. Women with multiple pregnancies, preeclampsia, diabetes, fetal anomalies and placenta previa were excluded. Gestational age was calculated from the first day of the last menstruation and/or from the first trimester ultrasound.

PROM was diagnosed by sterile speculum examination confirming pooling of amniotic fluid in the vagina, positive nitrazine paper test, positive fern test and fetal cells in cervicovaginal secretion, and was defined according to the Brazilian Ministry of Health guidelines, available at: (<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Manual%20Puerperio%202006.pdf>). The Institution Human Research Ethics Committee approved the study and written informed consent was obtained from all participants.

Chorioamniotic membrane samples were immediately obtained after placental delivery and stored in RNA later® solution at -80°C until RNA extraction and IL-18 expression analysis. Additional samples were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin and eosin for histological evaluation and IL-18 and caspase-1 immunolocalization by immunohistochemistry. Other chorioamniotic samples were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until protein expression analysis.

Total RNA was extracted from tissue samples stored in RNA *later* using a commercial RNA isolation kit (Illustra RNAspin Mini Isolation Kit (GE Healthcare)). A total of 1.0 µg of RNA from each sample were reverse transcribed using High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The qPCR reactions were assembled based on the TaqMan

Universal PCR Master Mix protocol (Applied Biosystems), using GAPDH for quantification of the housekeeping gene and the TaqMan gene expression assay (Hs00155517_m1) for IL-18 mRNA. Data were collected by the ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The results are expressed as the ratio of IL-18 to GAPDH expression and the threshold cycle number (CT) was used to determine relative IL-18 mRNA expression, using the ddCT method [30]. A mix from some studied samples was used as a calibrator on all plates to account for eventual plate effects. Relative mRNA expression for IL-18 is given as relative folds, increased or decreased, between the studied groups.

For immunohistochemical analysis, eight micron-thick sections from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks were mounted on slides, dried at 37°C for 24 hours and subjected to deparaffinization and to antigen-retrieval by boiling in Trilogy™ solution (Cell Marque, Hot Springs, AR) for 30 minutes. Sections were then immediately transferred to fresh hot Trilogy™ solution in a second staining dish for five minutes and washed in PSB buffer (Biocare Medical, Concord, CA, USA). Before the primary antibodies for IL-18 [mouse monoclonal anti-human IL-18 (1:12000) (MBL, Naka-ku, Nagoya, Japan)] or caspase-1 [mouse monoclonal anti-human caspase-1 (1:1200) (ab54932, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA)] were applied, endogenous peroxidase activity was quenched with Peroxidazed 1 (Biocare Medical) for 10 minutes at room temperature, and sections were washed again in PBS buffer. The primary antibodies were applied for 3 hours at room temperature. Staining was performed using the MACH 4 universal detection system (Biocare Medical) according to manufacturer's instructions and was visualized with DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) (Biocare Medical). Sections were counterstained with Harris hematoxylin. Negative controls were performed for each specimen, in which sections were incubated without the primary monoclonal antibodies. Sections from normal

human prostate and pancreatic tissue were obtained from the Department of Pathology Archives at the Botucatu Medical School and applied as positive and negative controls for caspase-1 expression [31, 32], respectively.

Snap frozen chorioamniotic membranes samples were lysed in a lysis buffer [PBS, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and protease inhibitor (10 μ L/mL, Amersham®)]. The insoluble material was then removed by centrifugation at 1500g for 20 min at 4°C. The concentration of protein in each cell lysate was determined using a BCA protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Inc.) with bovine serum albumin (BSA) as the standard. An identical amount of protein (30 μ g) from each sample was loaded onto a 10% SDS-PAGE gel and electrophoresed at 200 V. The resolved proteins were transferred to an Hybond-P membrane (Amersham Biosciences, GE Healthcare Ltd, Chalfont St.Giles, Bucks., UK) using a wet transfer apparatus (Bio-Rad Laboratories®). The membranes were blocked in Tris-Buffered Saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) and 5% skim milk for 1h at room temperature. Blots were incubated with anti-IL-18 [mouse monoclonal anti-human IL-18 (1/1000 dilution) (MBL, Naka-ku, Nagoya, Japan)] and anti- β -actin specific primary antibody [(1:6000) [mouse monoclonal anti-human beta-Actin (1/6000 dilution) (ab6276, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) at 4°C and shaking overnight. Blots were washed three times with TBS-T and then incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody [(1/5000 dilution) (SAB Signalway Antibody) for 1h at room temperature. All blots were developed using chemiluminescence reagents ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham™) according to the manufacturer's instructions. The signals were captured by the Alpha Innotech FluorChem® FC2 Imager.

Statistical analyses were performed with SigmaStat Software version 3.1. After checking for normality of the data, maternal age, gestational age at delivery and IL-18

mRNA concentrations were compared between the studied groups using the Mann Whitney test. Ethnicity, smoking habits, parity, previous pregnancy complications and histological chorioamnionitis were compared employing the Fisher's exact test. A p value <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Demographic and clinical characteristics of the study population are shown in Table 1. Maternal age was lower in the PPRM group compared to term women. Parity and the presence of histological chorioamnionitis were statistically different between the studied groups, while ethnicity, smoking habits and previous pregnancy complications were similar.

IL-18 mRNA was present in 100% of the samples, demonstrating constitutive gene expression in chorioamniotic membranes. No statistical difference in the relative fold expression of IL-18 was observed in the PPRM group *vs.* the term group (Figure 1A). A similar finding was observed regarding gestational age in the PPRM group, stratified into 2 subgroups: less than 34 weeks gestation and between 34 and 36 weeks gestation (Figure 1B), or regarding the presence or absence of histological chorioamnionitis (Figure 1C).

Samples subjected to immunohistochemistry showed the presence of IL-18 localized to amnion, chorion and decidua cells (Figure 2). The staining was most intense at the area of the choriodecidual junction.

In order to quantify IL-18 levels in chorioamniotic membranes, western blot was performed. Only the 24 kDa immunoreactive band, corresponding to the immature form of IL-18 (proIL-18), was detected. The 18 kDa mature bioactive form was not observed (Figure 3), perhaps due to the fact that predominantly intracellular material was being analyzed. However, due to the absence of mature IL-18, the

samples were also evaluated for the presence of the enzyme caspase-1, that creates mature IL-18 from its precursor. Discreet immunoperoxidase staining of caspase-1 was observed in amniotic, chorionic, and decidual cells (Figure 4).

Comment

The present study demonstrates that chorioamniotic membranes from women not in labor are constitutive producers of IL-18 mRNA, and that the extent of this expression is unrelated to the presence or absence of PPRM and/or histological chorioamnionitis. Furthermore, the precursor proIL-18 protein was detected within the chorioamniotic membranes along with caspase-1. Presumably mature IL-18 was identified at the choriodecidual junction. We cannot exclude the possibility that small amounts of bioactive IL-18, below the detection limit of Western blot analysis, may have been present within the chorioamniotic membrane preparations. The antibody used in our study to measure IL-18 recognized both mature and unprocessed forms. A prior publication by Gotsch et al. [33] concluded that caspase-1 levels in amniotic fluid were absent at mid-trimester and were highest in samples obtained from women in labor at term. Thus, production of bioactive IL-18 may only occur to a limited extent prior to parturition. Serum IL-18 concentrations were shown to be reduced in women in preterm labor relative to women in term labor [28]. Similarly, reduced amniotic fluid IL-18 levels were identified in women who delivered preterm [34]. Although caspase-1 cleavage of proIL-18 is not exclusive and other proteases, such as proteinase 3 [35] and granzyme B [36], have been recently reported to also generate biological activity from precursor IL-18, little is known regarding the expression and regulation of these proteins in gestational tissues.

