



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

LAURA FERNANDES MARTIN

Inflamação, estresse oxidativo e atividade antioxidante em membranas fetais de gestações complicadas por parto pré-termo espontâneo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Botucatu
2018

LAURA FERNANDES MARTIN

Inflamação, estresse oxidativo e atividade antioxidante em membranas fetais de gestações complicadas por parto pré-termo espontâneo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Profa.Dra. Márcia Guimarães da Silva

Botucatu
2018

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

Martin, Laura Fernandes.

Inflamação, estresse oxidativo e atividade antioxidante em membranas fetais de gestações complicadas por parto pré-termo espontâneo / Laura Fernandes Martin. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Márcia Guimarães da Silva

Capes: 40105008

1. Trabalho de parto prematuro. 2. Corioamnionite. 3. Membranas fetais - Inflamação. 4. Stress oxidativo. 5. Antioxidantes. 6. Gravidez - Complicações.

Palavras-chave: capacidade antioxidante; corioamnionite histológica; estresse oxidativo; inflamação; parto pré-termo.

“Deus marcou o tempo certo para cada coisa.”

Eclesiastes 3:11

Agradecimientos

*À minha orientadora Profa Dra Márcia Guimarães da Silva
pelos ensinamentos, incentivos e pela confiança durante todos
esses anos, muito obrigada por fazer parte disso tudo.*

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina."

Cora Coralina

Agradeço A Deus por iluminar meu caminho e me inspirar sempre a buscar Seus propósitos.

Agradeço aos meus pais Mara e Rodney por todo apoio, incentivo e amor incondicional. Essa é só mais uma das muitas conquistas que serão dedicadas a vocês.

Ao Mario por estar sempre ao meu lado e me apoiar em cada uma das minhas decisões sempre.

À minha irmã e meu cunhado por tudo que vocês representam na minha vida.

Com um carinho muito especial agradeço aos meus colegas do Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-fetal.

Agradeço aos docentes, residentes e funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Agradeço também aos médicos, enfermeiras e funcionários do Hospital Universitário Lauro Wanderley e da Maternidade Cândida Vargas de João Pessoa, especialmente ao Doutor Moisés Lima por toda ajuda durante essa jornada.

A special thanks to Dr. Ramkumar Menon, the researches and staff of his laboratory for the amazing experience that I had in University of Texas Medical Branch.

Tenho o imenso prazer de agradecer a todas as gestantes que fizeram parte desse estudo.

E a todos aqueles não citados, mas que de alguma forma, tornaram possível a realização desse trabalho.

Resumo

INTRODUÇÃO: O parto pré-termo é definido como o nascimento ocorrido anteriormente a 37ª semana de gestação completa, podendo ser induzido ou espontâneo. A etiologia do parto pré-termo é multifatorial e inclui fatores de riscos maternos, paternos e genéticos. Apesar dessa multifatorialidade, estudos demonstram que a infecção intra-amniótica acomete de 25% a 40% das gestações pré-termo, com chance dessa porcentagem ser subestimada devido a ausência de sinais clínicos e sintomas de infecção na maioria dos casos. À microscopia, a evidência de infiltrado inflamatório polimorfonuclear nas membranas corioamnióticas caracteriza a corioamnionite histológica e sustenta a infecção intra-amniótica como uma das causas importantes do parto pré-termo. O principal mecanismo pelo qual a infecção intra-amniótica é causa direta de parto pré-termo é a indução de síntese de prostaglandinas, pela via da ciclooxigenase, responsável pelo início das contrações uterinas. Estudos recentes sugerem que uma quantidade substancial dos partos pré-termo estão associados a inflamação estéril na ausência de infecção intra-amniótica ou corioamnionite histológica, indicando uma fisiopatologia alternativa que pode levar a um processo inflamatório. O dano causado por estresse oxidativo e a inflamação induzida pelo estresse oxidativo foram também considerados importantes desencadeadores de resultados obstétricos adversos. Compreender a relação entre estresse oxidativo e mecanismos inflamatórios como componentes inseparáveis é extremamente relevante, uma vez que essa interação é capaz de desencadear o parto pré-termo na presença ou não de Rotura Prematura de Membranas. **OBJETIVO:** Avaliar o dano oxidativo às proteínas, a capacidade antioxidante, os níveis de IL-1 β e IL-6 considerando o *status* de corioamnionite histológica em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por Parto Pré-Termo e Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Trata-se de um estudo de corte transversal, composto por 84 gestantes atendidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal de João Pessoa (UFPB), no período de Setembro de 2013 a Maio de 2015. Foram incluídas nesse estudo, 27 gestantes com Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo (RPM-PT), 27 gestantes com Parto Pré-Termo e membranas íntegras (PP) e 30 gestantes em trabalho de parto a termo. No momento da resolução da gestação, logo após a dequitação, foram retirados fragmentos das membranas corioamnióticas e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80^o C até o momento do processamento. Outros fragmentos das membranas corioamnióticas foram fixados em formalina a 10%, emblocados em parafina e submetidas à análise histopatológica para avaliação da presença de corioamnionite histológica. Gestantes com doenças crônicas como hipertensão arterial, nefropatia, colagenoses, diabetes mellitus, assim como aquelas portadoras de diabetes mellitus gestacional, pré-eclâmpsia, incompetência istmocervical, descolamento prematuro da placenta, placenta prévia, oligoâmnio, polidrâmio,

má formação congênita, HIV e óbito intrauterino não foram admitidas no estudo. O dano oxidativo foi mensurado pela análise dos níveis de 3-nitrotirosina (3-NT) e carbonil, através de ensaio enzimático (ELISA) e ensaio dinitrofenil-hidrazina modificado (DNPH), respectivamente. Os níveis da capacidade antioxidante total (TAC), IL-1 β e IL-6 foram dosados por ELISA. Os níveis de 3-NT, carbonil e TAC foram comparados entre PP, RPM-PT e termo empregando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e entre a presença e ausência de corioamnionite histológica pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. O *software* utilizado foi SigmaStat 3.1. A correlação de variáveis foi avaliada utilizando um modelo exploratório multivariante de análise de correspondência múltipla. As análises foram realizadas utilizando o *software IBM SPSS 24* e o nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de $p \leq 0,05$. **RESULTADOS:**

ARTIGO I: O dano oxidativo proteico determinado pelos níveis de carbonil foi menor no grupo PP (64.2; 51.8 - 102.6) do que nos grupos RPM-PT (137.0; 98.1 - 214.3) e termo (114.9; 92.1 - 142.5) ($p < 0,001$). O grupo TPP apresentou maior TAC (0.16; 0.09 - 0.23) em comparação com os grupos RPM-PT (0.01; 0.001 - 0.12) e termo (0.05; 0.001 - 0.14) ($p = 0,002$). Corioamnionite histológica esteve presente em 22,2% das membranas do grupo PP, 51,8% no grupo PPRM e 13,3% no grupo termo. Considerando a estratificação da intensidade do infiltrado inflamatório, 66% dos casos de corioamnionite moderada/intensa foi observado no grupo PP enquanto que no grupo RPM-PT foi de 21,0% e no grupo termo de 25%. A corioamnionite histológica não alterou os níveis do dano oxidativo proteico ou TAC, independentemente do resultado gestacional ($p < 0,05$).

ARTIGO II: A distância espacial observada entre os casos de PP, RPM-PT e termo dimensiona as peculiaridades de cada desfecho gestacional. Observou-se forte correlação entre corioamnionite histológica e os níveis elevados de IL-1 β e IL-6 independente do desfecho gestacional. Ao grupo PP esteve associado os valores mais elevados de TAC enquanto que ao grupo RPM-PT, os maiores valores de carbonil. A maior proximidade espacial entre os níveis mais elevados de carbonil observados entre os grupos RPM-PT e termo reflete importante participação dos mecanismos oxidativos nesses resultados gestacionais comparado ao PP.

CONCLUSÕES: Considerando o tamanho amostral incluído nesse estudo bem como as metodologias empregadas para atingir os objetivos propostos, podemos concluir o estresse oxidativo aumentado e capacidade oxidativa total reduzida são similares nas membranas corioamnióticas de gestações complicadas por RPM-PT e termo, reforçando a acelerada senescência nos casos de RPM-PT. Nesse mesmo cenário, a corioamnionite histológica não modula a resposta oxidativa e embora resultados gestacionais adversos que culminam em parto pré-termo espontâneo apresentem etiologias e mecanismos sobrepostos sugere-se que o PP e RPM-PT possuam assinatura inflamatória e oxidativa singular.

PALAVRAS-CHAVE: Parto pré-termo, corioamnionite histológica, inflamação, estresse oxidativo, capacidade antioxidante.

SUMÁRIO

Capítulo I

1. Revisão da Literatura	13
1.1. <i>Membranas corioamnióticas: desenvolvimento, estruturas e função fisiológica</i>	14
1.2. <i>Prematuridade</i>	21
1.3. <i>Senescência prematura</i>	24
1.4. <i>Estresse oxidativo e atividade antioxidante na gestação</i>	25
2. Referências Bibliográficas	28

Capítulo II

3. Artigo Científico I “Histologic chorioamnionitis does not modulate the oxidative stress and antioxidant status in pregnancies complicated by spontaneous preterm delivery”	37
4. Artigo Científico II “Interaction between inflammation and oxidative stress in amniochorion membranes of pregnancies complicated by spontaneous preterm delivery and histologic chorioamnionitis”	46
5. Conclusões	61

Capítulo 1
Revisão da Literatura

INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NAS MEMBRANAS FETAIS

MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS: DESENVOLVIMENTO, ESTRUTURAS E FUNÇÃO FISIOLÓGICA

A fertilização humana começa quando o gameta ou espermatozóide masculino se funde com o gameta ou oócito feminino, gerando uma agregação cromossômica única e diploide, o zigoto. As divisões mitóticas de um zigoto resultam em aumento do número de células embrionárias, denominadas blastômeros, que se tornam menores a cada novo ciclo de divisão celular. Após divisões subsequentes, os blastômeros mudam sua forma e agrupam-se uns com os outros formando a mórula. Quando a mórula alcança o útero, surge em seu interior um espaço preenchido por fluido, conhecido como cavidade blastocística. O aumento da quantidade de fluido separa os blastômeros em duas partes, uma camada externa, o *trofoblasto*, que formará a parte embrionária da placenta e um grupo de blastômeros localizados centralmente, o *embrioblasto*, que dará origem ao embrião. Durante o processo de desenvolvimento, a mórula passa a se chamar blastocisto, o qual permanece livre e suspenso na secreção mucoide uterina por cerca de dois dias (1). Durante o estágio do blastocisto, o comprimento do telômero, estrutura de DNA responsável pela idade biológica da célula é máximo, e a telomerase, enzima que mantém o comprimento do telômero, apresenta seu pico de atividade, definindo a idade biológica de todas as células derivadas do feto (2).

A implantação dos blastocistos no endométrio uterino coincide com o desenvolvimento de um pequeno espaço no embrioblasto que irá formar a cavidade amniótica. As alterações morfológicas no embrião resultam na formação do disco embrionário, uma placa bilaminar formada por duas camadas denominadas *epiblasto*, que constitui o piso da cavidade amniótica e *hipoblasto*, que juntamente com a membrana exocelômica forma o saco vitelino primitivo (3).

Após a degeneração da zona pelúcida que envolvia o blastocisto em sua fase livre, as células do trofoblasto começam a aderir e invadir o epitélio endometrial, diferenciando-se em duas camadas, uma interna, o *citotrofoblasto* e outra externa, o *sinciciotrofoblasto*. As cavidades isoladas ou as lacunas que ocorrem no sinciciotrofoblasto são preenchidas com uma mistura de sangue materno e detritos celulares. Os nutrientes do oxigênio e do sangue materno presentes nessas lacunas estão disponíveis para o desenvolvimento embrionário (Fig. 1A). A placenta, órgão quimérico constituído por uma porção materna derivada do endométrio e uma porção fetal originária do saco coriônico (4), é responsável pelo suporte nutricional, tolerância imunológica e recebimento e produção de hormônios regulatórios (progesterona, estrogênio,

hormônio liberador de corticotropina (CRH), gonadotrofina coriônica humana (hCG), etc.) (5) que são vitais para a manutenção da gravidez. Os vasos sanguíneos presentes na placenta permitem a entrada e saída do sangue materno, estabelecendo a circulação uteroplacentária. A circulação sanguínea materna está ligada ao feto em crescimento através do cordão umbilical que é formado por duas artérias e uma veia envolvidas por tecido mucoide denominado geléia de Wharton, sendo totalmente revestido pelo âmnio funicular (3) (Fig. 1B). Conectadas ao lado fetal da placenta estão as membranas fetais, também chamadas de membranas corioamnióticas, as quais cercam e alinham a cavidade intra-uterina (Fig. 1C).

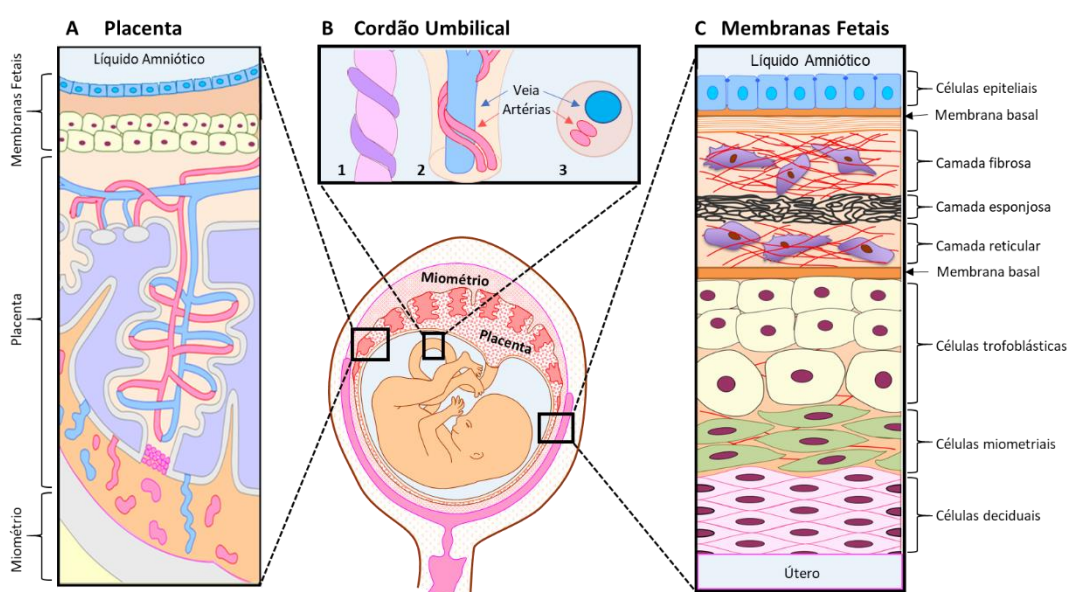


Figura 1. Representação da cavidade intra-uterina: cavidade materna, útero/miométrio, placenta, membranas fetais, líquido amniótico e feto. **A:** Estruturas da placenta, local de nutrientes e troca de oxigênio para o feto em crescimento. **B:** Estruturas do cordão umbilical, visão externa (1), visão interna (2) e secção transversal (3). **C:** Estrutura das membranas corioamnióticas, evidenciando as camadas que compõe o âmnio e o cório. Adaptado de *Characteristics, Properties, and Functionality of Fetal Membranes: An Overlooked Area in the Field of Parturition*. L. Martin; L. Richardson; R. Menon. Submitted to publication in *Encyclopedia of Reproduction*.

As membranas corioamnióticas são uma estrutura multiestratificada de grande importância para o desenvolvimento gestacional. Elas apresentam papel fundamental na manutenção do volume do líquido amniótico, na acomodação e proteção do feto contra traumas e na proteção dos vasos do cordão umbilical contra compressão, além de atuarem como barreira contra infecções vindas do trato genital inferior (6). O desenvolvimento do âmnio e do cório começa com a embriogênese, embora não participem diretamente na formação do embrião. Como o feto, o crescimento do âmnio e cório é rápido e independente um do outro. A

formação de amniocório, como estrutura unitária, é concluída entre as 13^a e 15^a semanas de gestação (7). O crescimento e o desenvolvimento das membranas correlacionam-se com o crescimento fetal. O comprimento do telômero das células que compõem as membranas fetais bem como das vilosidades coriônicas (dessas estruturas intra-uterinas derivadas do feto) diminui de aproximadamente 18 kb na 22^a semana de gestação para aproximadamente 7 kb na 41^a semana de gestação, sugerindo que todos os componentes celulares da cavidade intra-uterina envelhecem ao longo da gestação (8).

