

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

**EXPRESSÃO DE IL-18 POR PCR EM TEMPO REAL EM MEMBRANAS
CORIOAMNIÓTICAS DE GESTANTES COM ROTURA PREMATURA DE
MEMBRANAS PRÉ-TERMO**

Eliane Passarelli Vieira

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. MÁRCIA GUIMARÃES DA SILVA
CO-ORIENTADOR: PROF. ADJUNTO JOSÉ CARLOS PERAÇOLI**

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

**BOTUCATU - SP
2008**

Sumário

Capítulo I

| | |
|---------------------------------|----|
| Revisão de literatura..... | 02 |
| Referências bibliográficas..... | 13 |

Capítulo II - Manuscrito

| | |
|---|-----------|
| Resumo..... | 22 |
| Abstract..... | 23 |
| 1. Introdução..... | 24 |
| 2. Material e Métodos | 26 |
| 2.1. Casuística..... | 26 |
| 2.2. Coleta de membranas corioamnióticas e análise histopatológica..... | 27 |
| 2.3. Detecção de IL-18 por PCR em tempo real..... | 28 |
| 2.3.1. Extração de RNA..... | 28 |
| 2.3.2. Obtenção de cDNA..... | 29 |
| 2.3.3. PCR em tempo real..... | 29 |
| 2.4. Análise estatística..... | 31 |
| 3. Resultados | 32 |
| 3.1. Características das gestantes..... | 32 |
| 3.2. Análise histopatológica das membranas corioamnióticas..... | 34 |
| 3.3. Quantificação relativa da expressão de IL-18..... | 36 |
| 3.3.1. Determinação da curva padrão na PCR em tempo real para os genes da IL-18 e β -actina com TaqMan® | 36 |
| 3.3.2. Quantificação relativa de RNAm de IL-18 nas membranas corioamnióticas..... | 38 |
| 3.3.3. Quantificação relativa de RNAm de IL-18 nas membranas corioamnióticas em relação à corioamnionite | 39 |
| 4. Discussão..... | 40 |
| 5. Referências Bibliográficas..... | 45 |
| 6. Anexos..... | 50 |

A rotura espontânea das membranas ovulares ou amniorrexe é um acontecimento normal durante o trabalho de parto, ocorrendo rotineiramente após o início do mesmo. Quando precede o início do trabalho de parto é intitulada de rotura prematura de membranas (RPM). Sua ocorrência em idade gestacional inferior a 37 semanas recebe a denominação de rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT)¹.

A RPM-PT ocorre em 30% a 40% dos nascimentos prematuros²⁻⁴. É responsável por 80% das mortes neonatais e 60% de todas as intercorrências neurológicas²⁻⁴, tornando-se o principal fator de risco para morbimortalidade neonatal.

O maior risco materno é a infecção, que pode apresentar-se desde a forma de processo localizado como a endometrite ou a endometriite puerperal até a sepse. Os riscos fetais estão relacionados à idade gestacional em que o acidente ocorre, aumentando a prematuridade e a infecção fetal e neonatal⁵.

Vários fatores de risco estão associados à RPM-PT. Entretanto, o enfraquecimento da matriz extracelular pela degradação do colágeno é um dos eventos chave predisponente da rotura prematura das membranas corioamnióticas. Fatores endógenos e exógenos ativam esta degradação. Os fatores endógenos incluem variação local na espessura da membrana e redução do colágeno e os fatores exógenos incluem os efeitos do metabolismo das bactérias e resposta inflamatória materna ou fetal.

Entre os fatores de risco, passíveis de prevenção, associados à RPM-PT, destacam-se as infecções cérvico-vaginais como vaginose bacteriana⁶ e infecção clamidiana⁷ assim como infecções causadas por *Mycoplasma*

*hominis*⁸, *Ureaplasma urealyticum*⁸ e *Streptococcus* do grupo B⁸; tabagismo, sugeridos por alguns estudos⁹⁻¹¹ e negados por outros¹²; toques vaginais repetidos e procedimentos diagnósticos pré-natais invasivos como a amniocentese¹³. Dentre os fatores de risco não passíveis de prevenção, destacam-se o antecedente de parto prematuro, sangramento vaginal durante a gestação, antecedente de procedimento cirúrgico cervical, patologia placentária e aumento acentuado do volume do útero causado por gemelaridade e polidrâmnio¹⁴.