It appears from our findings that IL-18 is not specifically involved in the induction of premature rupture of the chorioamniotic membranes or is a factor in

chorioamnionitis-related membrane disruption but, rather, that IL-18 becomes activated and functional during term labor and participates in the parturition process. Previous studies demonstrated no relationship between the amniotic fluid concentration of IL-18 and PPRM [26,27]. In addition, Amash et al. [24] showed the levels of IL-18 in the amnion, chorion and placenta from uncomplicated term pregnancies were unchanged in the presence of LPS. A possible function for IL-18 prior to parturition can be implied from experiments in mice. Deletion of the gene coding for IL-18 was shown to result in a markedly elevated rate of fetal loss compared to intact control animals [37].

Further investigations are necessary to clarify the molecular mechanisms involved in IL-18 activation at the maternal-fetal interface, to evaluate protease and inflammasome activity in chorioamniotic membranes from women not in labor and to define the biological role(s) of IL-18 following term labor initiation.

Acknowledgments

This study was supported by the State of São Paulo Science Foundation (FAPESP); grants 2008/55417-5 and 2008/55517-0.

References

- 1 Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 178-93.
- 2 Murphy DJ, Fowlie PW, McGuire W. Obstetric issues in preterm birth. *BMJ* 2004; 329: 783-6.
- 3 Menon R, Fortunato SJ. Infection and the role of inflammation in preterm premature rupture of the membranes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; 21: 467-78.
- 4 El Khwad M, Stetzer B, Moore RM, et al. Term human fetal membranes have a weak zone overlying the lower uterine pole and cervix before onset of labor. *Biol Reprod* 2005; 72: 720-6.
- 5 Tanir HM, Sener T, Artan S, Kaytaz B, Sahin-Mutlu F, Ozen ME. Programmed cell death (apoptosis) in placentas from normal pregnancy and pregnancy complicated by term (t) and preterm (p) premature rupture of membranes (PROM). *Arch Gynecol Obstet* 2005; 273: 98-103.

- 6 George RB, Kalich J, Yonish B, Murtha AP. Apoptosis in the chorion of fetal membranes in preterm premature rupture of membranes. *Am J Perinatol* 2008; 25: 29-32.
- 7 Murtha AP, Auten R, Herbert WN. Apoptosis in the chorion laeve of term patients with histologic chorioamnionitis. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2002; 10: 93-6.
- 8 Fortunato SJ, Menon R, Bryant C, Lombardi SJ. Programmed cell death (apoptosis) as a possible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrane degradation in premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 1468-76.
- 9 Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Support for an infection-induced apoptotic pathway in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 1392-7; discussion 1397-8.
- 10 Menon R, Lombardi SJ, Fortunato SJ. TNF-alpha promotes caspase activation and apoptosis in human fetal membranes. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 201-4.
- 11 Kumar D, Fung W, Moore RM, et al. Proinflammatory cytokines found in amniotic fluid induce collagen remodeling, apoptosis, and biophysical weakening of cultured human fetal membranes. *Biol Reprod* 2006; 74: 29-34.
- 12 Patni S, Flynn P, Wynen LP, et al. An introduction to Toll-like receptors and their possible role in the initiation of labour. *BJOG* 2007; 114: 1326-34.
- 13 Allport VC, Pieber D, Slater DM, Newton R, White JO, Bennett PR. Human labour is associated with nuclear factor-kappaB activity which mediates cyclo-oxygenase-2 expression and is involved with the 'functional progesterone withdrawal'. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 581-6.
- 14 Herve R, Schmitz T, Evain-Brion D, Cabrol D, Leroy MJ, Mehats C. The PDE4 inhibitor rolipram prevents NF-kappaB binding activity and proinflammatory cytokine release in human chorionic cells. *J Immunol* 2008; 181: 2196-202.
- 15 Lauwerys BR, Renauld JC, Houssiau FA. Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18. *Cytokine* 1999; 11: 822-30.
- 16 Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yoshimoto T, Nakanishi K. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv Immunol* 1998; 70: 281-312.
- 17 Robinson D, Shibuya K, Mui A, et al. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity* 1997; 7: 571-81.
- 18 Ahn HJ, Maruo S, Tomura M, et al. A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-gamma-inducing factor in enhanced production of IFN-gamma. *J Immunol* 1997; 159: 2125-31.
- 19 Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12: 53-72.
- 20 Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev* 2008; 223: 20-38.
- 21 Dinarello CA. Interleukin-18. *Methods* 1999; 19: 121-32.
- 22 Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, et al. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* 1997; 275: 206-9.
- 23 Melnikov VY, Ecdar T, Fantuzzi G, et al. Impaired IL-18 processing protects caspase-1-deficient mice from ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 2001; 107: 1145-52.
- 24 Amash A, Huleihel M, Eyal S, Maor E, Myatt L, Holcberg G. The expression of interleukin-15 and interleukin-18 by human term placenta is not affected by lipopolysaccharide. *Eur Cytokine Netw* 2007; 18: 188-94.

- 25 Menon R, Lombardi SJ, Fortunato SJ. IL-18, a product of choriodecidual cells, increases during premature rupture of membranes but fails to turn on the Fas-FasL-mediated apoptosis pathway. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 276-84.
- 26 Jacobsson B, Holst RM, Mattsby-Baltzer I, Nikolaitchouk N, Wennerholm UB, Hagberg H. Interleukin-18 in cervical mucus and amniotic fluid: relationship to microbial invasion of the amniotic fluid, intra-amniotic inflammation and preterm delivery. *BJOG* 2003; 110: 598-603.
- 27 Pacora P, Romero R, Maymon E, et al. Participation of the novel cytokine interleukin 18 in the host response to intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 1138-43.
- 28 Ekelund CK, Vogel I, Skogstrand K, et al. Interleukin-18 and interleukin-12 in maternal serum and spontaneous preterm delivery. *J Reprod Immunol* 2008; 77: 179-85.
- 29 Daskalakis G, Thomakos N, Papapanagiotou A, Papantoniou N, Mesogitis S, Antsaklis A. Amniotic fluid interleukin-18 at mid-trimester genetic amniocentesis: relationship to intraamniotic microbial invasion and preterm delivery. *BJOG* 2009; 116: 1743-8.
- 30 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-8.
- 31 Winter RN, Kramer A, Borkowski A, Kyprianou N. Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 1227-32.
- 32 Yang YM, Ramadani M, Huang YT. Overexpression of Caspase-1 in adenocarcinoma of pancreas and chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2828-31.
- 33 Gotsch F, Romero R, Chaiworapongsa T, et al. Evidence of the involvement of caspase-1 under physiologic and pathologic cellular stress during human pregnancy: a link between the inflammasome and parturition. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008; 21: 605-16.
- 34 Puchner K, Iavazzo C, Gourgiotis D, Boutiskou M, Baka S, Hassiakos D, et al. Mid-trimester amniotic fluid interleukins (IL-1b, IL-10 and IL-18) as possible predictors of preterm delivery. *In Vivo* 2011; 25: 141-8.
- 35 Sugawara S, Uehara A, Nochi T, et al. Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. *J Immunol* 2001; 167: 6568-75.
- 36 Omoto Y, Yamanaka K, Tokime K, et al. Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme. *J Dermatol Sci* 2010; 59: 129-35.
- 37 Wang X, Hagberg H, Mallard C, Zhu C, Hedtjarn M, Tiger CF, et al. Disruption of interleukin-18, but not interleukin-1, increases vulnerability to preterm delivery and fetal mortality after intrauterine inflammation. *Am J Pathol* 2006; 169: 967-76.

Table 1. Demographic and obstetrics characteristics of study subjects.