Histologicamente, as membranas corioamnióticas são constituídas de diferentes camadas celulares e por componentes da matriz extracelular (MEC). Cada componente dessa complexa estrutura desempenha papel importante no metabolismo das membranas, assim como na integridade e resistência das mesmas. As membranas corioamnióticas são uma fonte de vários marcadores bioquímicos, sendo que muitos deles são constitutivamente produzido enquanto que outros, indutíveis. A resposta imune fetal imita frequentemente a que se observa no fluido amniótico (9). Muitos desses fatores biologicamente ativos estão envolvidos na regeneração, remodelação tecidual, resposta imune, reações inflamatórias e outros mecanismos, conforme observado na Tabela 1.

Tabela 1. Marcadores bioquímicos produzidos pelas membrans corioamnióticas e suas principais funções. Adaptado de Menon R, Nicolau NN, Bredson S, Polettini J. *Fetal membranes: Potential source of preterm birth biomarkers.* In: *General Methods in Biomarker Research and their Applications.* 2015. p. 483–529 (11).

Marcador	Função
Proteína ativadora AP-1 Indutor de MMPs Metaloproteínaes (MMPs) Inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP) p38 MAPK	Degradação da MEC
Colagenase	Enzima degradadora de colágeno
Integrina α	Matriz extracelular
Fibronectina	Plasma e matriz extracelular
Colágeno Ácido hialuronico	Maturação das membranas fetais
Fator de crescimento similar a insulina (IGF) Fator estimulante de colônias-1 (CSF-1) Factor de crescimento epidérmico (EGF) Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	Crescimento celular
Claudina Ocludina Vimentina	Junção celular
Ácido araquidônico Antígeno leucocitário humano (HLA) classe I	Componente da membrana celular
p53	Regulação do ciclo celular
p65	Inibidor do NF- κ B
B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)	Regulador apoptótico
Aquaporina	Regulador osmótico
Proteína de choque térmico 70 Ciclo-oxigenase (COX) Progesterona	Inibidor apoptótico Metabolismo do ácido araquidônico

Óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS)	Contatidade uterina
Prostaglandina	Indutor de trabalho de parto
Ocitocina	
Caspase-3, -8 e -9	Função na apoptose, necrose e inflamação
CXCL10	
CXCL11	
CXCL8	Quimioatrativos das células imunes
CXCL9	
Receptores Toll-like	
Prolactina	Resposta imune
Proteínas do sistema complemento	
Leptina	
ICAM-1 e 2	Reações inflamatórias
IL-1, 6, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 18, 19, 20, 24, 29	
IFN- α	
IFN- γ	Mediadores inflamatório
TNF- α	
HBD-1, 2, 3 e 4	Peptídeo anti-microbiano
Catalase	Antioxidantes
Glutathiona redutase (GSR) e peroxidase (GPx)	
8-isoprostano	Marcador de peroxidação lipídica
F2-isoprostano	Marcador de estresse oxidativo
Fator de liberação de corticotropina (CRF)	
Hormônio de liberação de corticotropina (CRH)	Resposta ao estresse
Receptor de cortisol	
NADPH oxidase	Geração de superóxido
Óxido nítrico (NO)	
Superoxido dismutação	Metabolismo do óxido nítrico
Telomerase	Senescência

Os fatores de crescimento promovem proliferação, migração, diferenciação e re-epitelização das membranas corioamnióticas durante a gestação. Especificamente, o fator de crescimento epidérmico estimula a proliferação de queratinócitos e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) inibe a degradação da MEC ao aumentar a produção de colágeno, suprimindo a expressão de metaloproteinases e estimulando seus inibidores (10). É fundamental que esses processos permaneçam em homeostase durante a gestação para favorecer as mudanças associadas à gestação especificamente o crescimento fetal e o aumento do volume do líquido amniótico.

A camada celular mais interna é o âmnio, de origem ectodérmica, o qual é constituído por monocamada de células epiteliais cubóides e camada de tecido conectivo rico em colágeno, intercalada por células mesenquimais (11). Os principais colágenos encontrados no âmnio são os colágenos tipo III, IV e V da membrana basal; colágenos tipo I, III, IV e VI da camada compacta; colágenos tipo I, III e VI da camada de fibroblastos e colágenos tipo I, III e IV da camada intermediária (esponjosa) (6).

O cório, camada mais externa das membranas fetais, é constituído pelas camadas celular e reticular e pela membrana basal (12). Os principais colágenos encontrados no cório são os colágenos tipos I, II, III, IV, V e VI da camada reticular e o colágeno tipo IV da membrana basal

(6). O cório é composto por múltiplas camadas de células de citotrofoblasto e um estroma que se funde com o âmnio na membrana fetal madura. Essas células contêm marcadores de células-tronco, *cluster* de diferenciação (CD) CD34 e CD45, reforçando o potencial hematopoiético do cório. A membrana coriônica é fonte de uma diversidade maior de mediadores da resposta imune do que o âmnio (13), além de apresentar maior efeito antibacteriano (14). Segundo Zarebidaki et al. (14), ao estimularem separadamente o âmnio e o cório com 7 diferentes espécies bacterianas (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*) e um probiótico (*Lactobacillus plantarum*) o número de zonas de inibição do crescimento bacteriano foi maior na membrana coriônica comparado à membrana amniótica.

No decorrer da gestação, durante o crescimento e a remodelação das membranas corioamnióticas, a perda temporária de células e colágenos são inevitáveis. Recentemente, a análise microscópica tridimensional de membranas corioamnióticas revelou locais de remodelação tecidual que foram definidos como microfraturas. As microfraturas são caracterizadas por dobras de células amnióticas, degradação da membrana basal e a presença de túneis que se estendem à matriz de colágeno com células migratórias. Esses locais são remodelados por novas células e colágeno durante a gestação normal, mas em condições patológicas, a persistência de microfraturas e a falta de remodelação podem funcionar como canais para o extravazamento de líquido amniótico (Fig. 2) (15).

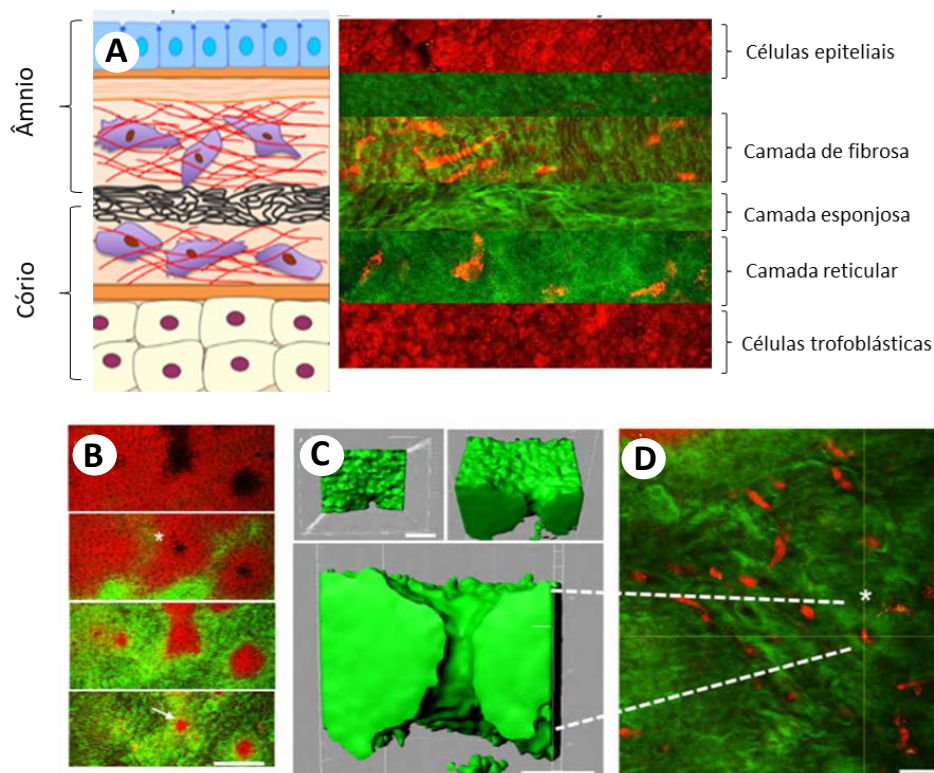


Figura 2. Caracterização das microfissuras através de microscopia óptica não linear **A:** comparação de uma ilustração das membranas corioamnióticas com a caracterização das camadas presentes nas membranas corioamnióticas através de microscopia de autofluorescência multiphoton (vermelho) e microscopia de geração de segundo harmônico (verde). **B:** imagem multiphoton da degradação (flecha branca) e área morfologicamente alterada do âmnio (branco *). **C:** reconstrução 3D de um túnel degradado de colágeno. **D:** imagem multiphoton da superfície da membrana basal degradada com a presença de vários túneis. Adaptado de Richardson LS, Vargas G, Brown T, Ochoa L, Sheller-Miller S, Saade GR, et al. *Discovery and Characterization of Human Amniochorionic Membrane Microfractures. Am J Pathol.* 2017 (17)

As membranas corioamnióticas, por apresentarem função de barreira imunológica, são de extrema importância durante o progresso gestacional e não menos importante no momento da resolução da gestação. Aliada ao início de contrações uterinas que aumentam de frequência e amplitude com o decorrer do parto e ao encurtamento do corpo uterino devido às contrações e apagamento e dilatação progressiva da cérvix e do colo uterino, evidencia-se o enfraquecimento e a rotura das membranas corioamnióticas na região que se sobrepõe à cérvix, proporcionando a expulsão do feto e da placenta para o exterior (3,16).

Durante o trabalho de parto e o esvaziamento cervical, ocorre o influxo de leucócitos, principalmente neutrófilos e macrófagos, para a cérvix, miométrio e membranas corioamnióticas. Na cérvix, ocorrem mudanças imunológicas, como a diminuição dos níveis de progesterona, causando a inibição de sinais como a trombina, Fator de Transformação do Crescimento (TGF)- β e Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF), o que poderia enfraquecer a integridade das membranas fetais (5). Este mecanismo único

mediado por receptores e ligantes destaca o papel crítico da progesterona na homeostasia da matriz extracelular durante a gestação. No entanto, o mecanismo preciso da sinalização mediada pela progesterona e seu receptor de membrana (PGRMC) ainda não é totalmente conhecido.

Uma diminuição no PGRMC durante o trabalho de parto pode contribuir para a retirada funcional da ação da progesterona e mudar o equilíbrio para um estado de inflamação. As citocinas inflamatórias podem levar ao esvaecimento cervical de diversas formas, como por exemplo, o fato de Interleucina (IL) 1 β e Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α aumentarem a produção de metaloproteinases de matriz (MMPs) tais como MMP-1, MMP-3 e MMP-9. Além disso, IL-1 β regula a diminuição da expressão de inibidores de MMPs (17) e atua em diversos tipos celulares, aumentando a produção de ciclooxigenase-2 (COX-2) e prostaglandina E₂ (PGE₂), mediador químico mais eficaz para contratilidade miometrial e dilatação cervical (18).

Conforme já mencionado, as membranas fetais sofrem um envelhecimento dependente do encurtamento dos telômeros que coincide com o crescimento e maturação fetais. O envelhecimento é mecanicamente mediado pela senescência molecular e celular. À medida que envelhecem com o final da gestação, as membranas corioamnióticas tornam-se capazes de iniciar a sinalização do parto, desempenhando um papel crítico na coordenação do trabalho de parto, com a ajuda de sinais de maturação dos órgãos fetais. Estes sinais incluem liberação de endotelina, fatores de crescimento e quimiocinas, capazes de aumentar a inflamação e o estresse oxidativo nos tecidos uterinos, acelerando ainda mais o processo de envelhecimento das membranas (19).

A senescência é um mecanismo de envelhecimento tecidual que pode contribuir para mudanças morfológicas e moleculares nas membranas corioamnióticas. As células epiteliais amnióticas quando tratadas com extrato da fumaça do cigarro, um indutor de estresse oxidativo, levam a ativação de p38MAPK (20). A ativação da p38MAPK causa senescência nas membranas fetais, bem como produz um fenótipo secretor associado à senescência (SASPs) caracterizado pela produção diferencial de vários compostos naturais. Esses compostos incluem citocinas, quimiocinas, fatores angiogênicos, fatores de crescimento, moléculas de adesão celular, indutores apoptóticos e marcadores pró-inflamatórios responsáveis pela criação de um ambiente de inflamação estéril nas membranas fetais. Os mais notáveis SASPs presentes no líquido amniótico de gestantes em trabalho de parto são: (IL)-1 α e IL-1 β , (21–24), IL-6 (25,26), IL-8 (27), TNF- α (28) e MMPs (29).

Além disso, as membranas senescentes também causam a liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) oriundos dos tecidos envelhecidos e oxidativamente danificados (30,31). SASP e DAMPs liberados pelas membranas fetais são capazes de

desencadear o parto, uma vez que propagam seus sinais inflamatórios através de dois métodos diferentes; a propagação pode ocorrer por difusão através de microfaturas ou através de exossomos liberados a partir de células das membranas corioamnióticas (32,33). Menon et al. (32) demonstraram que as condições laboratoriais *in vitro* que imitam o trabalho de parto a termo causam o aumento do aparecimento de microfaturas maiores e mais profundas nas membranas fetais, sugerindo sua relevância na propagação dos sinais de parto. Os exossomos, anteriormente descritos como mecanismo de eliminação de moléculas excedentes do citoplasma (Trams), emergem como mecanismo finamente regulado de comunicação intercelular. São pequenas vesículas com diâmetro que varia entre 30 e 150 nm, os quais apresentam papel fundamental na comunicação intercelular e são capazes de inibir ou estimular o sistema imunológico. Exossomos de células das membranas corioamnióticas estressadas oxidativamente carregam formas ativas de p38MAPK, SASP e DAMPs (33). O objetivo principal desses sinais é aumentar a intensidade da resposta inflamatória materna, uma condição considerada como ativadora do trabalho de parto.

Além das mudanças causadas pela senescência nas membranas fetais a termo, o estiramento excessivo e distúrbios mecânicos resultam na produção de citocinas, prostaglandinas e colagenases, fenômenos que contribuem para a sensibilização do miométrio e o início das contrações uterinas (34).

PREMATURIDADE, RESPOSTA INFLAMATÓRIA E SENESCÊNCIA

O parto pré-termo é definido como o nascimento ocorrido anteriormente a 37ª semana de gestação completa, podendo ser induzido ou espontâneo. A prematuridade induzida pode ser consequente de indicação fetal ou materna, podendo ser iniciada através de medicação indutora de trabalho de parto ou por cesárea. O parto pré-termo espontâneo pode ser subdividido em duas categorias: precedido por trabalho de parto pré-termo com bolsa íntegra (TPP) ou precedido por rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT) (35,36). Dentre os partos pré-termo espontâneos, a incidência de TPP é de cerca de 60% e a de RPM-PT é de 30-40% (36-43).

A etiologia do parto pré-termo é multifatorial e inclui fatores de riscos maternos, paternos e genéticos (44-47). Apesar dessa multifatorialidade, estudos demonstram que a infecção intra-amniótica acomete de 25% a 40% das gestações pré-termo, com chance dessa porcentagem ser subestimada, visto que a infecção intra-amniótica nem sempre é diagnosticada pelos métodos de cultura comumente empregados (35,48).

O principal mecanismo pelo qual a infecção intra-amniótica é causa direta de parto pré-termo é a indução de síntese de prostaglandinas, responsável pelo início das contrações uterinas (42). As bactérias presentes no líquido amniótico produzem fosfolipases, as quais ativam a liberação de ácido araquidônico, que com a metabolização, via ciclooxigenase, culmina na amplificação da produção de prostaglandinas. Além disso, as bactérias contêm padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), que são reconhecidos por receptores do sistema imune inato. A ativação desses receptores desencadeia a produção e a liberação de citocinas inflamatórias, as quais provocam liberação adicional de prostaglandinas pelas células amnióticas, decíduais e pelos macrófagos (49).

Adicionalmente ao reconhecimento microbiano, a imunidade inata atua no reconhecimento de moléculas endógenas que são liberadas por células danificadas ou mortas, DAMPs (50,51).