Embora a patogênese da RPM não esteja completamente elucidada, a ascensão bacteriana, do trato genital inferior para a decídua e membranas corioamnióticas, parece ser o evento chave tanto na etiologia da RPM como do parto prematuro^{15,16}. As bactérias podem ter acesso às membranas ovulares e ao líquido amniótico pelas vias ascendente transcervical, hematogênica através da placenta, iatrogênica no momento da amniocentese e outros procedimentos invasivos ou oriunda da cavidade peritoneal por meio das tubas uterinas¹⁷.

O conceito que a invasão microbiana da cavidade amniótica segue a via ascendente é apoiado pela observação de que, em geral, os microrganismos isolados do líquido amniótico de gestantes com RPM, são similares aos encontrados no trato genital inferior¹⁸. Sustentando este conceito, Galask et al.¹⁹ descreveram que os microrganismos da flora vaginal apresentam capacidade de atingir as membranas corioamnióticas e infectar a cavidade amniótica. Segundo Gyr et al.²⁰, alguns desses microrganismos teriam maior capacidade de invasão.

Entre os possíveis mecanismos envolvidos na RPM destacam-se os efeitos das proteases, tanto secretadas pela flora cérvico-vaginal como pelo

organismo materno, em resposta à corioamnionite. Os leucócitos que infiltram as membranas fetais, como parte da resposta inflamatória à corioamnionite, podem liberar elastase que, como a tripsina, degrada especificamente o colágeno tipo III, componente importante da estrutura das membranas²¹.

Mais de 30% dos nascimentos prematuros estão associados à invasão microbiana da cavidade amniótica ou evidência histológica de corioamnionite²². A presença de infecção intra-amniótica não é somente causa de parto prematuro ou rotura prematura de membranas, mas também está associada com aumento da morbimortalidade neonatal.

É conhecido que alta porcentagem de gestantes com parto prematuro ou rotura prematura de membranas apresenta corioamnionite ou pelo menos evidências de infecção subclínica e segundo Menon et al.²³ as membranas corioamnióticas são locais de produção de citocinas inflamatórias.

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, secretadas pelos leucócitos e outras células do organismo em resposta a uma variedade de estímulos, atuando como mediadores das células do sistema imune.

Desempenham papel importante em muitos mecanismos biológicos, incluindo os processos reprodutivos como ovulação, implantação, placentação, dilatação cervical, parto e rotura das membranas ovulares^{24,25}.

No processo de indução do trabalho de parto prematuro e de RPM, o mecanismo principal é a estimulação do metabolismo do ácido araquidônico em tecidos reprodutivos humanos^{24,26}. Na presença de infecção da cavidade amniótica, as células inflamatórias que infiltram os tecidos maternos aumentam a produção das citocinas²⁷. Segundo Dollner et al.²⁸, na presença de corioamnionite intensa, a concentração de citocinas pró-inflamatórias nos

tecidos placentários é significativamente elevada quando comparada à ausência de processo inflamatório.

Na presença de corioamnionite, o perfil de citocinas expresso nos tecidos placentários é o Th1²⁹. Do mesmo modo, nos casos de RPM as razões Th1/Th2 são maiores que em gestantes normais²⁹. Muitos estudos confirmam esses achados³⁰⁻³², e alguns estudos têm demonstrado que essas citocinas são deletérias para a gestação, já que em casos de abortos recorrentes níveis elevados de interferon γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) são descritos^{33,34}.

A análise do perfil de citocinas produzidas durante a gestação pode ser ferramenta importante para diagnóstico de complicações gestacionais. Nesse cenário, podemos destacar pré-eclâmpsia^{35,36}, restrição de crescimento intra-uterino³⁶, corioamnionite³⁷, trabalho de parto prematuro³⁸ e rotura prematura de membranas^{31,39}.