	Term (n=14)	PPROM (n=28)	p
Maternal age (years)*	30 (27-37)	23.5 (19-29.5)	0.007
Ethnicity**			
White	11 (78.6)	26 (92.8)	0.31
Non-white	3 (21.4)	2 (7.2)	
Smoking habits**			
yes	2 (14.3)	2 (7.2)	0.59
no	12 (85.7)	26 (92.8)	
Gestational age at delivery (weeks, days)*	38w4d (38w-38w6d)	34w3d (33w-35w4d)	<0.0001
Parity**			
1	1 (7.1)	17 (60.7)	<0.001
>1	13 (92.9)	11 (39.3)	
Histological chorioamnionitis			
yes	-	12 (42.8)	0.003
no	14 (100.0)	16 (57.2)	
Prior adverse gestational outcomes**			
yes	7/13 (53.8)	5/11 (45.5)	1.000
no	6/13 (46.2)	6/11 (54.5)	

* Median (interquartile range); Mann Whitney test.

** n(%); Fisher's exact test

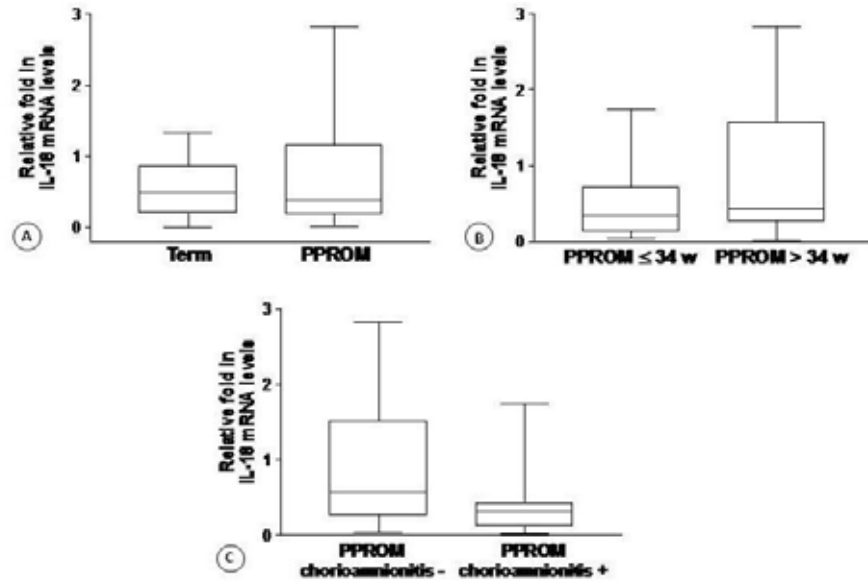


Figure 1. Box plot representing IL-18 mRNA expression in chorioamniotic membranes, analyzed by real time PCR. GAPDH mRNA expression was used for the normalization of the data **A.** Comparison between term pregnancies *vs.* PPROM group (fold-change 0.12; $p=0.88$). **B.** IL-18 mRNA in relation to gestational age (<34 weeks of gestation and > 34 weeks of gestation) in the PPROM group (fold-change 0.11; $p=0.42$). **C.** IL-18 mRNA in relation to histological chorioamnionitis in the PPROM group (fold-change 0.26; $p=0.15$). Mann-Whitney test.

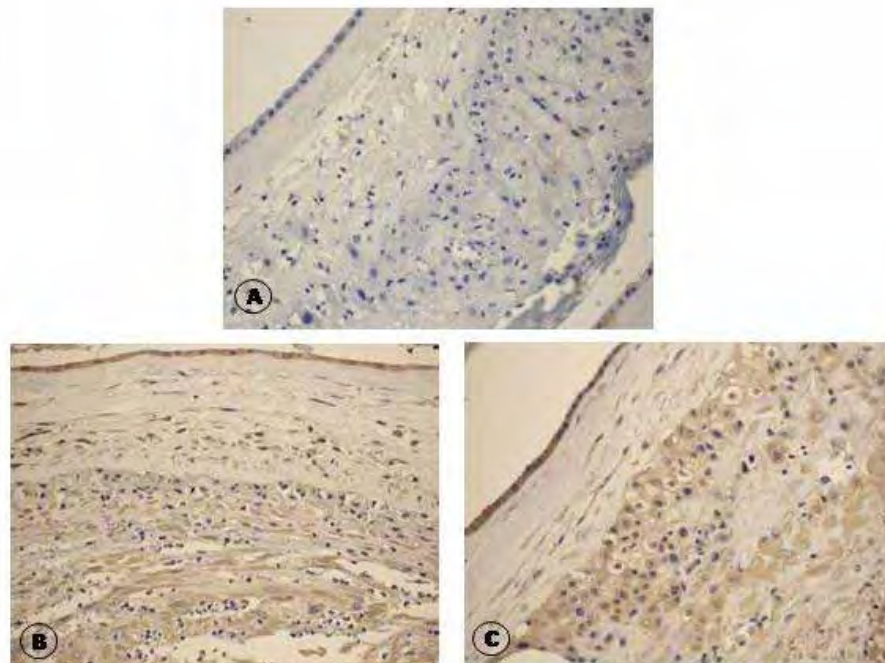


Figure 2. Immunohistochemical detection of IL-18 in chorioamniotic membranes. Negative control, sections were incubated without polyclonal antihuman interleukin-18 (A). Sections incubated with polyclonal anti-human IL-18 in the presence (B) or absence (C) of histological chorioamnionitis (original magnification of all images, x400).

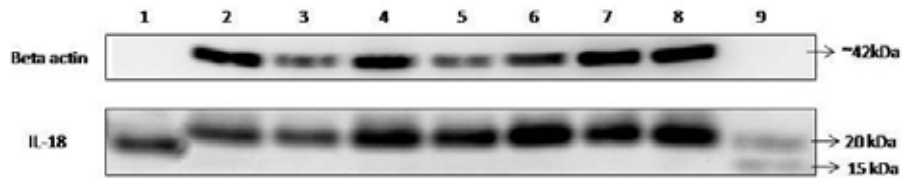


Figure 3. Western blot analysis of IL-18 in chorioamniotic membranes using monoclonal anti-human IL-18. Lane 1: recombinant IL-18 protein (positive control, 10 ng, 18 kDa). Lanes 2-8: chorioamniotic membranes samples, showing the characteristics bands of proIL-18 (24kDa). Lane 9: prestained protein marker (20 and 15 kDa).