O reconhecimento de PAMPs e DAMPs pelo sistema imune inato ocorre através de receptores especiais denominados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Esses receptores são expressos por diversos tipos celulares e encontram-se na membrana plasmática, nas membranas dos endossomos e no citoplasma dessas células (50,51). Em relação aos PRRs acoplados à membrana celular, a classe mais bem caracterizada é a família de receptores *Toll-like* (TLR), os quais merecem destaque devido a seu papel crucial contra a invasão microbiana, tendo em vista sua capacidade de reconhecer amplo espectro de padrões moleculares (52,53). O reconhecimento dos PAMPs pelos TLRs ativa diversas vias de sinalização intracelulares, as quais culminam na ativação de fatores de transcrição responsáveis pela expressão de genes envolvidos nas respostas inflamatórias e anti-virais (50,53,54).

Dentre os fatores de transcrição ativados pelas vias de sinalização dos TLRs destacam-se o NF- κ B e a proteína ativadora 1 (AP-1). A ativação de NF- κ B e AP-1 resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão endotelial (50). A via de sinalização do NF- κ B é uma das mais bem caracterizadas vias de sinalização dos TLRs. Nessa via, após o reconhecimento do PAMP pelo TLR na superfície celular, a primeira molécula recrutada é a proteína MyD88, a qual possui um domínio TIR que se liga ao domínio TIR do TLR. Uma segunda proteína a ser recrutada dentro do complexo de sinalização é a quinase associada ao receptor de IL-1 (IRAK) que contém um domínio de morte que medeia as interações com o domínio de morte da MyD88. Quando ocorre o recrutamento da IRAK, ela sofre autofosforilação, dissociando-se da MyD88 e ativando o fator 6 associado ao TNF-R (TRAF-6). O TRAF-6 ativa a cascata de quinase I κ B, levando à ativação do NF- κ B. Os genes que são expressos em resposta à ativação do NF- κ B codificam proteínas importantes para a resposta imune inata, como citocinas e moléculas de adesão endotelial (50). Em alguns tipos celulares os TLRs

acoplam-se a outras vias de sinalização intracelular, levando à ativação do fator de transcrição AP-1 que diferentemente da via do NF- κ B, está envolvida com a transdução de sinais intracelulares através de proteínas quinases associadas à mitógeno (MAPKs).

A principal rota da infecção da cavidade amniótica é a ascensão transcervical de espécies bacterianas presentes no trato genital inferior, as quais atravessam uma pequena região das membranas e invadem a cavidade amniótica, proliferando-se no líquido amniótico (55,56). Quando presentes na cavidade amniótica, esses microrganismos podem invadir o âmnio, o tecido conjuntivo e em casos mais severos, o cório e a decídua (56). Outras três possíveis rotas de infecção foram propostas: 1) via hematogênica ou transplacentária (57,58), 2) infecção retrógrada da cavidade peritoneal e das trompas de Falópio (59) e 3) infecção transuterina causada acidentalmente por procedimentos como a amniocentese, amostragem percutânea do cordão umbilical e fetoscopia (60–63).

Quando a resposta inflamatória é instalada em função da infecção bacteriana tem-se o diagnóstico de corioamnionite, que pode se apresentar nas condições clínica, subclínica e histológica. A corioamnionite clínica, frequentemente denominada de infecção intra-amniótica ou amnionite, acomete de 1% a 2% dos partos de termo e 5% a 10% dos partos pré-termo, havendo aumento dessa incidência quando há rotura prematura das membranas por tempo prolongado (64) e seu diagnóstico é geralmente definido como presença de temperatura $\geq 37,8^{\circ}\text{C}$ e pelo menos dois dos seguintes achados: taquicardia materna (acima de 120 bpm), leucitose materna (acima de $18.000\text{ células/mm}^3$), presença de sensibilidade uterina, líquido amniótico purulento ou de odor fétido ou taquicardia fetal (acima de 160 bpm) (56,65). A corioamnionite histológica é definida pela presença de leucócitos polimorfonucleares nas estratificações das membranas corioamnióticas, podendo também ser avaliado a densidade e degeneração tecidual para estimar a intensidade e progressão da resposta inflamatória materna (65–67). A maioria dos casos de corioamnionite histológica ocorre na ausência de sinais clínicos e de sintomas de infecção (68) e este diagnóstico pode ser feito em mais de 20% das gestações de termo e em mais de 50% dos partos pré-termo (69–71).

Os principais microrganismos presentes na cavidade amniótica de gestantes com infecção intra-amniótica são os micoplasmas *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* e espécies de *Fusobacterium*; ocasionalmente também são encontrados bacilos Gram-negativos, como os do gênero *Bacteroides* e *Prevotella*, ambos encontrados na vaginose bacteriana; além de *Escherichia coli* e *Streptococcus* do grupo B (56,72,73). Recentes evidências sugerem que as bactérias do líquido amniótico podem formar biofilmes, os quais desempenham papel muito importante nas infecções humanas pois as bactérias envolvidas em biofilmes tornam-se

resistentes aos antibióticos, o que explica a dificuldade de tratamento das infecções intra-amnióticas. (74–78).

Uma importante complicação materna decorrente de infecção intra-amniótica é a bacteremia, e cerca de 5% a 10% das gestantes com corioamnionite clínica desenvolvem tal complicação (69,79,80). Outras complicações maternas, incluem anormalidades do trabalho de parto com maior taxa de cesárea, risco de hemorragia e endometrite pós-parto (80). Duff et al. (81) demonstraram que 75% das gestantes com corioamnionite clínica apresentaram redução da contratilidade uterina e, mesmo com administração aumentada de ocitocina, 34% dessas pacientes tiveram a resolução da gestação por cesárea devido à falha no progresso do trabalho de parto.

Dentre as complicações fetais e neonatais decorrentes de infecção intra-amniótica, destacam-se sepse, pneumonia, estresse respiratório e óbito sendo que os riscos dessas complicações são inversamente proporcionais a idade gestacional (80). A corioamnionite clínica também pode causar complicações a longo prazo, destacando-se problemas neurológicos decorrentes da resposta inflamatória, como leucomalácia periventricular, hemorragia intraventricular e paralisia cerebral, tanto em crianças nascidas a termo quanto em pré-termo (82,83). Segundo Shalak et al. (84) recém-nascidos de termo com encefalopatia hipóxico-isquêmica apresentaram níveis séricos elevados de IL-6, IL-8 e RANTES (CCL5). Segundo esses mesmos autores, as citocinas podem causar injúria cerebral por diversos mecanismos, incluindo efeito tóxico direto via aumento da produção de óxido nítrico sintase, ciclooxigenase e radicais livres (85,86) ou ainda através da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (87). Entretanto, ainda não se sabe porque apenas parte dos fetos expostos à infecção intra-uterina desenvolve sequelas neurológicas, nem mesmo qual é o mecanismo exato pelo qual as citocinas causam a necrose cerebral. Yoon et al. (88) sugerem que a predisposição genética pode determinar a intensidade da resposta inflamatória fetal e que o desenvolvimento de danos neurológicos pode estar associado ao fator genético.

Conforme discutido anteriormente, a senescência e a inflamação estéril associada à senescência são uma resposta fisiológica normal decorrente da longevidade das membranas corioamnióticas em gestações a termo. No entanto, a ativação prematura da senescência em resposta a vários fatores de risco do parto pré-termo pode se tornar um fator patológico, contribuindo diretamente para o parto pré-termo. As semelhanças entre os mecanismos de senescência no parto a termo e na RPM-PT sugerem a contribuição das membranas corioamnióticas para ambas as condições (32,89). Gestações a termo e complicadas por RPM-PT demonstram aumento de danos induzidos pelo estresse oxidativo, aumento da senescência e SASP, ativação de p38MAPK e diminuição da capacidade antioxidante (32,89). Estudos *in vitro*

demonstraram que muitos desses eventos poderiam ser minimizados ou encerrados através da inibição de p38MAPK, o que confirma o papel crucial de p38MAPK nesse processo mecanicista (20), relacionando o estresse oxidativo aos mecanismos inflamatórios como componentes inseparáveis que convergem para a deflagração do nascimento pré-termo (90).

ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NA GESTAÇÃO

Estudos recentes têm atribuído ao estresse oxidativo uma participação importante nos processos fisiológicos ou patológicos relacionados à reprodução, como sua participação no fenômeno de deflagração do trabalho de parto, ou, sua participação nos mecanismos etiopatogênicos da pré-eclâmpsia, aborto de repetição e prematuridade (91–95). O estudo dos mecanismos de formação e de regulação dos níveis de EROs no organismo é de extrema importância para o entendimento dos eventos celulares relacionados ao controle da sobrevivência, morte e proliferação celular (96,97). O estresse oxidativo, resultante da produção exacerbada de EROs e/ou de mecanismos antioxidantes deficientes, pode acarretar em diversos danos celulares envolvendo peroxidação lipídica, peroxidação proteica e oxidação de DNA (96,98). O estresse oxidativo acontece quando a produção de radicais livres é maior do que a capacidade da defesa antioxidante. Radicais livres são átomos quimicamente ativos ou fragmentos moleculares com uma carga, devido ao excesso ou deficiência no número de elétrons. Radicais livres que contêm oxigênio, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs) são os mais comuns biologicamente (99). A peroxidação lipídica, caracterizada pela cascata de eventos bioquímicos resultante da ação de EROs sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, leva à destruição de sua estrutura, falência nos mecanismos de troca de metabólitos e, em casos mais extremos, morte celular (100). As principais metodologias utilizadas para a avaliação da peroxidação lipídica em sistemas biológicos medem a formação de produtos gerados durante as diferentes fases deste processo. Dentre os principais marcadores de dano lipídico destacam-se os isoprostanos, que são derivados da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por via não enzimática. A família de isoprostanos mais comumente estudada é a Família F₂-isoprostano, cujos membros são derivados do ácido araquidônico e da qual se destaca o 8-isoprostano. Outro importante marcador de dano lipídico é o malondialdeído (MDA), que é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados por cisão *beta* principalmente do ácido araquidônico (100). O dano proteico por ação das EROs pode ocorrer de maneira direta ou indireta, através de peroxidação, dano a resíduos de aminoácidos específicos, alterações em suas estruturas terciárias, degradação e fragmentação. Dentre as consequências do dano proteico em resposta

ao estresse oxidativo destacam-se a perda da atividade enzimática, alteração nas funções celulares, interferência na formação do potencial de membrana e mudanças no tipo e nível de proteínas celulares (98,101,102). Finalmente, em relação à oxidação de DNA, embora esse molécula seja bastante estável, a interação com EROs pode causar diversos tipos de danos, entre eles quebras nas fitas simples e duplas, perda de purinas, danos à desoxirribose e ao sistema de reparo de DNA (98), alterações estruturais nos telômeros (103) ou mesmo modificações nas bases nitrogenadas (104,105). A base mais suscetível a alterações induzidas pelos radicais livres é a guanina, cujo produto de oxidação é representado pela 8-OhdG, um importante marcador de dano de DNA (106).

O estresse oxidativo extrapola o nível intracelular e se estende ao meio extracelular, proporcionando desestruturação dos componentes da MEC, como os proteoglicanos, o colágeno e a elastina (107). Neste contexto, os autores têm postulado que as alterações celulares provocadas pelos mecanismos inflamatórios e oxidativos, uma vez interrelacionados, apresentam-se como processos indutores da prematuridade.

Agentes antioxidantes reduzem o efeito do dano causado pelos radicais livres através de ligações à essas moléculas instáveis, diminuindo seu poder de destruição ou neutralizando o dano já causado por elas (108). Quando a viabilidade de antioxidante que podem ser nutrientes (vitaminas e minerais) ou enzimas (proteínas) é limitada, esses danos podem se tornar cumulativos e debilitantes. Antioxidantes são, portanto, essenciais para a homeostase celular e sistêmica.

Os antioxidantes podem ser classificados pela sua solubilidade. Antioxidantes hidrofílicos atuam principalmente no plasma no citoplasma celular sendo os exemplos mais comuns glutatona, ácido úrico, ácido ascórbico e ácido lipoico (99). Já os antioxidantes lipofílicos protegem principalmente a membrana celular da peroxidação lipídica. Carotenos, vitamina E e ubiquinol são os principais exemplos de antioxidantes lipofílicos (109).

Certos antioxidantes enzimáticos são produzidos pelo próprio organismo. Os mais comumente reconhecidos destes antioxidantes naturais são superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona (GSH). Superóxido dismutase muda a estrutura dos oxidantes e os separa em peróxido de hidrogênio. A catalase, por sua vez, quebra o peróxido de hidrogênio em água e partículas de oxigênio. Já a glutatona é um agente desintoxicante que se liga a diferentes toxinas para mudar sua forma, de modo que essas possam ser eliminadas pelo nosso organismo (109).

Poucos estudos têm avaliado o desequilíbrio entre estresse oxidativo e capacidade antioxidante na gestação. Em relação à capacidade antioxidante nas membranas

corioamnióticas, uma quantidade aumentada de EROs leva à ativação de diferentes respostas antioxidantes para proteger as células contra danos oxidativos e restabelecer a homeostase (110,111). Salas-Pacheco et al. (112) e Chitra et al. (113) observaram uma compensação na capacidade antioxidante em resposta ao aumento do estresse oxidativo no plasma materno em gestações a termo.

Quanto ao equilíbrio oxidativo, Basu et al. (114) investigou a produção de malondialdeído (MDA), um produto de peroxidação lipídica, em 201 placentas de gestantes que sofreram término eletivo de gravidez entre a 6 a 26 semanas de gestação e de gestações a termo. Os níveis placentários de MDA foram os mais elevados na placenta do primeiro trimestre e diminuíram à medida que a gestação progrediu. Concomitantemente, houve aumento da capacidade antioxidante total com o progresso da gestação.

Em relação as terapias antioxidantes, ensaios clínicos iniciais demonstraram uma reverção de marcadores de estresse oxidativo, entretanto quanto foram realizados ensaios maiores, não observou-se efeito nos resultados clínicos. O estresse oxidativo pode ser um fenômeno de espectador, em vez de fundamental para a etiologia de algumas doenças. A ação dos antioxidantes depende diretamente de cofatores, o que torna ingênuo assumir que o mecanismo de ação e especificidade dos antioxidantes atualmente utilizados é correto para todas as doenças associadas ao estresse oxidativo (115).

Em suma, os esforços são múltiplos na busca pelo entendimento dos mecanismos envolvidos na etiopatogenia e fisiopatologia do parto pré-termo espontâneo, em especial, admitindo que a gestação é um período de alta demanda energética e com participação importante da resposta imune, que quando em desequilíbrio, contribuem sumariamente para os resultados gestacionais adversos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moore K, Persaud T. O Início do Desenvolvimento Humano: Primeira Semana. In: Embriologia Clínica. 2008. p. 16–40.
2. Siderakis M, Tarsounas M. Telomere regulation and function during meiosis. Chromosom Res. 2007;15(5):667–79.
3. Sadler TW. Embriologia Médica. langman's Med Embryol. 2001;8ª edição:3–84.
4. Maltepe E, Bakardjiev AI, Fisher SJ. The placenta: Transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. J Clin Invest. 2010;120(4):1016–25.
5. Magon N, Kumar P. Hormones in pregnancy. Niger Med. 2012;53(4):179.
6. Parry S, Strauss JF. Premature rupture of the fetal membranes. N Engl J Med. 1998;338(10):663–70.
7. Fox H. Aging of the placenta. Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed. 1997;77(3):171–5.
8. Menon R, Yu J, Basanta-Henry P, Brou L, Berga SL, Fortunato SJ, et al. Short fetal leukocyte telomere length and preterm prelabor rupture of the membranes. PLoS One. 2012;7(2)e31136.
9. Fortunato SJ, Menon RP, Swan KF, Menon R. Inflammatory cytokine (interleukins 1, 6 and 8 and tumor necrosis factor-alpha) release from cultured human fetal membranes in response to endotoxic lipopolysaccharide mirrors amniotic fluid concentrations. Am J Obstet Gynecol. 1996;174(6):1855-61.
10. Ogawa K, Chen F, Kuang C, Chen Y. Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor- β is mediated by a nuclear factor- κ B site. Biochem J. 2004;381:413–22.
11. Kendal-Wright CE. Stretching, mechanotransduction, and proinflammatory cytokines in the fetal membranes. Reprod Sci. 2007;14(8 Suppl):35–41.
12. French JI, McGregor JA. The pathobiology of premature rupture of membranes. Semin Perinatol. 1996;20(5):344–68.
13. McQuilling JP, Vines JB, Kimmerling KA, Mowry KC. Proteomic Comparison of Amnion and Chorion and Evaluation of the Effects of Processing on Placental Membranes. Wounds a Compend Clin Res Pract. 2017;29(6):38–42.
14. Zare-bidaki M, Sadrinia S, Erfani S, Afkar E, Ghanbarzade N. Antimicrobial Properties of Amniotic and Chorionic Membranes : A Comparative Study of Two Human Fetal Sacs. 2017;18(2):218–24.
15. Richardson LS, Vargas G, Brown T, Ochoa L, Sheller-Miller S, Saade GR, et al. Discovery and Characterization of Human Amniochorionic Membrane Microfractures. Am J Pathol. 2017; 187(12):2821-30.
16. Peltier MR. Immunology of term and preterm labor. Reprod Biol Endocrinol. 2003;1:122.