Dentre as citocinas estudadas nas complicações obstétricas, destacam-se interleucina (IL)1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α . A IL-1 β é um produto de monócitos / macrófagos, que atua como estimulador para linfócitos e timócitos, sendo ainda secretada por células de Hofbauer da placenta⁴⁰. Desempenha papel central na regulação da resposta inflamatória em tecidos lesados, sendo na infecção intrauterina produzida por células decíduais humanas em resposta a endotoxinas bacterianas²⁴. Em gestantes com corioamnionite clínica e histológica, a IL-1 β é expressa em células inflamatórias do cório e decídua, sendo os macrófagos a principal fonte dessa citocina nesses tecidos²⁷. Em parto prematuro com presença de infecção da cavidade amniótica, a IL-1 β está aumentada, e na ausência, a concentração é significativamente inferior²⁴. Para

Leviton⁴¹, a infecção uterina materna e o subsequente aumento de IL-1 β , TNF- α e IL-6 estiveram associados ao parto prematuro e à lesão neurológica desses recém-nascidos. Esta hipótese foi confirmada por Yoon et al.⁴², que relatam altos níveis de citocinas inflamatórias no líquido amniótico de gestantes que tiveram recém-nascidos com lesões cerebrais. Recentemente, Rodts-Palenik et al.⁴³ sugeriram que a terapia com IL-10, em ratas infectadas com *Escherichia coli*, pode fornecer neuroproteção aos recém-nascidos de mães com infecção intra-amniótica.

Níveis aumentados de IL-1 β são encontrados no parto na presença de RPM e infecção amniótica³⁹, revelando sua participação no momento da resolução da gestação. A IL-1, agindo sinergisticamente com TNF- α , induz produção de prostaglandina, conduzindo indiretamente ao parto⁴⁴. Esse efeito sinérgico também induz a produção de IL-6 pelo trofoblasto⁴⁵, potencializando a produção de prostaglandina, e conseqüentemente, aumentando a contratilidade uterina.

A ação da IL-1 β nos casos de RPM pode estar relacionada à sua capacidade de induzir apoptose em membranas fetais. Fortunato & Menon⁴⁶ obtiveram indução da atividade de caspases após estimulação de membranas fetais com IL-1 β recombinante. A ativação da cascata das caspases é um dos mecanismos de iniciação do processo de apoptose nas células das membranas corioamnióticas. A IL-1 ainda é conhecida por estar envolvida no processo de invasão trofoblástica, e que problemas na placentação, resultante de ativação anormal do sistema imune inato, pode desempenhar papel importante na etiologia da pré-eclâmpsia^{47,48}.

No contexto das citocinas inflamatórias e gestação, a IL-6 também tem seu papel avaliado nas complicações gestacionais. A exemplo da IL-1 β , é secretada por vários tipos celulares, dentre elas células endometriais, deciduais e macrófagos. Sua concentração aumentada no soro materno tem sido considerada um marcador para parto prematuro ou infecção uterina³¹. Muitos estudos revelam aumento dessa citocina também em secreção cervical⁴⁹, circulação fetal²⁸ e líquido amniótico³¹. Goffinet et al.⁴⁹ verificaram que em mulheres com parto prematuro e membranas ovulares intactas, a expressão aumentada de RNAm de IL-6 na secreção cervical estava associada a maior risco de infecção neonatal. Além disso, níveis elevados dessa citocina no soro do cordão umbilical de recém-nascidos prematuros aumentam o risco de morbidade neonatal⁵⁰. Lockwood et al.⁵¹, determinando a concentração de IL-6 na secreção cervical de pacientes com parto prematuro, concluíram que os níveis aumentados dessa citocina, quantificados entre a 24^a e 36^a semanas de gestação, estão relacionados com RPM, sendo que, em metade dos casos, níveis maiores que 250 pg/mL estão associados à RPM. A análise do líquido amniótico revelou que, em casos de RPM e parto prematuro, o aumento da concentração de IL-6 foi maior que em casos de somente parto prematuro, demonstrando que a própria RPM é capaz de induzir aumento de IL-6. Estudo realizado em gestantes com RPM mostrou que quase a totalidade dos casos de RPM com infecção tiveram elevados níveis de citocinas no líquido amniótico, e aproximadamente metade desses casos esteve associada com elevação dos níveis de citocinas no soro materno³⁹. Além disso, quando há presença de corioamnionite e RPM, a produção de IL-6 pelos tecidos placentários é maior^{39,52}. Dollner et al.²⁸ demonstraram que em corioamnionite

severa a concentração de IL-6, além de outras citocinas pró-inflamatórias, foi mais alta que na ausência da infecção. De acordo com esses resultados, considera-se que a IL-6 desempenha papel fisiológico nos mecanismos do parto⁵².