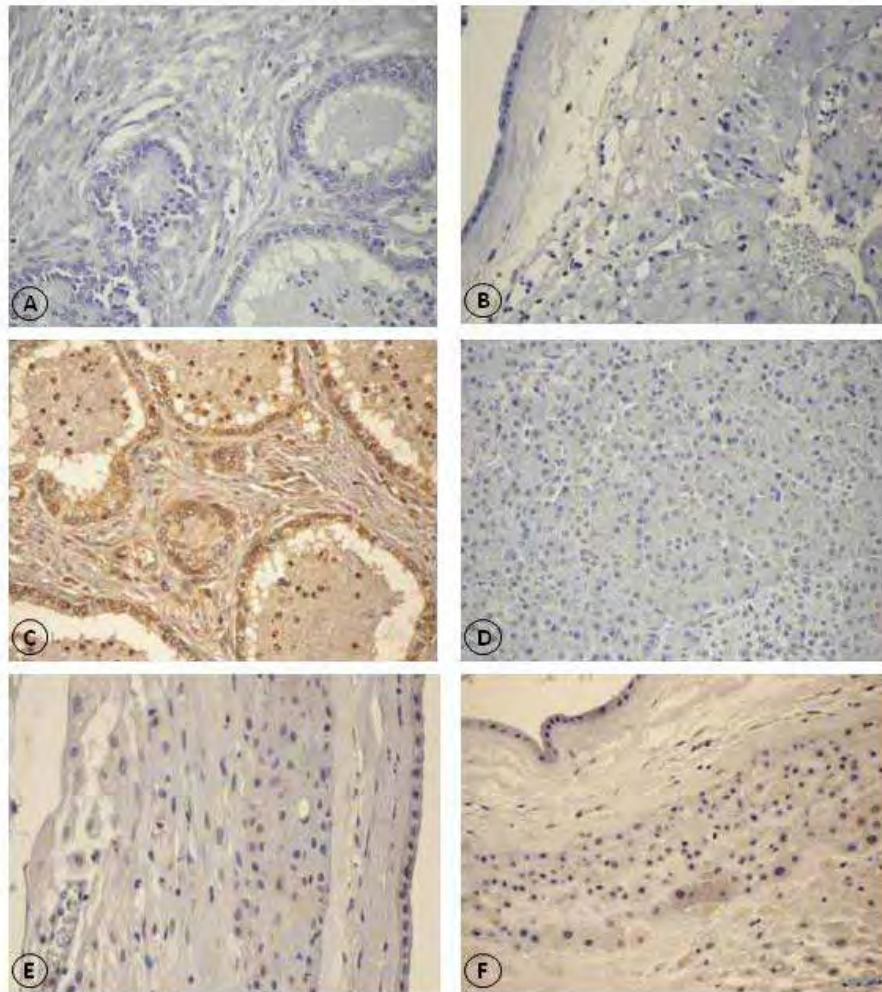


Figure 4. Immunohistochemical detection of caspase-1 in chorioamniotic membranes. Negative controls from prostate tissue and chorioamniotic membranes, sections were incubated without the polyclonal antibody antihuman caspase-1 (A and B, respectively). Sections from prostate and pancreatic tissues incubated with polyclonal antibody anti-human IL-18 (C and D, respectively). Chorioamniotic membranes incubated with polyclonal antihuman caspase-1 (E and F) (original magnification of all images, x400).

Capítulo IV

Artigo Científico III

Artigo Científico III

Repercussões no período neonatal de gestações complicadas por corioamnionite histológica

Jossimara Polettini¹, Larissa Doddi Marcolino¹, Bruna Ribeiro de Andrade Ramos¹, Natália Prearo Moço¹, Laura Fernandes Martins¹, Leonardo Parizzi Lealdini³, Graziella Galvão Gonçalves¹, Márcia Guimarães da Silva^{1*}

1. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista. Departamento de Patologia, Botucatu, São Paulo, Brasil.
2. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista. Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Botucatu, São Paulo, Brasil.
3. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista. Departamento de Pediatria, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Resumo

Introdução: Corioamnionite histológica é definida pela infiltração das membranas fetais por leucócitos polimorfonucleares, sendo que a maioria dos casos ocorre na ausência de sinais clínicos e sintomas de infecção. Essa condição histopatológica ocorre em cerca de 20% das gestações de termo e em mais de 50% das gestações pré-termo. As repercussões no período neonatal, decorrentes de gestações complicadas por corioamnionite, vêm sendo avaliadas, porém os resultados ainda são inconsistentes. **Objetivo:** Avaliar repercussões neonatais de gestações pré-termo complicadas por corioamnionite histológica. **Material e Métodos:** Trata-se de estudo retrospectivo, no qual foram avaliadas 284 gestantes que apresentaram parto pré-termo, atendidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, no período de 2003 a 2010. Os dados sócio-demográficos das gestantes incluídas no estudo, dos desfechos gestacionais e das repercussões neonatais foram coletados a partir da análise dos prontuários médicos das gestantes e dos respectivos recém-nascidos. As variáveis sócio-demográficas avaliadas foram idade materna, etnia e hábito tabagista. As variáveis obstétricas foram idade gestacional no parto, tipo de parto, paridade, intercorrências gestacionais anteriores, corioamnionite clínica além de comorbidades maternas associadas. **Resultados:** A prevalência de corioamnionite histológica foi de 33,8% (96/284) nas gestações pré-termo avaliadas e correlacionou-se com a idade materna, tipo de parto, idade gestacional e ocorrência de Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo. Em relação às repercussões no período neonatal, a corioamnionite histológica esteve relacionada com menor peso do recém-nascido, menor Apgar de 5 minutos, necessidade de ventilação mecânica e pneumonia. **Conclusão:** Em estudo retrospectivo de gestações pré-termo foi possível determinar associação entre corioamnionite histológica e repercussões no período neonatal.

Introdução

A invasão microbiana da cavidade amniótica está frequentemente presente em gestações complicadas por Trabalho de Parto Pré-Termo (TPP) na presença ou não de Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo (RPM-PT) e é um fator de risco para resultados adversos maternos e morbidades relacionadas à infecção neonatal¹⁻³.

Alguns estudos têm demonstrado que a infecção da cavidade amniótica pode estar envolvida com resultados adversos neonatais⁴⁻⁷, incluindo paralisia cerebral, sepse neonatal, síndrome do desconforto respiratório, enterocolite necrotizante, pneumonia entre outros⁸⁻¹².

O termo corioamnionite clínica é empregado para referir as manifestações maternas e fetais que refletem a infecção da cavidade amniótica. É diagnosticada na presença de temperatura materna acima de 38°C e pelo menos dois dos seguintes achados: leucocitose materna (acima de 15 mil células/ cm³), taquicardia materna (acima de 100 bpm), taquicardia fetal (acima de 160 bpm) e fisiometria¹³. Esses sinais clínicos aparecem somente quando a resposta inflamatória está bem estabelecida na interface materno-fetal e o diagnóstico pode ser feito de 1% a 2% dos partos a termo e de 5% a 10% dos partos pré-termo¹⁴.

No entanto, sabe-se que, em resposta à infecção da cavidade amniótica, por ascensão de micro-organismos do trato genital inferior, ocorre recrutamento e ativação de leucócitos para as membranas fetais¹⁵, deflagrando resposta inflamatória materna e fetal, que caracteriza a corioamnionite histológica. A maioria dos casos de corioamnionite histológica ocorre na ausência de sinais clínicos e de sintomas de infecção e este

diagnóstico pode ser feito em mais de 20% das gestações de termo e em mais de 50% dos partos pré-termo¹⁶⁻¹⁸.

A corioamnionite tem sido relatada como um fator desencadeante da cascata inflamatória que deflagra o trabalho de parto pré-termo, uma vez que, na presença de infecção na cavidade amniótica, as próprias bactérias ou seus produtos estimulam os tecidos gestacionais a produzirem mediadores pró-inflamatórios^{19, 20}, tornando o microambiente materno-fetal susceptível ao desencadeamento do parto pré-termo²¹, na presença ou não de RPM-PT.

Devido à alta incidência de corioamnionite histológica em gestações pré-termo, trabalhos recentes na literatura têm sido conduzidos de modo a investigar sua associação com resultados adversos neonatais, associação já bem estabelecida para a corioamnionite clínica^{8-10, 22}. O aumento de repercussões clínicas e óbito perinatais já foram associados ao aumento de resposta inflamatória na interface materno-fetal²³⁻²⁵, e a maior prevalência de sepse neonatal em recém-nascidos pré-termo tem sido atribuída, pelo menos em parte, à presença de corioamnionite histológica^{26, 27}. Por outro lado, Prendergast et al.²⁸, analisando gestações pré-termo, não encontraram associação entre piora da função pulmonar ou severidade de displasia broncopulmonar na presença de corioamnionite histológica. Da mesma forma, Amim et al.²⁹ descreveram que a corioamnionite histológica não está associada a prejuízos neurológicos em recém-nascidos pré-termo.

Considerando os potenciais riscos da relação entre corioamnionite histológica e resultados neonatais adversos, o objetivo do presente estudo foi avaliar repercussões neonatais de gestações pré-termo complicadas por corioamnionite histológica.

Material e Métodos

Trata-se de estudo retrospectivo, no qual foram avaliadas gestantes que apresentaram parto pré-termo, atendidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, no período de 2003 a 2010, em que o exame histopatológico da placenta e anexos foi realizado para diagnóstico de corioamnionite histológica. Os critérios de exclusão do estudo foram presença de diabetes materna, hipertensão arterial crônica, malformações congênitas, óbito fetal, gemelaridade e natimortos.