17. Watari M, Watari H, DiSanto ME, Chacko S, Shi GP, Strauss JF. Pro-inflammatory cytokines induce expression of matrix-metabolizing enzymes in human cervical smooth muscle cells. *Am J Pathol.* 1999;154(6):1755–62.
18. Thornton S, Gillespie JI, Greenwell JR, Dunlop W. Oxytocin-evoked repetitive rises of intracellular calcium in single cultured human myometrial cells. *Exp Physiol.* 1992;77(2):385–8.
19. Myatt L, Sun K. Role of fetal membranes in signaling of fetal maturation and parturition. *Int J Dev Biol.* 2010;54(2–3):545–53.
20. Dutta EH, Behnia F, Boldogh I, Saade GR, Taylor BD, Kacerovský M, et al. Oxidative stress damage-associated molecular signaling pathways differentiate spontaneous preterm birth and preterm premature rupture of the membranes. *Mol Hum Reprod.* 2015;22(2):143-57.
21. Romero R, Brody DT, Oyarzun E, Mazor M, Wu YK, Hobbins JC, et al. Infection and labor. III. Interleukin-1: A signal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;160:1117–23.
22. Romero R, Parvizi ST, Oyarzun E, Mazor M, Wu YK, Avila C, et al. Amniotic fluid interleukin-1 in spontaneous labor at term. *J Reprod Med.* 1990;35(3):235–8.
23. Romero R, Mazor M, Brandt F, Sepulveda W, Avila C, Cotton DB, et al. Interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta in preterm and term human parturition. *Am J Reprod Immunol.* 1992;27(3–4):117–23.
24. Romero R, Mazor M, Tartakovsky B. Systemic administration of interleukin-1 induces preterm parturition in mice. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165(4 PART 1):969–71.
25. Romero R, Miranda J, Chaemsaitong P, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Dong Z, et al. Sterile and microbial-associated intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Neonatal Med.* 2015;28(12):1394–409.
26. Romero R, Avila C, Santhanam U, Sehgal PB. Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor: Association with infection. *J Clin Invest.* 1990;85(5):1392–400.
27. Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, Wu YK, Oyarzun E, Hobbins JC, et al. Infection and labor. IV. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;161(2):336–41.
28. Romero R, Mazor M, Sepulveda W, Avila C, Copeland D, Williams J. Tumor necrosis factor in preterm and term labor. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;166(5):1576–87.
29. 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(4):887–94.
30. Menon R. Human fetal membranes at term: Dead tissue or signalers of parturition? *Placenta* 2016;44:1–5.
31. Menon R, Behnia F, Polettini J, Saade GR, Campisi J, Velarde M. Placental membrane aging and HMGB1

- signaling associated with human parturition. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(2):216–30.
32. Menon R, Richardson LS. Seminars in Perinatology Preterm prelabor rupture of the membranes : A disease of the fetal membranes. *Semin Perinatol*. 2017;1–11.
 33. Sheller S, Papaconstantinou J, Urrabaz-Garza R, Richardson L, Saade G, Salomon C, et al. Amnion-Epithelial-Cell-Derived Exosomes Demonstrate Physiologic State of Cell under Oxidative Stress. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157614.
 34. 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(11–12):1037–51.
 35. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008;371(9606):75–84.
 36. Goldenberg RL, Gravett MG, Iams J, Papageorghiou AT, Waller S a, Kramer M, et al. The preterm birth syndrome: issues to consider in creating a classification system. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;206(2):113–8.
 37. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. Vol. 371, *The Lancet*. 2008;371(9606):75–84.
 38. Gomez R, Romero R, Edwin SS, David C. Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. *Infect Dis Clin North Am*. 1997;11(1):135–76.
 39. Menon R. Spontaneous preterm birth, a clinical dilemma: etiologic, pathophysiologic and genetic heterogeneities and racial disparity. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008;87(6):590–600.
 40. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes: diagnosis and management. *Clin Perinatol*. 2004;31(4):765–82.
 41. Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, Korzeniewski SJ, Chaemsaitong P, Gotsch F, et al. Prevalence and clinical significance of sterile intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Reprod Immunol*. 2014;72(5):458–74.
 42. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel L a., Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006;11(5):317–26.
 43. Romero R, Espinoza J, Kusanovic J, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2006;113:17–42.
 44. Sayres WG. Preterm labor. *Am Fam Physician*. 2010;81(4):477–84.
 45. Murphy DJ. Epidemiology and environmental factors in preterm labour. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2007;21(5):773–89.
 46. Anum EA, Springel EH, Shriver MD, Strauss JF. Genetic contributions to disparities in preterm birth. Vol. 65,

- Pediatric Research. 2009;65:1–9.
47. Holst D, Garnier Y. Preterm birth and inflammation-The role of genetic polymorphisms. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2008;141(1):3–9.
 48. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. N Engl J Med. 2000;342(20):1500–7.
 49. Challis JRG. Mechanism of parturition and preterm labor. Obstet Gynecol Surv. 2000;55(10):650–60.
 50. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunologia Celular e Molecular. Vol. 7ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier. 2011. 125-130 p.
 51. Murphy KM, Travers P, Walport M. Janeway Immunologie. Vol. 7. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag GmbH. 2009. 1119 p.
 52. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. Front Immunol. 2014;(5):461.
 53. Anwar MA, Basith S, Choi S. Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. Exp Mol Med. 2013;45(2):e11.
 54. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol. 2010;11(5):373–84.
 55. Romero R, Salafia CM, Athanassiadis AP, Hanaoka S, Mazor M, Sepulveda W, et al. The relationship between acute inflammatory lesions of the preterm placenta and amniotic fluid microbiology. Am J Obstet Gynecol. 1992;166(5):1382–8.
 56. Kim CJ, Romero R, Chaemsaitong P, Chaiyasit N, Yoon BH, Kim YM. Acute chorioamnionitis and funisitis: Definition, pathologic features, and clinical significance. Am J Obstet Gynecol. 2015;213:29–52.
 57. Benedetti TJ, Valle R, Ledger WJ. Antepartum pneumonia in pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 1982;144(4):413–7.
 58. Kaul AK, Khan S, Martens MG, Crosson JT, Lupo VR, Kaul R. Experimental gestational pyelonephritis induces preterm births and low birth weights in C3H/HeJ mice. Infect Immun. 1999;67(11):5958–66.
 59. Ghidini A, Lynch L. Management strategies for congenital infections. Mt Sinai J Med. 1994;61(5):376–88.
 60. Papp C, Papp Z. Chorionic villus sampling and amniocentesis: what are the risks in current practice? Curr Opin Obstet Gynecol. 2003;15(2):159–65.
 61. Hamoda H, Chamberlain PF. Clostridium welchii infection following amniocentesis: A case report and review of the literature. Prenat Diagn. 2002;22(9):783–5.
 62. Williamson RA, Varner MW, Weiner CP. Use of needle guide to improve sonographically directed amniocentesis. Am J Obstet Gynecol. 1984;(149):107–8.

63. Cittadini E, Orlandi F, Rossi C. Fetoscopy in fetal blood sampling. *New Trends Gynaecol Obstet.* 1985;1(2):205–17.
64. Gibbs RS, Duff P. Progress in pathogenesis and management of clinical intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;164(5 PART 1):1317–26.
65. Redline RW, Faye-Petersen O, Heller D, Qureshi F, Savell V, Vogler C. Amniotic Infection Syndrome: Nosology and Reproducibility of Placental Reaction Patterns. *Pediatr Dev Pathol.* 2003;6(5):435–48.
66. Blanc WA. Pathology of the placenta and cord in ascending and in haematogenous infection. *Ciba Found Symp.* 1979;(77):17–38.
67. Salafia CM, Weigl C, Silberman L. The prevalence and distribution of acute placental inflammation in uncomplicated term pregnancies. *Obstet Gynecol.* 1989;73:383–9.
68. vanHoeven KH, Anyaegbunam A, Hochster H, Whitty JE, Distant J, Crawford C, et al. Clinical significance of increasing histologic severity of acute inflammation in the fetal membranes and umbilical cord. *Pediatr Pathol Lab Med.* 1996;16(5):731–44.
69. Edwards RK. Chorioamnionitis and labor. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2005;32(2):287–96.
70. Silva MG, Peracoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Peracoli MT. Cervical Lactobacillus and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynaecol Obs.* 2003;81(2):175–82.
71. Polettini J, Peraçoli JC, Candeias JMG, Araújo Júnior 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(1):27–31.
72. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science.* 2014;345(6198):760–5.
73. Romero R, Espinoza J, Gonçalves L, Kusanovic J, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med.* 2007;25(1):21–39.
74. Espinoza J, Gonçalves LF, Romero R, Nien JK, Stites S, Kim YM, et al. The prevalence and clinical significance of amniotic fluid “sludge” in patients with preterm labor and intact membranes. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2005;25(4):346–52.
75. Romero R, Kusanovic JP, Espinoza J. What is amniotic fluid “sludge”? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;30(5):793-8.
76. Kusanovic JP, Espinoza J, Romero R, Gonçalves LF, Nien JK, Soto E, et al. Clinical significance of the presence of amniotic fluid “sludge” in asymptomatic patients at high risk for spontaneous preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;30(5):706–14.
77. Romero R, Schaudinn C, Kusanovic JP, Gorur A, Gotsch F, Webster P, et al. Detection of a microbial biofilm in intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198(1):1-5.

78. Fuchs F, Boucoiran I, Picard A, Dube J, Wavrant S, Bujold E, et al. Impact of amniotic fluid “sludge” on the risk of preterm delivery. *J Matern Neonatal Med.* 2015;28(10):1176–80.
79. Rouse DJ, Landon M, Leveno KJ, Leindecker S, Varner MW, Caritis SN, et al. The maternal-fetal medicine units cesarean registry: Chorioamnionitis at term and its duration - Relationship to outcomes. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191(1):211–6.
80. FAHEY J. Clinical Management of Intra-Amniotic Infection and Chorioamnionitis: A Review of the Literature. *J Midwifery Womens Health.* 2008;53(3):227–35.
81. Duff P, Sanders R, Gibbs RS. The course of labor in term patients with chorioamnionitis. *Am J Obs Gynecol.* 1983;147(4):391–5.
82. YW W, Colford, JM J. Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: A meta-analysis. *Jama.* 2000;284(11):1417–24.
83. Vedovato S, Zanardo V. [Chorioamnionitis and inflammatory disease in the premature newborn infant]. *Minerva Pediatr.* 2010;62(3):155–6.
84. Shalak LF, Laptook AR, Jafri HS, Ramilo O, Perlman JM. Clinical chorioamnionitis, elevated cytokines, and brain injury in term infants. *Pediatrics.* 2002;110(4):673–80.
85. Chao CCC, Hu SX, Ehrlich L, Peterson PKK. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain, behavior, and immunity.* 1995;(9):355–65.
86. Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello CA. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest.* 1988;81(4):1162–72.
87. Bolton CF, Bryan GY, Zochodne DW. The neurological complications of sepsis. *Annals of Neurology.* 1993;(33):94–100.
88. Yoon BH, Jun JK, Romero R, Park KH, Gomez R, Choi JH, et al. Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *Am J Obs Gynecol.* 1997;177(1):19–26.
89. Martin LF, Moço NP, de Lima MD, Polettini J, Miot HA, Corrêa CR, et al. Histologic chorioamnionitis does not modulate the oxidative stress and antioxidant status in pregnancies complicated by spontaneous preterm delivery. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2017;17(1):1–8.
90. Menon R. Oxidative stress damage as a detrimental factor in preterm birth pathology. *Front Immunol.* 2014;(5):567.
91. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005;3:28.

92. Hung T-H, Lo L-M, Chiu T-H, Li M-J, Yeh Y-L, Chen S-F, et al. A longitudinal study of oxidative stress and antioxidant status in women with uncomplicated pregnancies throughout gestation. *Reprod Sci*. 2010;17(4):401–9.
93. Chai M, Barker G, Menon R, Lappas M. Increased oxidative stress in human fetal membranes overlying the cervix from term non-labouring and post labour deliveries. *Placenta*. 2012;33(8):604–10.
94. Hubel C a. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999;222(3):222–35.
95. Ghneim HK, Alshebly MM. Biochemical Markers of Oxidative Stress in Saudi Women with Recurrent Miscarriage. *J Korean Med Sci*. 2016;31:98–105.
96. JA K. Free radicals: their history and current status in aging and disease. *Ann Clin Lab Sci*. 1998;28(6):331–46.
97. Machado Rocha Ribeiro S, Humberto de Queiroz J, do Carmo Gouveia Peluzio M, Maria Brunoro Costa N, Luiz Pinto da Matta S, Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz M. A formacao e os efeitos das especies reativas de oxigenio no meio biologico. *Biosci J*. 2005;21(3):133–49.
98. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 2002;(30): 620–50.
99. Kumar S, Sharma S, Vasudeva N. Review on antioxidants and evaluation procedures. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. 2017;1–12.
100. Benzie IFF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr*. 1996;47(3):233–62.
101. Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem*. 1987;262(20):9895–901.
102. Grune T, Reinheckel T, Davies KJ. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J*. 1997;11(7):526–34.
103. Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicol Sci*. 2011;119(1):3–19.
104. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(17):6465–7.
105. Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(12):4533–7.
106. Subash P, Gurusurthy P, Sarasabharathi A, Cherian KM. Urinary 8-OHdG: A marker of oxidative stress to DNA and total antioxidant status in essential hypertension with South Indian population. *Indian J Clin Biochem*. 2010;25(2):127–32.

107. Lima. Émersom Silva AD. Peroxidação lipídica : mecanismos e avaliação em amostras biológicas. Rev Bras Ciências Farm. 2001;37(3):293–303.
108. Mathew S, Abraham TE. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. Food Chem. 2006;94(4):520–8.
109. Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005;(53):1841–56.
110. Menon R. Oxidative stress damage as a detrimental factor in preterm birth pathology. Frontiers in Immunology. 2014;(5):567.
111. Espinosa-Díez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. Redox Biology. 2015;(6):183–97.
112. Salas-Pacheco JM, Lourenco-Jaramillo DL, Mendez-Hernandez EM, Sandoval-Carrillo AA, Hernandez Rayon YI, Llave-Leon O La, et al. Oxidative stress equilibrium during obstetric event in normal pregnancy. J Matern Neonatal Med. 2016;7058(8):1–5.
113. Chitra M, Mathangi DC PJ and PS. Maternal Oxidative Stress and Antioxidant Defence during Labour. IOSR J Dent Med Sci. 2015;14(4):2279–861.
114. Basu J, Bendek B, Agamasu E, Salafia CM, Mishra A, Benfield N, et al. Placental Oxidative Status throughout Normal Gestation in Women with Uncomplicated Pregnancies. Obstet Gynecol Int. 2015;2015:1–6.
115. Duhig K, Chappell LC, Shennan AH. Oxidative stress in pregnancy and reproduction. Obstet Med. 2016;9(3):113–6.

Capítulo II
Artigo Científico I

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Histologic chorioamnionitis does not modulate the oxidative stress and antioxidant status in pregnancies complicated by spontaneous preterm delivery

Laura Fernandes Martin¹, Natália Prearo Moço¹, Moisés Diógo de Lima², Jossimara Poletini³, Hélio Amante Miot¹, Camila Renata Corrêa¹, Ramkumar Menon⁴ and Márcia Guimarães da Silva^{1*}

Abstract

Background: Infection induced-inflammation and other risk factors for spontaneous preterm birth (PTB) and preterm premature rupture of membranes (pPROM) may cause a redox imbalance, increasing the release of free radicals and consuming antioxidant defenses. Oxidative stress, in turn, can initiate intracellular signaling cascades that increase the production of pro-inflammatory mediators.