Considerando os critérios de exclusão adotados, 337 gestantes foram elegíveis ao estudo. Desse total, 53 prontuários médicos maternos e/ou neonatais não estiveram disponíveis para análise, portanto, foram avaliadas 284 pacientes. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Os dados sócio-demográficos das pacientes incluídas no estudo, dos desfechos gestacionais e das repercussões neonatais foram coletados a partir da análise dos prontuários médicos das gestantes e dos respectivos recém-nascidos. As variáveis sócio-demográficas avaliadas foram idade materna, etnia e hábito tabagista e as obstétricas foram idade gestacional no parto, tipo de parto, paridade, ocorrência de aborto, TPP ou RPM em gestações anteriores, corioamnionite clínica e infecção genital materna além de comorbidades maternas associadas.

Dentre as comorbidades maternas, foram consideradas a presença de pré-eclâmpsia, diabetes gestacional, incompetência istmo-cervical, disfunções tireoidianas ou

hipertensão arterial gestacional. Todas as gestantes foram acompanhadas segundo protocolo padronizado no Serviço de Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Foram consideradas as seguintes variáveis pós-natal: corioamnionite comprovada histologicamente, peso ao nascer, Apgar e complicações neonatais. As repercussões neonatais incluíram hemorragia peri-intraventricular (graus III e IV), síndrome do desconforto respiratório, intubação com suporte ventilatório, displasia broncopulmonar, hemocultura positiva, convulsão, enterocolite necrotizante, perfuração intestinal, retinopatia da prematuridade, meningite, pneumonia, hipertensão pulmonar persistente, persistência do canal arterial, hiperbilirrubinemia, taquipnéia transitória do recém-nascido ou distúrbios metabólicos (hipoglicemia ou hiper ou hiponatremia).

As placentas e as membranas corioamnióticas foram analisadas histopatologicamente no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Logo após a dequitação, as placentas e seus anexos foram acondicionados em recipiente apropriado, contendo formalina a 10%, por 24 horas para fixação. Fragmentos da placenta, membranas corioamnióticas e cordão umbilical 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 que foram montados em lâminas de vidro. As lâminas foram coradas pelo método clássico de Hematoxilina-Eosina (HE) para a análise histopatológica das membranas. O critério histopatológico empregado para o diagnóstico de corioamnionite foi o descrito por Yoon et al.³⁰.

Os dados sócio-demográficos, os desfechos gestacionais e as repercussões neonatais foram comparados entre os grupos com e sem corioamnionite histológica, empregando-se os testes de X^2 , exato de Fisher, Mann-Whitney ou Teste t, de acordo com o comportamento das variáveis estudadas. Posteriormente, ajustou-se o modelo de regressão logística considerando cada uma das repercussões neonatais como variáveis independentes e a presença de corioamnionite histológica e comorbidades maternas como variáveis explanatórias. As análises foram realizadas no Software SAS for Windows versão 9.2, e para todos os testes utilizados foi adotado o nível de significância de 5%.

Resultados

No período do estudo, a prevalência de parto pré-termo no Serviço de Obstetria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, foi de 17,5% (1600/9118). As características sócio-demográficas e gestacionais das pacientes incluídas no estudo estão apresentadas na Tabela 1. A corioamnionite histológica esteve presente em 96 (33,8%) gestações, e correlacionou-se com a idade materna, tipo de parto, idade gestacional, ocorrência de RPM-PT e comorbidades maternas.

Em relação às repercussões no período neonatal, a corioamnionite histológica esteve relacionada com menor peso do recém-nascido, menor Apgar de 5 minutos, presença de hemorragia peri-intraventricular (graus III e IV), necessidade de ventilação mecânica, meningite, pneumonia e morte neonatal (Tabela 2). No entanto, após aplicação do modelo de regressão logística das repercussões neonatais quanto à presença de comorbidades maternas, as variáveis significativamente afetadas pela corioamnionite histológica foram o peso do RN ($p=0,02$), Apgar de 5 minutos ($p=0,03$) e pneumonia, apresentada na Tabela 3.

Para ressaltar as associações significativas entre corioamnionite histológica e as variáveis peso do RN, Apgar de 5 minutos, pneumonia e necessidade de ventilação mecânica nova análise considerando a presença ou ausência de comorbidades maternas foi realizada (Tabela 4), confirmando que todas essas variáveis foram significativamente associadas à presença de corioamnionite histológica, na ausência de comorbidades maternas.

As repercussões neonatais avaliadas no presente estudo não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas em relação à idade gestacional estratificada no momento do parto e em relação à presença ou não de RPM-PT.

Discussão

O parto pré-termo é a principal causa de morbidade e mortalidade perinatais e, em todo o mundo, essa intercorrência gestacional acomete cerca de 10% das gestações, sendo descritas prevalências de 6,2% na Europa, 7,9% América do Sul, 10,6% na América Norte e 11,9% na África³¹. Apesar dos avanços quanto ao atendimento neo e perinatal, a prematuridade permanece sendo o fator de risco mais importante para óbito no primeiro ano de vida, mesmo em países desenvolvidos³². Além da mortalidade, as comorbidades associadas à prematuridade podem ter conseqüências tardias na vida do neonato, como perdas auditivas³³ e asma³⁴.

Dados de estudo multicêntrico recente demonstram estreita relação entre evidências histológicas de infecção placentária e parto pré-termo³⁵. Nesse sentido, o presente estudo que teve por objetivo avaliar gestações pré-termo, a frequência de corioamnionite histológica foi de 33,8%, resultado concordante com estudos anteriores^{17, 18}.

^{29, 36}. Em relatos considerando gestações pré-termo precoce (<32 semanas de gestação), a incidência de corioamnionite histológica é de cerca de 50% ou mais^{4, 37, 38}.

A presença de corioamnionite histológica associou-se com maior idade materna, porém essa diferença não foi observada por outros autores^{26, 38}. Além dessa variável, o presente estudo demonstrou associação de corioamnionite histológica e parto vaginal, menor idade gestacional e ocorrência de RPM. Já foi documentado na literatura que os resultados neonatais melhoram proporcionalmente com o avanço da idade gestacional, independente do tipo de parto³⁹. Adicionalmente, observações anteriores demonstram que a corioamnionite histológica está frequentemente associada à ocorrência de RPM-PT^{26, 40}, e, no presente estudo, mais de 50% das membranas corioamnióticas que apresentaram infiltrado inflamatório, eram de gestações complicadas por RPM-PT.

Alguns trabalhos da literatura mundial têm demonstrado que a corioamnionite histológica está associada com aumento dos riscos de morbidade neonatal, incluindo síndrome do desconforto respiratório, displasia broncopulmonar, hemorragia peri-intraventricular, sepse precoce e óbito⁴¹⁻⁴³. Considerando a análise bivariada, o presente estudo corrobora as associações entre corioamnionite histológica e menor peso do recém-nascido, menor Apgar de 5 minutos, maior ocorrência de hemorragia peri-intraventricular (graus III e IV), necessidade de ventilação mecânica, meningite e pneumonia no recém-nascido. Por outro lado, o peso do RN e menor Apgar de 5 minutos mantiveram-se estatisticamente significativos após ajuste de regressão logística, resultados que concordam com os dados de Dempsey et al.⁴³. Outra repercussão importante que manteve sua associação após ajuste quanto à presença de comorbidades maternas foi a pneumonia. A associação entre inflamação/ infecção intra-amniótica e resultados respiratórios neonatais adversos têm sido extensivamente estudada, porém com considerável

inconsistência dos resultados (revisado por Thomas & Speer⁴⁴. Alguns estudos demonstram atividade protetora da corioamnionite histológica na síndrome respiratória aguda ou broncodisplasia pulmonar^{15, 43, 45}, e esse efeito é atribuído à maturação pulmonar, uma vez que a exposição pré-natal a mediadores inflamatórios estimula a produção de proteínas surfactantes⁴⁶. Em contrapartida, Zanardo et al.⁴⁷ descreveram que a corioamnionite histológica é um potencial fator de risco clínico para o desenvolvimento de doença pulmonar crônica no neonato. Nesse sentido, Been et al.⁴⁸ descreveram que a eficácia do tratamento exógeno com surfactante diminui na presença de corioamnionite, além dos RN apresentarem piora na função respiratória, caracterizada pela síndrome do desconforto respiratório.

De acordo com Lee et al.⁴⁹, existe associação entre inflamação intra-amniótica e presença de doença pulmonar crônica, descrita como injúria pulmonar causada por oxigenoterapia e ventilação mecânica. Após ajuste das variáveis e exclusão dos casos com comorbidades maternas, nossos dados apontam associação de corioamnionite histológica e necessidade de ventilação mecânica e pneumonia.

As demais repercussões neonatais (síndrome do desconforto respiratório, displasia broncopulmonar, hemocultura positiva, convulsão, enterocolite necrotizante, perfuração intestinal, retinopatia da prematuridade, meningite, hipertensão pulmonar persistente, persistência do canal arterial, hiperbilirrubinemia, taquipnéia transitória do RN e distúrbios metabólicos) não apresentaram diferença significativa quando comparadas à presença ou ausência de corioamnionite histológica. É importante se considerar que algumas repercussões neonatais podem ser atribuídas à prematuridade, independente da presença de corioamnionite. Lahra et al.⁵⁰ descreveram que variáveis como sexo do RN,

persistência do canal arterial e sepse neonatal não foram diferentes entre presença ou ausência de corioamnionite histológica em RN com idade gestacional inferior a 30 semanas. Wang et al.⁵¹, em estudo com RN com prematuridade tardia encontraram que hipoglicemia e icterícia ocorreram mais frequentemente do que em RN de termo. De fato, no presente estudo, mais de 50% dos RN apresentou hiperbilirrubinemia e mais de 20%, distúrbios metabólicos como a hipoglicemia, independente da presença de corioamnionite histológica.

Uma importante observação é de que a comparação entre os estudos da literatura é difícil devido aos diferentes critérios de inclusão adotados, como idade gestacional e peso do RN, além da limitação do presente estudo por se basear em informações descritas nos prontuários médicos maternos e dos recém-nascidos. Holzman et al.⁵² e Salafia et al.⁵³ (2009) salientam que fatores como definição de corioamnionite histológica, critérios de inclusão/ exclusão, critérios de análise e etnia podem explicar a heterogeneidade dos resultados dos trabalhos envolvendo a participação da corioamnionite nos mecanismos de parto e, em especial, na associação com os resultados neonatais.

De qualquer forma, a placenta e seus anexos constituem material biológico fundamental para o entendimento das vias de infecção e / ou inflamação que levam à prematuridade, e estudos de avaliação dos resultados adversos gestacionais, fatores de risco associados e as complicações neonatais decorrentes da corioamnionite histológica poderão contribuir para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na prematuridade.

Referências

- 1 Andrews WW, Hauth JC, Goldenberg RL. Infection and preterm birth. *Am J Perinatol* 2000; 17: 357-65.
- 2 Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002; 8: 3-13.
- 3 Romero R, Sirtori M, Oyarzun E, Avila C, Mazor M, Callahan R, et al. Infection and labor. V. Prevalence, microbiology, and clinical significance of intraamniotic infection in women with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 817-24.
- 4 Dexter SC, Malee MP, Pinar H, Hogan JW, Carpenter MW, Vohr BR. Influence of chorioamnionitis on developmental outcome in very low birth weight infants. *Obstet Gynecol* 1999; 94: 267-73.
- 5 Gaudet LM, Smith GN. Cerebral palsy and chorioamnionitis: the inflammatory cytokine link. *Obstet Gynecol Surv* 2001; 56: 433-6.
- 6 Vigneswaran R. Infection and preterm birth: evidence of a common causal relationship with bronchopulmonary dysplasia and cerebral palsy. *J Paediatr Child Health* 2000; 36: 293-6.
- 7 Yoon BH, Romero R, Moon JB, Shim SS, Kim M, Kim G, et al. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185: 1130-6.
- 8 Aziz N, Cheng YW, Caughey AB. Neonatal outcomes in the setting of preterm premature rupture of membranes complicated by chorioamnionitis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009; 22: 780-4.
- 9 Botet F, Figueras J, Carbonell-Estrany X, Arca G, The Castrillo Study G. Effect of maternal clinical chorioamnionitis on neonatal morbidity in very-low birthweight infants: a case-control study. *J Perinat Med* 2010; 38: 269-73.
- 10 Oboro VO, Adekanle BA, Apantaku BD, Onadipe OA. Pre-term pre-labour rupture of membranes: effect of chorioamnionitis on overall neonatal outcome. *J Obstet Gynaecol* 2006; 26: 740-3.
- 11 Ramsey PS, Lieman JM, Brumfield CG, Carlo W. Chorioamnionitis increases neonatal morbidity in pregnancies complicated by preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 1162-6.
- 12 Shatrov JG, Birch SC, Lam LT, Quinlivan JA, McIntyre S, Mendz GL. Chorioamnionitis and cerebral palsy: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2010; 116: 387-92.
- 13 Hagberg H, Wennerholm UB, Savman K. Sequelae of chorioamnionitis. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15: 301-6.
- 14 Gibbs RS, Duff P. Progress in pathogenesis and management of clinical intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 1317-26.
- 15 Andrews WW, Goldenberg RL, Faye-Petersen O, Cliver S, Goepfert AR, Hauth JC. The Alabama Preterm Birth study: polymorphonuclear and mononuclear cell placental infiltrations, other markers of inflammation, and outcomes in 23- to 32-week preterm newborn infants. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 803-8.
- 16 Edwards RK. Chorioamnionitis and labor. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2005; 32: 287-96.
- 17 Silva MG, Peracoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Peracoli MT. Cervical Lactobacillus and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynaecol Obstet* 2003; 81: 175-82.
- 18 Polettini J, Peracoli JC, Candeias JM, Araujo Junior JP, Silva MG. Inflammatory cytokine mRNA detection by real time PCR in chorioamniotic membranes from pregnant women with preterm premature rupture of membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 144: 27-31.