The objective of this study was to evaluate the oxidative damage to proteins and antioxidant capacity profiles in amniochorion membranes from preterm birth (PTB) and preterm premature rupture of membranes (pPROM) and to determine the role of histologic chorioamnionitis in this scenario.

Methods: We included 27 pregnant women with PTB, 27 pPROM and 30 at term. Protein oxidative damage was assayed by 3-nitrotyrosine (3-NT) and carbonyl levels, using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and modified dinitrophenylhydrazine assay (DNPH), respectively. Total antioxidant capacity (TAC) was measured by ELISA.

Results: Protein oxidative damage determined by carbonyl levels was lower in PTB group than pPROM and term groups ($p < 0.001$). PTB group presented higher TAC compared with pPROM and term groups ($p = 0.002$). Histologic chorioamnionitis did not change either protein oxidative damage or TAC regardless of gestational outcome.

Conclusion: These results corroborates previous reports that pPROM and term birth exhibit similarities in oxidative stress- induced senescence and histologic chorioamnionitis does not modulate oxidative stress or antioxidant status.

Keywords: Oxidative stress, Antioxidant capacity, Histologic chorioamnionitis, Preterm birth

Background

Reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS), collectively named free radicals, are generated spontaneously in all aerobic organisms [1–4]. The mechanism termed redox balance ensures that the production of free radicals is not harmful to biological systems by preventing the excessive formation and action of ROS and

RNS or by favoring the repair and reconstruction of biological structures that have been affected by them [5, 6]. Antioxidant defense mechanisms essential to redox balance are composed of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. Enzymatic antioxidants include catalase, glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GSR) and superoxide dismutase (SOD). Non-enzymatic antioxidants include antioxidant compounds, such as glutathione and vitamins A, C and E [7]. Oxidative stress is an imbalance in redox status, towards excess ROS and RNS generation [6, 8, 9]. When the total antioxidant capacity (TAC) decreases or free radical levels increase

* Correspondence: mgilva@fmb.unesp.br

¹Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, Botucatu, São Paulo CEP 13618-686, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

[10], these exacerbated ROS and RNS formations can damage lipids, proteins and nucleic acids by modifying their expression, structure and function [11–13].

Oxidative stress damage to cells and tissues plays an important role in several pathological processes, including cardiovascular disease [14, 15], cancer [16–18], chronic inflammation [19], neurological disorders [20], metabolic syndrome [21, 22] and pregnancy complications [1, 6, 9, 23, 24]. Recent reports have linked spontaneous preterm birth (PTB) and preterm premature rupture of membranes (pPROM) pathophysiology to oxidative stress damage, where the latter is associated with oxidative stress-induced inflammation and considered as the disease of the fetal membranes [25, 26].

Despite the multifactorial etiology of PTB, intra-amniotic infection followed by maternal inflammatory response activation is reported as the major risk factor for PTB and is present in approximately 40% of preterm pregnancies [27–30]. pPROM in labor is associated with approximately 75% of infection [31]. The inflammatory response in the amniochorion membranes in response to bacterial infection can be diagnosed using clinical or histological criteria. Histologic chorioamnionitis (HC) is defined by the presence of polymorphonuclear cell (PMN) infiltrate in the amniochorion membranes [32].

Bacterial phagocytosis by PMNs during an inflammatory process results in an oxidative burst that is an antimicrobial mechanism characterized by the rapid generation and release of ROS and RNS, leading to oxidative stress [33]. Oxidative stress, in turn, can initiate intracellular signaling cascades that increase the production of pro-inflammatory mediators [34, 35]. Recent reports suggest that a substantial number of PTB and pPROM are associated with sterile inflammation in the absence of documented intra-amniotic infection or histologic chorioamnionitis. This is indicative of an alternate pathophysiology that can lead to an inflammatory process. Oxidative stress-induced senescence and senescence associated with inflammation, termed as sterile inflammation, has been linked to both PTB and pPROM. Both infectious and sterile inflammation exhibit a similar set of biomarkers. This study was conducted to assess oxidative stress-induced damage by determining protein peroxidation and total antioxidant capacity of fetal membranes from pregnancies complicated by PTB and pPROM compared with normal term pregnancies and evaluate the role of histologic chorioamnionitis in this scenario.

Methods

The research project was approved by the Research Ethics Committee Board of the Federal University of Paraíba (UFPB), under protocol no. 1255858. Written informed consent was obtained from all the participants, and

sociodemographic and behavioral data were acquired from patient medical records.

Study population

This cross-sectional study was conducted in the Obstetrics Unit of the UFPB Lauro Wanderley Hospital, Paraíba State, Brazil, and in the Laboratory of Immunopathology of the Maternal-Fetal Relationship of the Department of Pathology of Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), São Paulo State, Brazil, from January to December 2014. Eighty-four pregnant women were enrolled. The preterm group was composed of 27 pregnant women who presented PTB with intact membranes and 27 pregnant women who presented pPROM. All these pregnant women delivered before 37 weeks of gestation. The term group was composed of 30 normal pregnant women in labor. Normal pregnancy was defined as singleton full-term and uneventful pregnancy, with no chronic or gestational medical conditions. The PTB, pPROM and term groups were subdivided according to the presence or absence of histologic chorioamnionitis.

The exclusion criteria were as follows: BMI > 30 kg/m², preeclampsia, HELLP syndrome, gestational diabetes, hypertension, multiple pregnancies, cervical isthmus incompetence, placenta previa, placental abruption, RH-incompatibility, oligohydramnios or polyhydramnios, intrauterine growth restriction, malformation or fetal death, systemic infection, thyroid disease, HIV infection and drug and/or tobacco use.

Gestational age was calculated from the first day of the last menstrual period and/or by first-trimester ultrasound examination. Clinical diagnoses of PTB were made based on the following criteria: uterine contractions ≥ 4 per 20 min, cervical dilatation of at least 1 cm and cervical ripening [36]. pPROM was defined as the leakage of amniotic fluid prior to the onset of labor. This condition was confirmed with vaginal discharge pH ≥ 7 and/or positive result in an AmniSure test [37].

Sample collection and histopathological analyses

Amniochorion membranes were collected and cleaned of blood clots and decidua in sterile conditions after placental delivery, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until processing. 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 in amniochorion membranes, as described by Redline et al. [32].

Measurement of 3-nitrotyrosine levels

Protein peroxidation was determined using the 3-nitrotyrosine (3-NT) ELISA Kit, according to the manufacturer's instructions (Abcam, Cambridge, UK). 3-NT is

a product of protein tyrosine nitration resulting from oxidative damage to proteins by peroxynitrite, which can result in changes in protein structure, function and catalytic activity.

Amniochorion membrane sections of 25 mg were prepared for the assay by grinding with liquid nitrogen and homogenization with 1 mL of PBS. Next, aliquots were prepared containing 60 μ L of tissue homogenate to which 240 μ L of extraction buffer containing protease inhibitor were added. The samples were incubated on ice for 20 min. Tissue homogenates were centrifuged at 16000 \times g for 10 min at 4 °C and the supernatants were collected immediately and stored at -20 °C.

The total protein concentration of all samples was measured by the Bradford protein assay, according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, CA, USA), and then adjusted to 1 mg/mL.

A standard curve was obtained in parallel to each assay and the absorbance results were converted to pg/mL. At the end of the reaction, the absorbance was read spectrophotometrically at 450 nm in an automatic ELISA reader (Biotek Instruments Inc., Winooski, USA) and the concentration of 3-NT in each sample was determined by comparison with a standard curve. All the samples were tested in duplicate. The minimum detectable 3-NT level for assays was 0.053 ng/mL.

Measurement of carbonyl levels

Protein carbonylation represents the most frequent and usually irreversible oxidative modification affecting proteins. In this study, a modified dinitrophenylhydrazine (DNPH) assay was performed. The principal method used to evaluate protein carbonylation is protein carbonyl derivatization with 2,4 DNPH, followed by spectrophotometric measurement, in which NaOH is added to the protein solution after the addition of DNPH, triggering an increase of the maximum absorbance wavelength of derivatized proteins from 370 to 450 nm. This increase minimizes the background of free DNPH that are read at 366–370 nm [38].

Amniochorion membrane sections of 25 mg were prepared for the assay by grinding with liquid nitrogen and homogenization with 1 mL of PBS containing the anti-protease cocktail. Tissue homogenates were centrifuged at 1600 \times g for 10 min at 4 °C and the supernatants were immediately collected and stored at -20 °C. The total protein concentration of all samples was measured by the Pierce BCA assay, according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

Aliquots of 100 μ L were placed in a 96-well plate, and then 100 μ L of DNPH solution (19.8 mg DNPH in 10 mL HCl2M) were added. The plate was incubated for 10 min at room temperature and then 50 μ L of NaOH 6M were added to all wells. After exactly 10 min

incubation at room temperature, the absorbance was read spectrophotometrically at 450 nm in an automatic reader (Biotek Instruments Inc., Winooski, USA). All the samples were tested in duplicate. The concentration of protein carbonyls was quantified using the molar absorption coefficient of 22,000 $M^{-1} cm^{-1}$ [39].

Measurement of total antioxidant capacity

Total antioxidant capacity was assessed using the antioxidant assay kit, according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). This protocol assesses the combined activities of enzymatic and non-enzymatic compounds of the antioxidant system.

Amniochorion membrane fragments of 25 mg were prepared for the assay by grinding with liquid nitrogen and homogenization with 1 mL of PBS containing the anti-protease cocktail. The assay is based on the ability of the antioxidants presented in the homogenate to inhibit the oxidation of 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate] (ABTS) to ABTS⁺ by metmyoglobin. The amount of ABTS⁺ produced was assessed spectrophotometrically at 405 nm. The antioxidant capacity in the sample to prevent ABTS oxidation was compared with Trolox, a water-soluble tocopherol analogue, and results were expressed as millimolar Trolox equivalent (mM Trolox). All the samples were tested in duplicate. The minimum detectable TAC level for assays was 0.004 mM.

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to check the normality of the data. Regarding sociodemographic and obstetric variables, ethnicity, parity and Apgar 1 were compared between the groups using the Fisher exact test, while the variables maternal age, gestational age and newborn weight were compared using the nonparametric Kruskal-Wallis test.

The levels of 3-NT, carbonyl and TAC were compared among PTB, pPROM and term groups using the non-parametric Kruskal-Wallis test and between presence and absence of HC in each group using the nonparametric Mann-Whitney test. A *p* value <0.05 was considered statistically significant. The software used was SigmaStat Software version 3.1.

Results

Sociodemographic characteristics

Sociodemographic, obstetric and neonatal characteristics of the patients included in the study are presented in Table 1. No statistically significant differences were verified in maternal age, ethnicity, parity and Apgar 1 among the groups studied. As expected, given the study design, gestational age at delivery (*p* < 0.001) and newborn weight

Table 1 Sociodemographic, obstetric and neonatal characteristics of the study population

Characteristics	PTB (n = 27)	pPROM (n = 27)	TERM (n = 30)	p-value	
Maternal age (years)*	21 (19.25–24.0)	24 (17.5–32.0)	23 (20.0–27.25)	NS	
Ethnicity	White	33.3% (9/27)	22.2% (6/27)	13.3% (4/30)	NS
	Non-white	66.7% (18/27)	77.8% (21/27)	86.7% (26/30)	NS
Gestational age (days)*	245 (165–256) ^a	238 (182–252) ^a	273 (259–294) ^b	<0.001	
Newborn weight (g)*	2340 (630–3085) ^a	2255 (760–3550) ^a	3300 (2600–4690) ^b	<0.001	
Parity	Primiparous	37% (10/27)	48.1% (13/27)	33.3% (10/30)	NS
Apgar 1 st min	<7	18.5% (5/27)	14.8% (4/27)	3.33% (3/30)	NS

Values followed by the same letter do not differ

NS not significant

*Values expressed as: median(min-max)

($p < 0.001$) were statistically higher in the term group compared with the PTB and pPROM groups.

Histopathological findings

Histologic chorioamnionitis was present in 22.2% (6/27) of the PTB group, 51.8% (14/27) of the pPROM group and 13.3% (4/30) of the term group. Following stratification according to histologic chorioamnionitis grading, moderate/severe cases were observed in 66% (4/6) in the PTB group, 21% (3/14) in the pPROM group and 25% (1/4) in the term group.

Oxidative stress and antioxidant capacity

Quantitation of protein damage markers and total antioxidant capacity in amniochorion membranes

3-NT concentrations, an indicator of protein peroxidation and oxidative stress, was not significantly different between the groups. However, protein oxidative damage determined by carbonyl levels was lower in the PTB group in comparison with the pPROM and term groups ($p < 0.001$). Furthermore, the PTB group had higher TAC compared with the pPROM and term groups ($p = 0.002$) (Fig. 1).

Quantitation of protein damage markers and total antioxidant capacity in amniochorion membranes based on histologic chorioamnionitis

Analyses of protein oxidative damage and total antioxidant capacity among the groups considering HC status are presented in Fig. 2. Protein oxidative damage assessed by 3-NT (Fig. 2a) and carbonyl (Fig. 2b) levels did not differ between the presence and absence of HC groups, regardless of gestational outcome. Similar data were obtained in relation to antioxidant capacity determined by TAC (Fig. 2c).

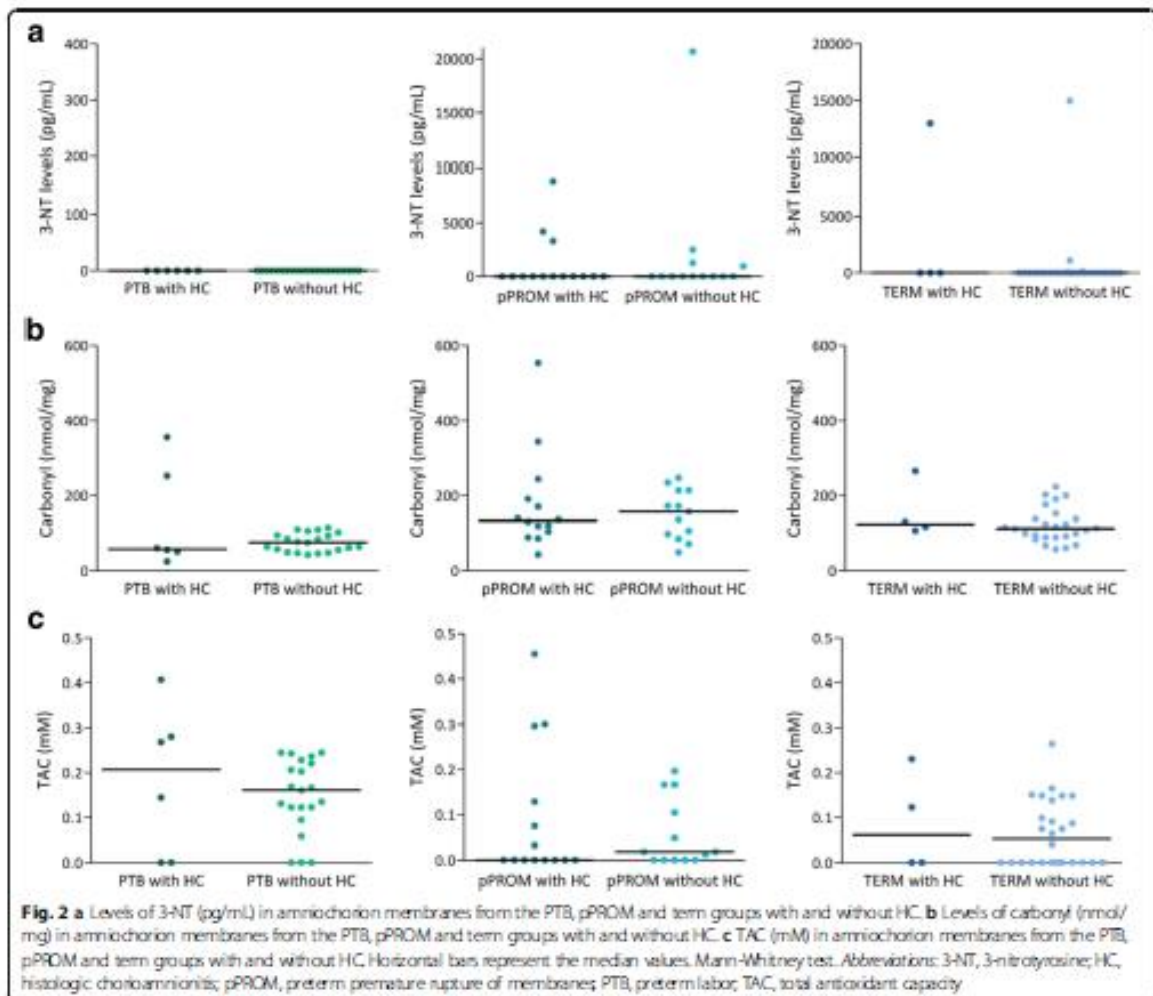
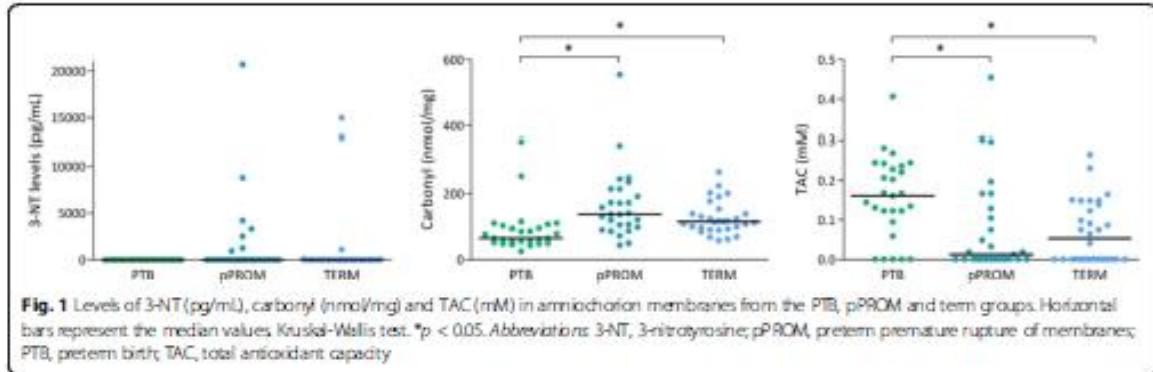
Discussion