- 19 Menon R, Peltier MR, Eckardt J, Fortunato SJ. Diversity in cytokine response to bacteria associated with preterm birth by fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201: 306 e1-6.
- 20 Herve R, Schmitz T, Evain-Brion D, Cabrol D, Leroy MJ, Mehats C. The PDE4 inhibitor rolipram prevents NF-kappaB binding activity and proinflammatory cytokine release in human chorionic cells. *J Immunol* 2008; 181: 2196-202.
- 21 Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci* 2009; 16: 206-15.
- 22 Polam S, Koons A, Anwar M, Shen-Schwarz S, Hegyi T. Effect of chorioamnionitis on neurodevelopmental outcome in preterm infants. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2005; 159: 1032-5.
- 23 Keenan WJ, Steichen JJ, Mahmood K, Altshuler G. Placental pathology compared with clinical outcome: a retrospective blind review. *Am J Dis Child* 1977; 131: 1224-7.
- 24 van Hoesen KH, Anyaegbunam A, Hochster H, Whitty JE, Distant J, Crawford C. Clinical significance of increasing histologic severity of acute inflammation in the fetal membranes and umbilical cord. *Pediatr Pathol Lab Med* 1996; 16: 731-44.
- 25 Yoon BH, Romero R, Yang SH, Jun JK, Kim IO, Choi JH, et al. Interleukin-6 concentrations in umbilical cord plasma are elevated in neonates with white matter lesions associated with periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 1433-40.
- 26 Park CW, Moon KC, Park JS, Jun JK, Romero R, Yoon BH. The involvement of human amnion in histologic chorioamnionitis is an indicator that a fetal and an intra-amniotic inflammatory response is more likely and severe: clinical implications. *Placenta* 2009; 30: 56-61.
- 27 Veleminsky M, Jr., Pradna J, Veleminsky M, Sr., Tosner J. Relationship of amniotic-type placenta inflammation to pPROM, PROM and risk of early onset neonatal sepsis. *Neuro Endocrinol Lett* 2008; 29: 447-50.
- 28 Prendergast M, May C, Broughton S, Pollina E, Milner AD, Rafferty GF, et al. Chorioamnionitis, lung function and bronchopulmonary dysplasia in prematurely born infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2011; 96: F270-4.
- 29 Amin SB, Wang H. Histologic chorioamnionitis and acute neurologic impairment in premature infants. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010; 23: 1165-71.
- 30 Yoon BH, Romero R, Kim CJ, Jun JK, Gomez R, Choi JH, et al. Amniotic fluid interleukin-6: a sensitive test for antenatal diagnosis of acute inflammatory lesions of preterm placenta and prediction of perinatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 960-70.
- 31 Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH, et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ* 2010; 88: 31-8.
- 32 Muglia LJ, Katz M. The enigma of spontaneous preterm birth. *N Engl J Med* 2010; 362: 529-35.
- 33 Suppiej A, Franzoi M, Vedovato S, Marucco A, Chiarelli S, Zanardo V. Neurodevelopmental outcome in preterm histological chorioamnionitis. *Early Hum Dev* 2009; 85: 187-9.
- 34 Getahun D, Strickland D, Zeiger RS, Fassett MJ, Chen W, Rhoads GG, et al. Effect of chorioamnionitis on early childhood asthma. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2010; 164: 187-92.
- 35 McElrath TF, Hecht JL, Dammann O, Boggess K, Onderdonk A, Markenson G, et al. Pregnancy disorders that lead to delivery before the 28th week of gestation: an epidemiologic approach to classification. *Am J Epidemiol* 2008; 168: 980-9.
- 36 Kim CJ, Romero R, Kusanovic JP, Yoo W, Dong Z, Topping V, et al. The frequency, clinical significance, and pathological features of chronic chorioamnionitis: a lesion associated with spontaneous preterm birth. *Mod Pathol* 2010; 23: 1000-11.

- 37 Hendson L, Russell L, Robertson CM, Liang Y, Chen Y, Abdalla A, et al. Neonatal and neurodevelopmental outcomes of very low birth weight infants with histologic chorioamnionitis. *J Pediatr*; 158: 397-402.
- 38 Mu SC, Lin CH, Chen YL, Ma HJ, Lee JS, Lin MI, et al. Impact on neonatal outcome and anthropometric growth in very low birth weight infants with histological chorioamnionitis. *J Formos Med Assoc* 2008; 107: 304-10.
- 39 Bailit JL, Gregory KD, Reddy UM, Gonzalez-Quintero VH, Hibbard JU, Ramirez MM, et al. Maternal and neonatal outcomes by labor onset type and gestational age. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202: 245 e1-245 e12.
- 40 Newman DE, Paamoni-Keren O, Press F, Wiznitzer A, Mazor M, Sheiner E. Neonatal outcome in preterm deliveries between 23 and 27 weeks' gestation with and without preterm premature rupture of membranes. *Arch Gynecol Obstet* 2009; 280: 7-11.
- 41 Elimian A, Verma U, Beneck D, Cipriano R, Visintainer P, Tejani N. Histologic chorioamnionitis, antenatal steroids, and perinatal outcomes. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 333-6.
- 42 Van Marter LJ, Dammann O, Allred EN, Leviton A, Pagano M, Moore M, et al. Chorioamnionitis, mechanical ventilation, and postnatal sepsis as modulators of chronic lung disease in preterm infants. *J Pediatr* 2002; 140: 171-6.
- 43 Dempsey E, Chen MF, Kokottis T, Vallerand D, Usher R. Outcome of neonates less than 30 weeks gestation with histologic chorioamnionitis. *Am J Perinatol* 2005; 22: 155-9.
- 44 Thomas W, Speer CP. Chorioamnionitis: important risk factor or innocent bystander for neonatal outcome? *Neonatology*; 99: 177-87.
- 45 Lahra MM, Beeby PJ, Jeffery HE. Maternal versus fetal inflammation and respiratory distress syndrome: a 10-year hospital cohort study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2009; 94: F13-6.
- 46 Chaiworapongsa T, Hong JS, Hull WM, Kim CJ, Gomez R, Mazor M, et al. The concentration of surfactant protein-A in amniotic fluid decreases in spontaneous human parturition at term. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008; 21: 652-9.
- 47 Zanardo V, Vedovato S, Cosmi E, Litta P, Cavallin F, Trevisanuto D, et al. Preterm premature rupture of membranes, chorioamnion inflammatory scores and neonatal respiratory outcome. *BJOG* 2010; 117: 94-8.
- 48 Been JV, Rours IG, Kornelisse RF, Lima Passos V, Kramer BW, Schneider TA, et al. Histologic chorioamnionitis, fetal involvement, and antenatal steroids: effects on neonatal outcome in preterm infants. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201: 587 e1-8.
- 49 Lee J, Oh KJ, Yang HJ, Park JS, Romero R, Yoon BH. The importance of intra-amniotic inflammation in the subsequent development of atypical chronic lung disease. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009; 22: 917-23.
- 50 Lahra MM, Beeby PJ, Jeffery HE. Intrauterine inflammation, neonatal sepsis, and chronic lung disease: a 13-year hospital cohort study. *Pediatrics* 2009; 123: 1314-9.
- 51 Wang ML, Dorer DJ, Fleming MP, Catlin EA. Clinical outcomes of near-term infants. *Pediatrics* 2004; 114: 372-6.
- 52 Holzman C, Lin X, Senagore P, Chung H. Histologic chorioamnionitis and preterm delivery. *Am J Epidemiol* 2007; 166: 786-94.
- 53 Salafia CM, Misra D, Miles JN. Methodologic issues in the study of the relationship between histologic indicators of intraamniotic infection and clinical outcomes. *Placenta* 2009; 30: 988-93.

Tabela 1. Características maternas e obstétricas das gestantes com e sem corioamnionite histológica.

Características	Corioamnionite - (n=188)	Corioamnionite + (n=96)	P
<i>Características maternas</i>			
Idade (anos)*	23 (18-28)	25 (20-30)	0,03
Etnia**			
Branca	157 (83,5)	75 (78,1)	0,26
Não branca	31 (16,5)	21 (21,9)	
Hábito tabagista**			
Sim	23 (12,2)	18 (18,8)	0,22
Não	67 (35,6)	27 (28,1)	
NA	98 (52,2)	51 (53,1)	
Paridade**			
Primigesta	77 (40,9)	49 (51,0)	0,13
Multigesta	111 (59,1)	47 (49,0)	
<i>Características Obstétricas</i>			
Tipo de parto**			
Cesárea	91 (48,4)	34 (35,4)	0,05
Vaginal	97 (52,6)	62 (64,6)	
Idade gestacional no parto (semanas, dias)*	33s2d (31s-34s5d)	31s5d (28s4d-33s2d)	<0,0001
Corioamnionite clínica**	9 (4,8)	6 (6,2)	0,84
RPM-PT**	75 (39,9)	50 (52,1)	0,05
Infecção genital materna**	14 (7,4)	12 (12,5)	0,16
Comorbidades materna**	74 (39,4)	20 (20,8)	0,001
Resultados adversos em gestações anteriores**			
RPM-PT	13/158	1/158	0,06
Aborto	39/158	20/158	0,18
TPP	24/158	16/158	0,09

* Mediana (25-75); Teste Mann Whitney.

** n(%); Teste X² ou Teste Exato de Fisher

NA: não avaliado, RPM-PT: rotura prematura de membranas pré-termo; TPP: trabalho de parto pré-termo

Tabela 2. Características do parto e repercussões neonatais das gestações com e sem corioamnionite histológica.

Características	Corioamnionite - (n=188)	Corioamnionite + (n=96)	p
<i>Características neonatais</i>			
Sexo do RN**			
Feminino	79 (42)	39 (40,6)	0,9
Masculino	109 (58)	57 (59,4)	
Peso RN (g)^Y	1868,0 ± 627,2	1660 ± 630,3	0,01
Apgar, 1 min*	6 (3-8)	6 (1-8)	0,27
Apgar, 5 min*	9 (7-9)	8 (5-9)	0,04
Apgar, 10 min*	9 (8-10)	9 (7-10)	0,32
<i>Repercussões neonatais**</i>			
Hemorragia peri-intra ventricular (graus III e IV)	5 (2,6)	8 (8,3)	0,03
Síndrome do desconforto respiratório	36 (19,1)	18 (18,7)	0,90
Ventilação mecânica	43 (22,8)	33 (34,3)	0,03
Displasia broncopulmonar	11 (5,8)	9 (9,3)	0,27
Hemocultura positiva	20 (10,6)	13 (13,5)	0,47
Convulsão	14 (7,4)	9 (9,3)	0,58
Enterocolite necrotizante	4 (2,1)	2 (2,0)	0,98
Perfuração intestinal	1 (0,5)	0	0,47
Retinopatia da prematuridade	2 (1,0)	1 (1,0)	0,97
Meningite	4 (2,1)	7 (7,3)	0,03
Pneumonia	33 (17,5)	30 (31,2)	0,007
Hipertensão pulmonar persistente	0	1 (1,0)	0,16
Persistência do canal arterial	31 (16,5)	24 (25,0)	0,08
Hiperbilirrubinemia	110 (58,5)	55 (57,3)	0,80
Taquipnéia transitória do RN	1 (0,5)	2 (2,0)	0,22
Distúrbios metabólicos	40 (21,2)	27 (28,1)	0,19
Morte neonatal (<28 dias)	18 (9,6)	17 (17,7)	0,05

RN: recém-nascido

* Mediana (25-75); Teste Mann Whitney

** n(%); Teste X² ou Teste Exato de Fisher^Y media ± d.p. (Teste t)

Tabela 3. Repercussões neonatais das gestações com e sem corioamnionite histológica, ajustado para a presença de comorbidades maternas.

	Variável	Estimativa	EP	p	OR (IC 95%)
Hemorragia peri-intraventricular	Corioamnionite +	0,5768	0,2975	0,0526	3,169 (0,987 - 10,174)
	Comorbidade materna +	-0,1411	0,3433	0,6811	0,754 (0,196 - 2,897)
Ventilação Mecânica	Corioamnionite +	0,2703	0,1406	0,5460	1,717 (0,989 - 2,979)
	Comorbidade materna +	-0,0793	0,1494	0,5956	0,853 (0,475 - 1,533)
Meningite	Corioamnionite +	0,5965	0,3248	0,0663	3,297 (0,923 - 11,780)
	Comorbidade materna +	-0,2908	0,4036	0,4712	0,559 (0,115 - 2,720)
Pneumonia	Corioamnionite +	0,3770	0,1489	0,0113	2,125 (1,186 - 3,810)
	Comorbidade materna +	-0,0121	0,1593	0,9393	0,976 (0,523 - 1,822)

EP: erro padrão, OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; Comorbidades maternas: presença de pré-eclâmpsia, diabetes gestacional, incompetência istmo-cervical, disfunções tireoidianas ou hipertensão arterial gestacional

Tabela 4. Repercussões neonatais das gestações com e sem corioamnionite histológica, considerando a presença ou ausência de comorbidades maternas.

	Ausência de Comorbidade Materna (n=190)		p	Presença de Comorbidades Materna (n=94)		p
	CA-	CA+		CA-	CA+	
Hemorragia peri-intraventricular	180 (94,7)	10 (5,3)	0,20	91 (96,8)	3 (3,2)	0,11
Ventilação Mecânica	136 (71,6)	54 (28,4)	0,02	72 (76,6)	22 (23,4)	0,77
Meningite	181 (95,3)	9 (4,7)	0,15	92 (97,9)	2 (2,1)	0,38
Pneumonia	146 (76,8)	44 (23,2)	0,01	75 (79,8)	19 (20,2)	0,06

n(%); Teste X² ou Teste Exato de Fisher

CA: presença de corioamnionite histológica; Comorbidades maternas: presença de pré-eclâmpsia, diabetes gestacional, incompetência istmo-cervical, disfunções tireoidianas ou hipertensão arterial gestacional


Conclusões

Conclusões


Considerando o tamanho amostral em cada estudo e as metodologias empregadas, podemos concluir que as membranas corioamnióticas são fontes de RNAm de β defensinas e de IL-18, e de proIL-18, e as expressões desses mediadores não está relacionada à presença de corioamnionite histológica nos casos de RPM-PT. Os dados do presente estudo ainda nos permitem concluir que a corioamnionite histológica está associada a repercussões neonatais adversas.


Anexos

Anexos

 **Universidade Estadual Paulista**
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 16.618-970
Fone/Fax: (Doc14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsardeni@fmb.unesp.br



 Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 06 de abril de 2009. Of. 123/09-CEP

Ilustríssima Senhora
Prof^ª Dr^ª Márcia Guimarães da Silva
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu.


Prezada Dr^ª Márcia,


De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa, (Protocolo 3161-2009-CEP) "Expressão de β defensinas em membranas corioamnióticas de gestantes pré termo complicadas por corioamnionite", a ser conduzido por Juliana Takitane, orientada por Vossa Senhoria, com a participação dos Profs. Drs. Vera Lúcia Moraes Rall, José Carlos Peraçoli e da doutoranda Jossimara Palettini, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 06/04/2009.

Recomendação: O CEP recomenda que em trabalhos posteriores seja prevista o uso de material em outros trabalhos científicos.

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

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.

unesp  **Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu**

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-8143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenação: tsarden@fmb.unesp.br



Registro no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1987



Botucatu, 01 de setembro de 2008

Of. 353/08-CEP

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


Prezada Drª Márcia,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Análise da expressão de IL-18 em gestantes complicadas por rotura prematura de membranas pré-termo", que será conduzido por Mariana Perlati dos Santos, orientada por Vossa Senhoria, com a colaboração da Drª Jossimara Polettini e do Prof. Dr. José Carlos Peraçoli recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 01/09/2008.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Apresentar Relatório Final de Atividades ao final da execução deste projeto.

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.

unesp  Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 16.618-070
Fone/Fax: (0xx14) 3811-8143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997



Botucatu, 02 de maio de 2011.

Of. 179/11-CEP

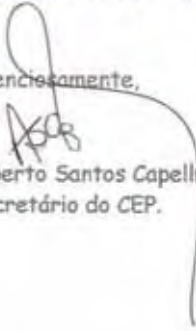
Ilustríssima Senhora
Prof^ª. Dr^ª. Márcia Guimarães Silva
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu.

Cara Dr^ª Márcia,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 3862-2011) "**Resultados adversos de gestações complicadas por corioamnionite histológica**", a ser conduzido por Jossimara Polettini, orientada por Vossa Senhoria, com a colaboração de Bruna Ribeiro de Andrade Ramos, Graziela Galvão Gonçalves, Larissa Doddi Marcolino, Leonardo Parizzi Lealdini, Laura Fernandes Martins, Natália Prearo Moço, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 02 de maio de 2.011.

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

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.