Inflammation is the physiological effector of term parturition and the pathological initiator of labor in both PTB and pPROM. Inflammatory changes in gestational tissues

result in the modification of membrane structural integrity, activation of myometrial contraction and cervical ripening that are simultaneous mechanisms responsible for the onset of labor [40]. Moreover, infection-induced inflammation and other risk factors for pPROM and PTB, including behavioral risks (e.g. cigarette smoking, alcohol and drug use), poor nutrition and obesity, can cause a redox imbalance, increasing the release of free radicals and consuming antioxidant defenses [6, 41, 42].

In this study, we demonstrated that amniochorion membranes from pregnancies complicated by pPROM showed higher protein oxidative damage and lower antioxidant capacity than those complicated by PTB. This is consistent with previous reports by Dutta et al. [25], who reported oxidative stress-induced damaged and damaged associated senescence as salient features of pPROM, but not in PTB when membranes were intact. Although there are etiological similarities between PTB and pPROM, our results also support mechanistic differences in pPROM and PTB pathways.

Menon et al. [6] reported that fetal membranes from pPROM have pronounced damage due to oxidative stress and proteolysis, whereas in PTB this oxidative damage is minimal. Compelling evidence suggests that pPROM may result from chronic oxidative stress in response to sustained exposure to risk factors, whereas PTB may be a consequence of acute oxidative stress [6, 43]. It has been suggested that an important mechanism associated with pPROM is the imbalance of redox status, where lower antioxidant status and higher oxidative stress-induced tissue damage triggers the weakening and rupture of fetal membranes. Alternately, better antioxidant capacity present in membranes from PTB can balance the acute oxidative stress allowing the cell to resist oxidative damage and membrane rupture. However, the risk factors may still cause host immune and inflammatory response sufficient to cause preterm labor. Thus, PTB pathophysiology shows a predominance of inflammatory process, while pPROM presents an intense oxidative damage of tissue, activation of senescence and senescence associated inflammation.



Infection in some cases of pPROM is likely secondary, resulting from membrane damage leading to its dysfunctional status, and reduced antimicrobial resistance allowing the ascendance of microbes. Reinforcing this idea, our results showed a predominance of moderate/severe cases of HC in 66% of the PTB group, whereas mild HC was predominant in 79% of the pPROM group.

At term, oxidative stress and fetal membrane senescence are a well-described condition, probably resulting from physiological aging of the placenta and membranes that lead to labor and delivery [44, 45]. Herein, we demonstrated that the protein oxidative damage observed in pPROM amniochorion membranes was similar to that observed in term membranes. This similarity corroborates the hypothesis that elevated oxidative stress in pregnancies complicated by pPROM accelerates the premature senescence and aging, senescence-associated inflammation and proteolysis in amniochorion membranes, predisposing these to membrane rupture and the onset of labor [25, 45].

Following the evaluation of protein oxidative damage and antioxidant status in amniochorion membranes, we further determined the role of HC in the oxidative stress profile in each gestational outcome. HC was diagnosed in approximately 13% of term pregnancies and over 37% of preterm pregnancies. These data are in agreement with other studies, which demonstrated that HC is diagnosed in approximately 20% of term pregnancies and over 50% of the PTB. The majority of these cases are not associated with clinical signs and symptoms of infection [46–48].

In our study, protein oxidative damage and antioxidant capacity in amniochorion membranes did not differ based on HC status, regardless of gestational outcome. These data corroborate the findings of Kacerovsky et al. [49] and Musilova et al. [50], who observed that oxidative stress markers in pregnancies complicated by pPROM were not influenced by intra-amniotic infection, nor by HC, when measured in amniotic fluid and umbilical cord blood, respectively. These results disagree with those reported by Temma et al. [51], who showed increased oxidative stress in human placenta with HC. Similarly, a recent study by Cháfer-Pericás et al. [52] demonstrated elevated oxidative stress in amniotic fluid in the presence of intra-amniotic infection. Additionally, Perrone et al. [53] observed that HC was associated with higher oxidative stress levels in umbilical cord blood. The apparent disagreement between studies may reflect differences in the definition of the phenotype studied, the biological samples analyzed and analytes measured, as well as methodologies used in each study. It is likely that HC is a secondary phenomenon that is risk exposure and mechanism dependent, where type of host inflammatory response and biochemical

(cytokines/chemokines) may determine HC outcome and thus HC is a consequence of several pathological processes.

There are limitations in our study. The first of them is the small sample size of each group when subdivided by the histopathological status of amniochorion membranes. In addition, the discrepancy between the results of the methodologies used to determine protein oxidative damage may be explained by intrinsic differences present in each technique. Determining protein carbonyl content is the most general indicator of oxidative protein damage. In addition, due to its long lasting stability of the samples under the storage conditions described, measurement of protein carbonyl content is considered a reliable marker of protein oxidation [54–56]. 3-NT quantification, in turn, is used to evaluate the protein oxidative damage more specifically, since it is a product of protein tyrosine nitration [57]. Moreover, 3-NT quantification requires sensitive analytical methods because it is typically a low-yield process [57]. Endogenous levels of 3-NT are severely low and usually close to or below the limits of detection of the currently available analytical assays [57]. Future studies by our group will examine lipid, nucleic acid and other cellular elemental damage and independent determination of multiple antioxidants.

Conclusion

Taken together, our results suggest that increased oxidative stress and reduced antioxidant capacity are similar in amniochorion membranes from women who present pPROM and term pregnancies, reinforcing that accelerated premature senescence, senescence-associated inflammation and proteolysis predispose to pPROM. In this scenario, histologic chorioamnionitis does not modulate oxidative stress or antioxidant status profile.

Abbreviations

3-NT: 3-nitrotyrosine; ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline sulfonate); DNPH: modified dinitrophenylhydrazine assay; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; GPx: glutathione peroxidase; GSR: glutathione reductase; HC: histologic chorioamnionitis; PBS: phosphate buffered saline; PMN: polymorphonuclear cell; pPPM: preterm premature rupture of membranes; PTB: spontaneous preterm birth; RNS: reactive nitrogen species; ROS: reactive oxygen species; SOD: superoxide dismutase; TAC: total antioxidant capacity

Acknowledgments

This study was supported by São Paulo Research Foundation, the São Paulo Research Foundation (FAPESP) (Grant 2012/17234-1) and National Council for Technological and Scientific Development (CNPq - 140419/2013-3). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We would also like to thank all the patients and participants of this study.

Funding

This study was supported by developmental funds granted to Dr. MGS of the Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Brazil, by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) (Grant 2012/17234-1) and granted to LRM, PhD student of Graduate Program in Pathology,

Botucatu Medical School, UNESP, Brazil, by the National Council for Technological and Scientific Development (CNPq - 142,419/2013-3).

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

Authors' contributions

LFM, NPM and JP contributed to study design. LRM and NPM contributed to sample collection, execution of the study, data analysis, critical discussion and manuscript drafting. MDL and CRCC contributed to execution of the study. HAM and RM contributed to analysis of results. MGS contributed to the study design, supervision of study execution, critical discussion and manuscript analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The research project was approved by the Research Ethics Committee Board of the Federal University of Paraíba (UFPB), under protocol no. 1255858. Written informed consent was obtained from all the participants, and sociodemographic and behavioral data were acquired from patient medical records.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, Botucatu, São Paulo CEP 18618-686, Brazil. ²Department of Gynecology and Obstetrics, Federal University of Paraíba, UFPB, João Pessoa, Brazil. ³The University of Western São Paulo, UNOESTE, Presidente Prudente, Brazil. ⁴Department of Obstetrics & Gynecology, The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, TX, USA.

Received: 14 June 2017 Accepted: 19 October 2017

Published online: 13 November 2017

References

- Longini M, Perrone S, Vezzosi P, Marzocchi B, Kusanovic A, Centini G, et al. Association between oxidative stress in pregnancy and preterm premature rupture of membranes. *Clin Biochem*. 2007;40:793-7.
- Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*. 1991;91.
- Finkbeiner T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*. 2011. p. 7-15.
- Cadenas E, Sies H. Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. *Adv Enzym Regul*. 1985;23:217-37.
- Đuračková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res*. 2010; 59(4):459-69.
- Menon R. Oxidative stress damage as a detrimental factor in preterm birth pathology. *Front Immunol*. 2014;5:567.
- Chai M, Barker G, Menon R, Lappas M. Increased oxidative stress in human fetal membranes overlying the cervix from term non-labouring and post labour deliveries. *Placenta*. 2012;33:604-10.
- Al-Gubory KH, Fowler PA, Gamel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42:1634-50.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:28.
- Halliwel B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev*. 2012;70:257-65.
- Agarwal A, Aponso-Meládo A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012;10:1-31.
- Halliwel B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004;142:231-55.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 1993;215:213-9.
- de Vos LC, Lefrandt JD, Dullaart RPF, Zeebregts CJ, Smit AJ. Advanced glycation end products: an emerging biomarker for adverse outcome in patients with peripheral artery disease. *Atherosclerosis*. 2016;254:291-9.
- Yeh JK, Wang C-Y. Telomeres and telomerase in cardiovascular diseases. *Genes (Basel)*. 2016;7:58. Available from <http://www.mdpi.com/2073-4405/7/5/58>.
- Katalwkar P, Metzger D, Nalk S, Mittal R. Oxidative stress marker in oral cancer: a review. *J Cancer Res Ther*. 2016;12:438-46.
- Zhou L, Wen J, Huang Z, Nice EC, Huang C, Zhang H, et al. Redox proteomics screening cellular factors associated with oxidative stress in hepatocarcinogenesis. *Prot C In Appl*. 2017;(11):1-49.
- Udeni UK TP. Oxidative stress in prostate hypertrophy and carcinogenesis. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2009;63:340-50.
- Husain T, Tan B, Yin Y, Bachier F, Tossou MCB, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016. doi: 10.1155/2016/7432797.
- Radi E, Formichi P, Battisti C, Federico A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases; in: *Journal of Alzheimer's Disease*. 2014. pp S125-S152.
- Moreto F, Kano HT, Torresan GA, de Oliveira EP, Manda RM, Teixeira O, et al. Changes in malondialdehyde and C-reactive protein concentrations after lifestyle modification are related to different metabolic syndrome-associated pathophysiological processes. *Diabetes Metab Syndr*. 2015;9:218-222.
- Bjerklund G, Chirumbolo S. Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. *Nutrition*. 2017;33:11-21.
- Porton L, Igosheva N, Mistry HD, Seed PT, Shennan AH, Rana S, et al. Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy. *Am J Clin Nutr*. 2011;94:1980-5.
- Porton L, Rajmakers MTM. Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome - a review. *Placenta*. 2004;25:72-8.
- Dutta EH, Behnia F, Boldogh I, Saade GR, Taylor BD, Kacerovsky M, et al. Oxidative stress damage-associated molecular signaling pathways differentiate spontaneous preterm birth and preterm premature rupture of the membranes. *Mol Hum Reprod*. 2015;22(2):143-57.
- Murtha AP, Menon R. Regulation of fetal membrane inflammation: a critical step in reducing adverse pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol*. 2015; 213:447-8.
- DiGiulio DB, Romero R, Amogni HP, Kusanovic JP, Birk EM, Gotsch F, et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One*. 2008;3:e3056.
- Nguyen DP, Gerber S, Hofffeld P, Sandrine G, Wilkin SS. *Mycoplasma hominis* in mid-trimester amniotic fluid: relation to pregnancy outcome. *J Perinat Med*. 2004;32:323-6.
- Pemi SC, Vardhana S, Komeewa I, Tuttle SL, Paraskevas LR, Chasen ST, et al. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in midtrimester amniotic fluid: association with amniotic fluid cytokine levels and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191:3382-6.
- Yoon B, Romero R, Lim J-H, Shim S-S, Hong J-S, Shim J-Y, et al. The clinical significance of detecting *Ureaplasma urealyticum* by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;189:19-24.
- Romero R, Quintero R, Oyarzun E, et al. Intraamniotic infection and the onset of labor in preterm premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:661-6.
- Redline RW, Faye-Petersen O, Heller D, Qureshi F, Savell V, Vogler C. Amniotic infection syndrome: Nisology and reproducibility of placental reaction patterns. *Pediatr Dev Pathol*. 2003;64:35-48.
- Bawas SK. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxidative Med Cell Longev*. 2016;
- Anderson MT, Staal FJ, Gitler C, Herzenberg LA. Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF-kappa B signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:11527-31.
- Rohé L, Brigellus-Flohé R, Saliou C, Traber MG, Padier L. Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic Biol Med*. 1997;22:1115-26.
- Bittar RE, Zugali M. Indicadores de risco para o parto prematuro. *Rev Bras Ginecol Obs*. 2009;31:203-9.

37. Caughey AB, Robinson JN, Norwitz ER. Contemporary diagnosis and management of preterm premature rupture of membranes. *Rev Obstet Gynecol.* 2008;1:11–22.
38. Colombo G, Clerici M, Garavaglia ME, Giustarini D, Rossi R, Milzani A, et al. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2014;1019:178–90.
39. Maquita CS, Oliveira R, Bento F, Geraldo D, Rodrigues JV, Marcos JC. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal Biochem.* 2014;458:69–71.
40. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006;11:317–26.
41. Coughlan MT, Permezel M, Georgiou HM, Rice GE. Repression of oxidant-induced nuclear factor- κ B activity mediates placental cytokine responses in gestational diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:3585–94.
42. Dietrich M, Block G, Norluk EP, Hudes M, Traber MG, Cross CE, et al. Smoking and exposure to environmental tobacco smoke decrease some plasma antioxidants and increase gamma-tocopherol in vivo after adjustment for dietary antioxidant intakes. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(1):160–166.
43. Menon R, Polettni J, Syed TA, Saade GR, Boldogh I. Expression of β -oxoglutaric Glycosylase in human fetal membranes. *Am J Reprod Immunol.* 2014;72:75–84.
44. Behnia F, Taylor BD, Woodson M, Kacerovsky M, Hawkins H, Fortunato SJ, et al. Chorioamniotic membrane senescence: a signal for parturition? *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213:359e1–359e16.
45. Menon R, Boldogh I, Hawkins HK, Woodson M, Polettni J, Syed TA, Fortunato SJ, et al. Histological evidence of oxidative stress and premature senescence in preterm premature rupture of the human fetal membranes recapitulated in vitro. *Am J Pathol.* 2014;184:1740–51.
46. Edwards RK. Chorioamnionitis and labor. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2005;32:287–96.
47. Conti N, Tortorelli M, Voltolini C, Vannucolini S, Clifton VL, Blake E, et al. Term histologic chorioamnionitis is a heterogeneous condition. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2015;188:34–8.
48. Newton ER. Preterm labor, preterm premature rupture of membranes, and chorioamnionitis. *Clin Perinatol.* 2005;32:571–600.
49. Kacerovsky M, Tothova L, Menon R, Vlkova B, Musilova I, Hornychova H, et al. Amniotic fluid markers of oxidative stress in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014;27:1–10.
50. Musilova I, Tothova L, Menon R, Vlkova B, Celec P, Hornychova H, et al. Umbilical cord blood markers of oxidative stress in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Neonatal Med.* 2016;29(12):1900–10.
51. Temma K, Shimoya K, Zhang Q, Kimura T, Wasada K, Kanzaki T, et al. Effects of 4-hydroxy-2-nonenal, a marker of oxidative stress, on the cyclooxygenase-2 of human placenta in chorioamnionitis. *Mol Hum Reprod.* 2004;10:167–71.
52. Cháfer-Pericás C, Stefanovic V, Sánchez-Illana Á, Escobar J, Cernada M, Cubells E, et al. Novel biomarkers in amniotic fluid for early assessment of intraamniotic infection. *Free Radic Biol Med.* 2015;89:734–40.
53. Perrone S, Tataranno ML, Negro S, Longini M, Toti MS, Alagna MG, et al. Placental histological examination and the relationship with oxidative stress in preterm infants. *Placenta.* 2016;46:72–8.
54. Butterfield DA, Castegna A. Proteomics for the identification of specifically oxidized proteins in brain: technology and application to the study of neurodegenerative disorders. *Amino Acids.* 2003;25:419–25.
55. Dalle-Dorne J, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003;329(1–2):23–38.
56. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* 2003;25(3–4):207–18.
57. Teixeira D, Fernandes R, Prudêncio C, Meira M. 3-Nitrotyrosine quantification methods: current concepts and future challenges. *Biochimie.* 2016;125:1–11.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Artigo Científico II

Interaction between inflammation and oxidative stress in amniochorion membranes of pregnancies complicated by spontaneous preterm delivery and histologic chorioamnionitis

Laura Fernandes Martin¹, Hélio Amante Miot², Márcia Guimarães da Silva^{1*}

1. Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.
2. Department of Dermatology and Radiotherapy, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), São Paulo, Brazil.

*Corresponding author

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista - UNESP

Distrito de Rubião Júnior, CEP 18618-686, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Rua Professor Doutor Armando Alves, S/N

Phone: +55 (14) 3880-1580 Fax: +55 (14) 3815-2348

E-mail: mgsilva@fmb.unesp.br

ABSTRACT

INTRODUCTION: Despite the multifactorial etiology of preterm birth (PTB), intra-amniotic infection-induced maternal inflammatory activation is reported as the major risk factor of preterm labor. Therefore, PTB and Preterm Premature Rupture of Membranes (pPROM) have been associated with sterile inflammation in the absence of intra-amniotic infection or histologic chorioamnionitis. This is indicative of an alternate pathophysiology that can lead to an inflammatory process, such as oxidative stress.

OBJECTIVE: Analyze the interaction of IL-1, IL-6, protein damage and antioxidant capacity in amniochorion membranes of pregnancies complicated by preterm birth and preterm premature rupture of membranes considering the status of histologic chorioamnionitis. **METHODS:** We included 27 pregnant women with PTB, 27 pPROM and 30 at term. Protein oxidative damage was assayed by 3-nitrotyrosine (3-NT) and carbonyl levels, using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and modified dinitrophenylhydrazine assay (DNPH), respectively. IL-1 β and IL-6 were measured by ELISA. The correlation of variables was assessed using an exploratory multivariate multiple correspondence analysis model. The analyses were performed using IBM SPSS 24 software and the significance level was set as $p \leq 0.05$.

RESULTS: The perceptual map for the multiple correspondence analysis included 6 variables and accounted for 35% of the variance of the two-component model. The spatial distance observed among the three different gestational outcomes characterizes the peculiarities of each of them. A strong correlation was observed between histologic chorioamnionitis and the highest values of IL-1 β and IL-6. PTB exhibited association with higher TAC values and the pPROM exhibited association with higher carbonyl values. **CONCLUSION:** Greater spatial proximity among higher levels of carbonyl, pPROM and term demonstrates a greater participation of oxidative stress in these gestational outcomes than in PTB.

KEY WORDS: prematurity, histologic chorioamnionitis, oxidative damage, inflammation

INTRODUCTION

Preterm birth (PTB) is defined as the birth occurring prior to the 37th week of complete gestation, which may be induced or spontaneous. Induced preterm birth may be due to fetal or maternal indication and can be initiated through labor induction or cesarean. Spontaneous preterm birth include delivery after preterm labor (PL) and delivery after preterm premature rupture of membranes (pPROM) (1–4).

The etiology of preterm delivery is multifactorial and includes maternal, paternal, and genetic risk factors (5–8). Despite the multifactorial etiology of preterm birth, intra-amniotic infection-induced maternal inflammatory activation is reported as the major risk factor of preterm labor and occurs in approximately 40% of preterm pregnancies (1–4). The infiltration of amniochorion membranes by polymorphonuclear cell (PMNs) in response to bacterial infection is defined as histologic chorioamnionitis (HC) (9,10), which occurs in the most of cases in the absence of clinical signs and symptoms of infection (11) and this diagnosis can be made in more than 20% of term pregnancies and in more than 50% of spontaneous preterm deliveries (12–14) .

The literature has indicated an alternative pathophysiology responsible for the activation of the inflammatory response in a sterile manner in cases of PTB and pPROM in the absence of documented intra-amniotic infection or histological chorioamnionitis. Fetal membranes may become sick due to oxidative stress damage and inflammation induced by oxidative stress (15,16).

Oxidative stress-induced senescence and senescence-associated inflammation are a normal physiological response due to the longevity of the fetal membranes in term pregnancies. However, premature activation of senescence in response to various risk factors for preterm birth may become a pathological factor, contributing directly to preterm delivery. The similarities between senescence mechanisms in term delivery and in pPROM suggest the contribution of the amniochorion membranes for both conditions (17,18). Term pregnancies and pPROM demonstrate increased damage induced by oxidative stress, increased senescence, senescence-associated secretory phenotype (SASP) and decreased antioxidant capacity in amniochorion membranes (17,18).

Understanding the relationship between oxidative stress and inflammatory mechanisms as inseparable components is extremely important, since this interaction is capable of triggering preterm labor (19). This study was conducted to analyze the interaction of IL-1 β , IL-6, protein damage and antioxidant capacity in amniochorion membranes of pregnancies complicated by PTB, pPROM and histologic chorioamnionitis.

MATERIAL AND METHODS

The research project was approved by the Research Ethics Committee Board of the Federal University of Paraíba (UFPB), under protocol no. 19474713.8.0000.5183. Written informed consent was

obtained from all the participants, and sociodemographic and behavioral data were acquired from patient medical records.

Study population

This cross-sectional study was conducted in the Laboratory of Immunopathology of the Maternal-Fetal Relationship of the Department of Pathology of Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), São Paulo State, Brazil. Eighty-four pregnant women were enrolled. The preterm group was composed of 27 pregnant women who presented PTB with intact membranes and 27 pregnant women who presented pPROM. All these pregnant women delivered before 37 weeks of gestation. The term group was composed of 30 normal pregnant women in labor. Normal pregnancy was defined as singleton full-term and uneventful pregnancy, with no chronic or gestational medical conditions. The PTB, pPROM and term groups were subdivided according to the presence or absence of histologic chorioamnionitis.

Gestational age was calculated from the first day of the last menstrual period and/or by first-trimester ultrasound examination. Clinical diagnoses of PTB were made based on the following criteria: uterine contractions ≥ 4 per 20 min, cervical dilatation of at least 1 cm and cervical ripening (20). pPROM was defined as the leakage of amniotic fluid prior to the onset of labor. This condition was confirmed with vaginal discharge pH ≥ 7 and/or positive result in an AmniSure test (21).

The exclusion criteria were as follows: BMI > 30 kg/m², preeclampsia, HELLP syndrome, gestational diabetes, hypertension, multiple pregnancies, cervical isthmus incompetence, placenta previa, placental abruption, RH-incompatibility, oligohydramnios or polyhydramnios, intrauterine growth restriction, malformation or fetal death, systemic infection, thyroid disease, HIV infection and drug and/or tobacco use.

Sample collection and histopathological analyses

Amniochorion membranes were collected and cleaned of blood clots and decidua in sterile conditions after placental delivery, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until processing. 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 polymorphonuclear cell infiltration in amniochorion membranes, as described by Redline et al. (9).

Measurement of carbonyl levels

Amniochorion membrane sections of 25 mg were prepared for the assay by grinding with liquid nitrogen and homogenization with 1mL of PBS containing the anti-protease cocktail. Tissue homogenates were centrifuged at 1600 x g for 10 min at 4°C and the supernatants were immediately collected and stored at -20°C. The total protein concentration of all samples was measured by the Pierce BCA assay, according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

For carbonylation analysis, we use the main method employed that is protein carbonyl derivatization with 2,4 DNP, followed by spectrophotometric measurement, in which NaOH is added to the protein solution after the addition of DNP, triggering an increase of the maximum absorbance wavelength of derivatized proteins from 370 to 450nm. This increase minimizes the background of free DNP that are read at 366-370 nm (22).

Aliquots of 100µL were placed in a 96-well plate, and then 100µL of DNP solution (19.8mg DNP in 10mL HCl2M) were added. The plate was incubated for 10 min at room temperature and then 50µL of NaOH6M were added to all wells. After exactly 10 min incubation at room temperature, the absorbance was read spectrophotometrically at 450 nm in an automatic reader (Biotek Instruments Inc, Winooski, USA). All the samples were tested in duplicate. The concentration of protein carbonyls was quantified using the molar absorption coefficient of 22,000 M⁻¹cm⁻¹ (23).

Measurement of total antioxidant capacity

Amniochorion membrane fragments of 25 mg were prepared for the assay by grinding with liquid nitrogen and homogenization with 1mL of PBS containing the anti-protease cocktail. Total antioxidant capacity was assessed using the antioxidant assay kit, according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). This protocol assesses the combined activities of enzymatic and non-enzymatic compounds of the antioxidant system. All the samples were tested in duplicate. The minimum detectable TAC level for assays was 0.004 mM.

Measurement of IL-1β and IL-6

Amniochorion membrane sections of 10 mg were prepared for the assay by homogenize with an electric tissue homogenizer with 500µL of RIPA lysis buffer containing the anti-protease cocktail. Tissue lysates were centrifuged at 1600 x g for 10 min at 4°C and the supernatants were immediately collected and stored at -20°C. The total protein concentration of all samples was measured by the Pierce BCA assay, according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

Commercially available ELISA kit (R&D Systems, MN, USA) were used to determine IL-1β and IL-6 concentrations in amniochorion membranes lysate. Immunoassays for human IL-1β and IL-6 were validated for using in human amniochorion membranes homogenate to the conduction of this study. Validation included spike and recovery experiments, which produced parallel curves indicating that tissue homogenate constituents did not interfere with antigen–antibody binding in this assay system.

IL-1β and IL-6 concentration was measured using a, following the manufacturer's instructions. A standard curve was obtained in parallel to each assay and the results were converted to pg/mL. Absorbance values were read at 450nm in an automatic ELISA reader (Biotek Instruments Inc, BE, USA). All the samples were tested in duplicate. The minimum detectable level for IL-1β and IL-6 assays were 5.3 pg/mL and 92.8 pg/mL respectively. Intra- and inter-assay variability remained <10.0% for IL-1β and IL-6.

Statistical Analysis

The correlation of variables that were significant on bivariate analysis was assessed using an exploratory multivariate multiple correspondence analysis model (24,25). The analyses were performed using IBM SPSS 24 software and the significance level was set as $p \leq 0.05$.

RESULTS

The present publication includes the values of carbonyl and TAC which was presented previously by our research group (18). No statistically significant differences were verified in maternal age, ethnicity, parity and Apgar 1 among the groups studied. As expected, given the study design, gestational age at delivery ($p < 0.001$) and newborn weight ($p < 0.001$) were statistically higher in the term group compared with the PTB and pPROM groups (data not shown).

Histologic chorioamnionitis was present in 22.2% (6/27) of the PTB group, 51.8% (14/27) of the pPROM group and 13.3% (4/30) of the term group. Following stratification according to histologic chorioamnionitis grading, moderate/severe cases were observed in 66% (4/6) in the PTB group, 21% (3/14) in the pPROM group and 25% (1/4) in the term group.

The perceptual map for the multiple correspondence analysis included 6 variables and accounted for 35% of the variance of the two-component model.

The spatial distance observed among the three different gestational outcomes including in this study characterizes the peculiarities of each of them considering the inflammatory aspects represented by IL-1 β and IL-6 and oxidative stress represented by carbonyl levels (Fig 1). We also observed a correlation between histologic chorioamnionitis and the highest values of IL-1 β and IL-6 as expected, since chorioamnionitis raises an acute inflammatory response. Therefore, more proximity among pPROM, PTB and histologic chorioamnionitis demonstrates the importance of the inflammatory process in prematurity infection-induced (Fig 2).

In continuity to the results observed in our previously study the PTB exhibited association with higher TAC values and the pPROM exhibited association with higher carbonyl values (18). Greater spatial proximity among higher levels of carbonyl, pPROM and term demonstrates a greater participation of oxidative stress in these gestational outcomes than in PTB (Fig 3).

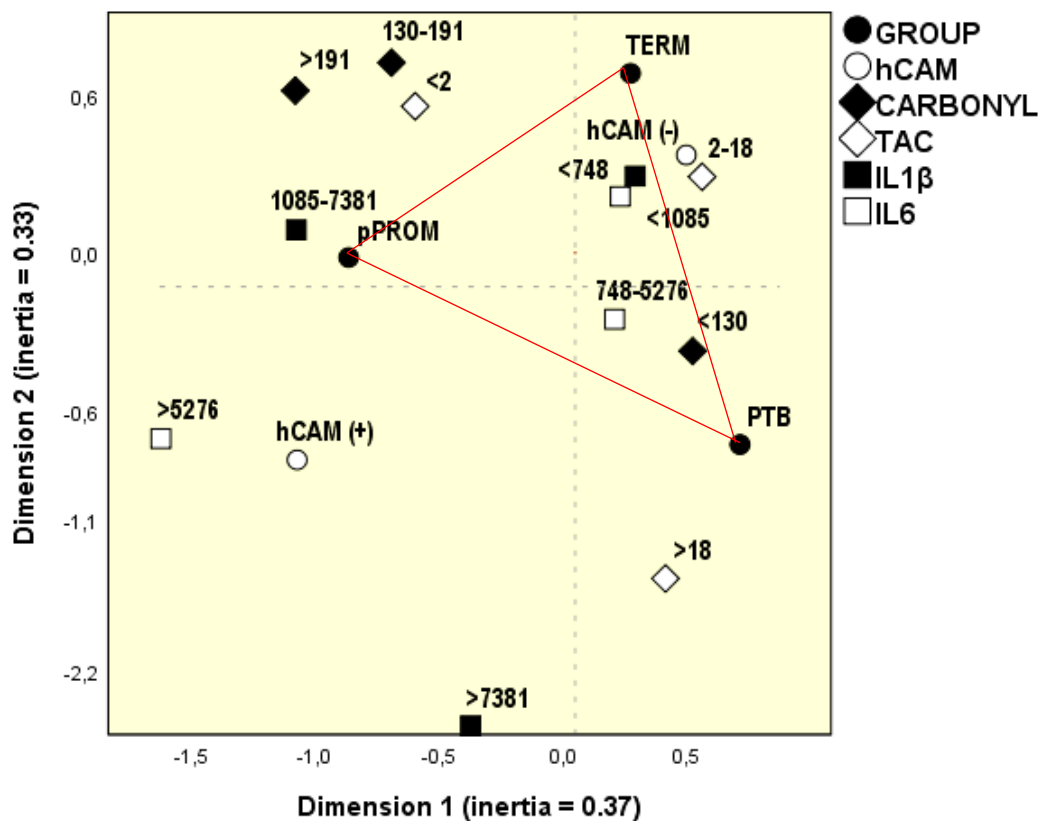


Figure 1. Multiple correspondence analysis of the investigated variables for histologic chorioamnionitis (hcam), IL-1 β , IL-6, total antioxidant capacity (TAC) and carbonyl levels. In the detail represented by red line we can observe the spatial proximity between term and absence of chorioamnionitis. The analyses were performed using IBM SPSS 24 software and the significance level was set as $p \leq 0.05$.

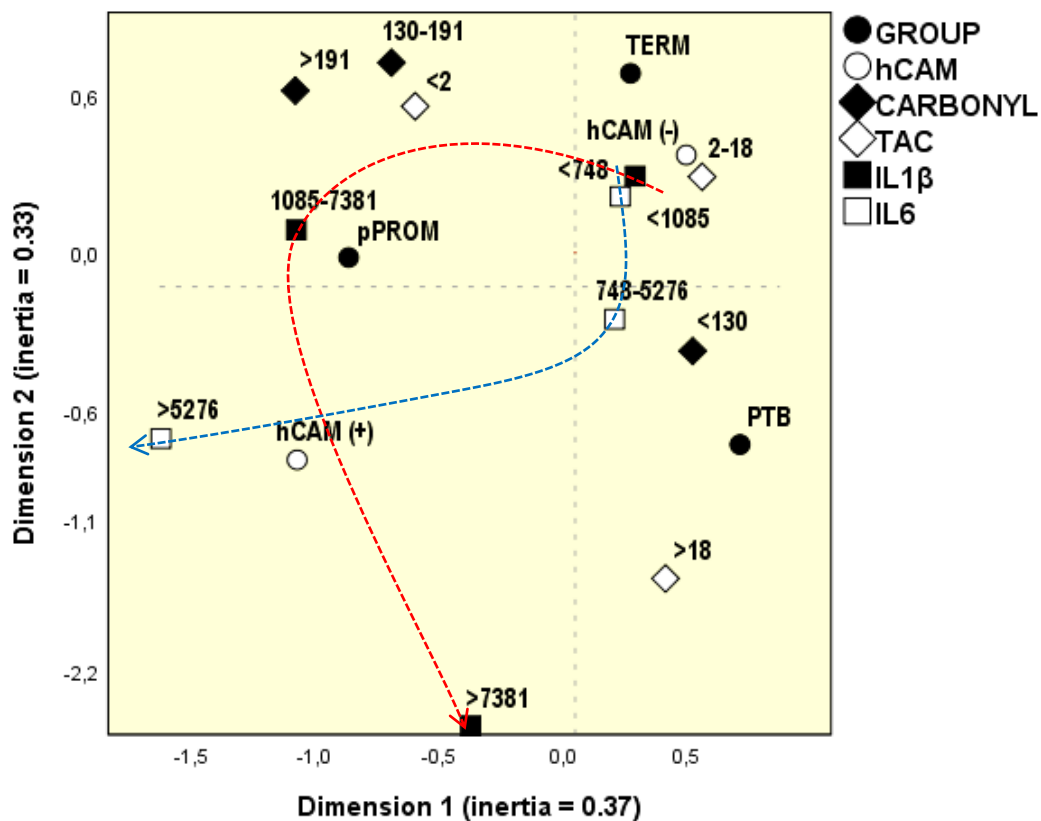


Figure 2. Multiple correspondence analysis of the investigated variables for histologic chorioamnionitis (hcam), IL-1 β , IL-6, total antioxidant capacity (TAC) and carbonyl levels. Red arrow shows IL-1 β levels and blue arrow shows IL-6 levels. The analyses were performed using IBM SPSS 24 software and the significance level was set as $p \leq 0.05$.

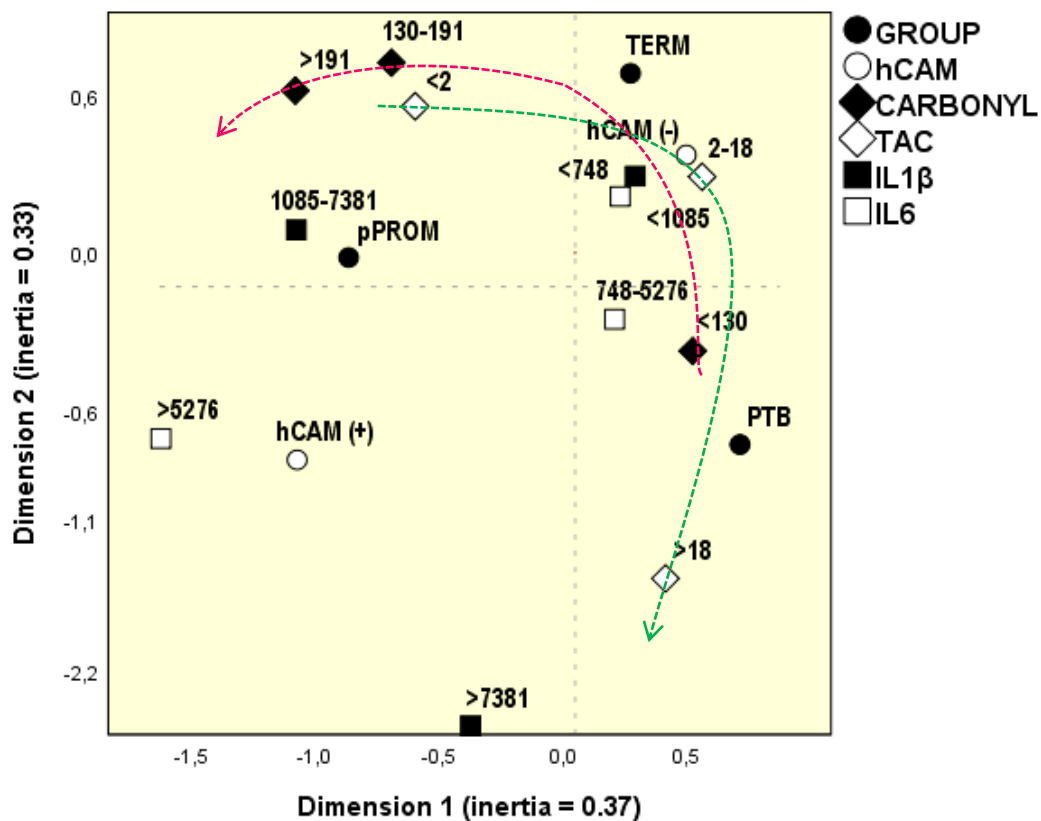


Figure 3. Multiple correspondence analysis of the investigated variables for histologic chorioamnionitis (hcam), IL-1 β , IL-6, total antioxidant capacity (TAC) and carbonyl levels. Pink arrow shows carbonyl levels and green arrow shows TAC levels. The analyses were performed using IBM SPSS 24 software and the significance level was set as $p \leq 0.05$.

DISCUSSION

Multiple correspondence analysis allows one to analyze the pattern of relationship of several dependent variables. Inflammation and damage caused by oxidative stress were explored between term pregnancies, PTB and pPROM as inseparable components, which provides a model that allows inferences about the role of these stimuli when together in the pathophysiology of prematurity. The results that we observed in this study suggests that although similarities may exist in etiologies and clinical presentations, the underlying mechanistic pathways leading to term, PTB and pPROM are distinct and therefore they should be considered as independent phenotypes.

According to our analysis, some variables presented a greater spatial approximation of some of the gestation outcomes than other, as is the case of chorioamnionitis. Histologic chorioamnionitis occurs most often in the absence of clinical signs and symptoms of infection (12,26–28) and this diagnosis can be made in more than 50% of preterm deliveries (12–14). In this study histologic chorioamnionitis was present in 22.2% (6/27) of the PTB group, 51.8% (14/27) of the pPROM group and 13.3% (4/30) of the term group. The presence of histologic chorioamnionitis was more related to prematurity and to the higher levels of inflammatory cytokines.

The main mechanism by which intra-amniotic infection is a direct cause of preterm birth is the induction of prostaglandin synthesis, which is responsible for the onset of uterine contractions (29). The bacteria present in the amniotic fluid produce phospholipases, which activate the release of arachidonic acid, which with the metabolism, via cyclooxygenase, culminates in the amplification of prostaglandin production. In addition, bacteria contain molecular patterns associated with pathogens (PAMPs), which are recognized by innate immune system receptors. Activation of these receptors triggers the production and release of inflammatory cytokines, which cause additional release of prostaglandins by amniotic, decidual and macrophage cells (30).

Another interesting result observed in this study was the relation between the greater damage caused by oxidative stress in amniochorion membranes of pPROM and term pregnancies. Differently from the cases of preterm births with intact membranes where the highest values of TAC and lower values of protein damage were observed, pPROM cases as well as cases of full-term births were related to the lowest TAC values and the highest values of protein damage.

Generation of reactive oxygen species (ROS) as a part of the aerobic energy building process is inevitable. At low levels, ROS is essential for cell division and survival, cell signaling, inflammation and immune functions, autophagy, and stress response (31,32). The maintenance of ROS levels in amounts not harmful to the biological system is made through the elimination of ROS by the finely tuned regulation of redox status through endogenous enzymes, antioxidants, and other cellular mechanisms. However, an overwhelming imbalance compromises the system's ability to detoxify these highly reactive molecules or to repair any damage caused by them causing the so-called oxidative stress and subsequently oxidative damage (19).

Fetal and placental growth and aging are linked to oxidative stress and senescence as a physiologic process throughout the pregnancy that at term lead to labor and delivery (33,34). However, in preterm pregnancies, especially those complicated by pPROM, oxidative stress buildup can occur in response to several risk factors such as infection, nutrient insufficiency (specifically antioxidants) and maternal behavioral factors, and this pathological condition can cause membrane dysfunction and preterm rupture and the onset of labor (33,35).

CONCLUSION

Considering these data about IL-1 β , IL-6, carbonyl and TAC levels we can consider that PTB and pPROM have different inflammatory and oxidative signature although these gestational outcomes share similar etiology and mechanisms.

REFERENCES

1. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F, et al. Microbial Prevalence, Diversity and Abundance in Amniotic Fluid During Preterm Labor: A Molecular and Culture-Based Investigation. *PLoS One*. 2008;3(8):e3056.
2. Nguyen DP, Gerber S, Hohlfeld P, Sandrine G, Witkin SS. *Mycoplasma hominis* in mid-trimester amniotic fluid: relation to pregnancy outcome. *J Perinat Med*. 2004;32(4):323–6.
3. Perni SC, Vardhana S, Korneeva I, Tuttle SL, Paraskevas LR, Chasen ST, et al. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in midtrimester amniotic fluid: Association with amniotic fluid cytokine levels and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191(4):1382–6.
4. Yoon B, Romero R, Lim J-H, Shim S-S, Hong J-S, Shim J-Y, et al. The clinical significance of detecting *Ureaplasma urealyticum* by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;189(4):919–24.
5. Sayres WG. Preterm labor. *Am Fam Physician*. 2010;81(4):477–84.
6. Murphy DJ. Epidemiology and environmental factors in preterm labour. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2007;21(5):773–89.
7. Anum EA, Springel EH, Shriver MD, Strauss JF. Genetic contributions to disparities in preterm birth. *Pediatric Research*. 2009;65:1–9.
8. Holst D, Garnier Y. Preterm birth and inflammation-The role of genetic polymorphisms. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008;141(1):3–9.
9. Redline RW, Faye-Petersen O, Heller D, Qureshi F, Savell V, Vogler C. Amniotic Infection Syndrome: Nosology and Reproducibility of Placental Reaction Patterns. *Pediatr Dev Pathol*. 2003;6(5):435–48.
10. Kim CJ, Romero R, Chaemsaitong P, Chaiyasit N, Yoon BH, Kim YM. Acute chorioamnionitis and funisitis: Definition, pathologic features, and clinical significance. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2015;213:29–52.
11. Van Hoesen KH, Anyaegbunam A, 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(5):731–44.
12. Edwards RK. Chorioamnionitis and labor. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 2005;32:287–96.
13. Silva MG, Peracoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Peracoli MT. Cervical *Lactobacillus* and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynaecol Obs*. 2003;81(2):175–82.
14. Polettini J, Peracoli JC, Candeias JMG, Araújo Júnior 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(1):27–31.
15. Dutta EH, Behnia F, Boldogh I, Saade GR, Taylor BD, Kacerovský M, et al. Oxidative stress damage-associated molecular signaling pathways differentiate spontaneous preterm birth and preterm premature rupture of the membranes. *Mol Hum Reprod*. 2015;22(2).

16. Murtha AP, Menon R. Regulation of fetal membrane inflammation: A critical step in reducing adverse pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213(4):447–8.
17. Menon R, Richardson LS. Seminars in Perinatology Preterm prelabor rupture of the membranes : A disease of the fetal membranes. *Semin Perinatol.* 2017;1–11.
18. Martin LF, Moço NP, de Lima MD, Polettini J, Miot HA, Corrêa CR, et al. Histologic chorioamnionitis does not modulate the oxidative stress and antioxidant status in pregnancies complicated by spontaneous preterm delivery. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2017;17(1):1–8.
19. Menon R. Oxidative stress damage as a detrimental factor in preterm birth pathology. *Front Immunol.* 2014;5:567.
20. Zugaib M, Bittar R. Indicadores de risco para o parto prematuro. *Rev Bras Ginecol e Obs.* 2009;31(3):203–9.
21. Caughey AB, Robinson JN, Norwitz ER. Contemporary diagnosis and management of preterm premature rupture of membranes. *Rev Obstet Gynecol.* 2008;1(1):11–22.
22. Colombo G, Clerici M, Garavaglia ME, Giustarini D, Rossi R, Milzani A, et al. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2016;1019:178–90.
23. Mesquita CS, Oliveira R, Bento F, Geraldo D, Rodrigues J V., Marcos JC. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal Biochem.* 2014;458:69–71.
24. Abdi H. Multiple correspondence analysis. *Encycl Meas Stat.* 2007;95(2):116–28.
25. Assessing normality of data in clinical and experimental trials. 2017;16(2):88–91.
26. Menon R, Taylor RN, Fortunato SJ. Chorioamnionitis - A complex pathophysiologic syndrome. *Placenta.* 2010;31(2):113–20.
27. Conti N, Torricelli M, Voltolini C, Vannuccini S, Clifton VL, Bloise E, et al. Term histologic chorioamnionitis: a heterogeneous condition. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2015;188:34–8.
28. Newton ER. Preterm labor, preterm premature rupture of membranes, and chorioamnionitis. *Clin Perinatol.* 2005;32(3):571–600.
29. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel L a., Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006;11(5):317–26.
30. Challis JRG. Mechanism of parturition and preterm labor. *Obstet Gynecol Surv.* 2000;55(10):650–60.
31. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology.* 2003;15:247–54.
32. Sies H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr.* 1991;69(21–23):965–8.
33. Menon R, Boldogh I, Hawkins HK, Woodson M, Polettini J, Syed TA, et al. Histological evidence of oxidative stress and premature senescence in preterm premature rupture of the human fetal membranes recapitulated in vitro. *Am J Pathol.* 2014;184(6):1740–51.
34. Behnia F, Taylor BD, Woodson M, Kacerovsky M, Hawkins H, Fortunato SJ, et al. Chorioamniotic membrane senescence: A signal for parturition? *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213(3):359e1-359e16.

35. Dutta EH, Behnia F, Boldogh I, Saade GR, Taylor BD, Kacerovský M, et al. Oxidative stress damage-associated molecular signaling pathways differentiate spontaneous preterm birth and preterm premature rupture of the membranes. *Mol Hum Reprod.* 2015;22(2):143–57.

Conclusão

Considerando o tamanho amostral incluído nesse estudo bem como as metodologias empregadas para atingir os objetivos propostos, podemos concluir que o estresse oxidativo aumentado e a capacidade oxidativa total reduzida são similares nas membranas corioamnióticas de gestações complicadas por RPM-PT e termo, reforçando a acelerada senescência nos casos de RPM-PT. Nesse mesmo cenário, a corioamnionite histológica não modula a resposta oxidativa e embora resultados gestacionais adversos que culminam em parto pré-termo espontâneo apresentem etiologias e mecanismos sobrepostos, sugere-se que o PP e RPM-PT possuam assinatura inflamatória e oxidativa singular.