A IL-8 é uma citocina que induz quimiotaxia neutrofílica, tendo função importante no mecanismo de defesa do hospedeiro. É produzida pela placenta humana durante a gestação⁵³ e detectada no líquido amniótico a partir do segundo trimestre da gestação normal¹⁸. Níveis elevados de IL-8 são detectados no líquido amniótico durante infecções por microrganismos presentes nos tecidos materno-fetais⁵⁴, havendo correlação entre a concentração dessa citocina e o número de neutrófilos presentes no líquido amniótico. Esses dados são confirmados por outros estudos^{27,36}, considerando assim que a determinação de IL-8 no soro materno é um método sensível para avaliar presença de corioamnionite, comparado com métodos convencionais³¹. Por outro lado, Witt et al.³² não demonstraram aumento de IL-8 no soro materno em casos de corioamnionite, revelando que a resposta inflamatória parece afetar mais os compartimentos fetais. Assim, quando somente o soro materno for avaliado, os melhores parâmetros para detectar infecção são contagem de células brancas e proteína C reativa. Ainda segundo esses autores existe relação positiva entre aumento de IL-8 no líquido amniótico e infecção e esse aumento não foi verificado em infecções por outros patógenos. Por outro lado, em trabalho recente, Marconi⁵⁵ descreveu que níveis aumentados de IL-1 β e IL-6 estão associados à infecção polimicrobiana na cavidade amniótica em gestantes com parto prematuro, porém essa associação não foi verificada para IL-8 e TNF- α . Em outras patologias da

gestação, o comportamento da IL-8 parece controverso. A concentração dessa citocina no soro materno durante o primeiro trimestre de gestação não foi diferente entre grupos de mulheres grávidas com e sem hiperemese⁵⁶. Por outro lado, níveis aumentados de IL-8 foram encontrados em mulheres com gravidez ectópica comparadas a gestantes normais⁵⁷.

O TNF- α tem sido detectado nas células de Hofbauer e decíduais, atuando como regulador da proliferação celular na unidade feto-placentária, já que o papel dessa citocina no aumento do mecanismo de apoptose está bem documentado^{58,59}. Estimulação das membranas corioamnióticas com TNF- α levou a 80% de apoptose nesses tecidos⁴⁶. No mesmo contexto, Daher et al.³³ demonstraram que TNF- α prejudica o crescimento e função de células trofoblásticas *in vitro*.

O TNF- α tem propriedades similares à IL-1 β , sendo secretado por macrófagos ativados. A identificação de TNF- α na decídua humana e de seus receptores nas células placentárias, sugere que o TNF- α desempenha papel fundamental na rede de citocinas produzidas na gestação⁶⁰. No líquido amniótico de gestantes com infecção intra-amniótica, os níveis dessa citocina encontram-se mais elevados do que em gestantes sem infecção⁶¹. A presença de corioamnionite foi associada à alta expressão de citocinas como TNF- α nas membranas fetais, devido à intensa infiltração de polimorfonucleares.

Fortunato et al.⁶² descreveram que lipopolissacarídeo (LPS) induz a produção de TNF- α em membranas corioamnióticas. Porém, segundo estes mesmos autores, quando há associação de estímulo com LPS e imunorregulação com IL-10, ocorre diminuição dose-dependente da produção de RNAm de TNF- α .

A decídua materna é fonte potencial de TNF- α . Casey et al.⁶³ mostraram que cultura de células decíduais estimuladas com LPS produzem TNF- α . Vince et al.⁶⁴ observaram que TNF- α , no primeiro trimestre de gestação, é produzido primariamente em macrófagos decíduais, enquanto que no terceiro trimestre células decíduais e células trofoblásticas contêm RNAm de TNF- α .

Na literatura, a pesquisa de TNF- α em mulheres com pré-eclâmpsia tem mostrado resultados conflitantes, ao serem relatados tanto níveis semelhantes aos de gestação normal⁶⁵, como aumentados em relação às mesmas⁶⁶. Peraçoli et al.⁶⁷ avaliaram a produção de TNF- α em gestantes com pré-eclâmpsia, determinando os níveis plasmáticos maternos e a capacidade de produção dessa citocina por monócitos estimulados por LPS. Os resultados obtidos foram de níveis significativamente elevados de TNF- α no plasma materno e produzidos por monócitos, estimulados ou não com LPS em relação às gestantes normais. Segundo Martins⁶⁸ os monócitos de gestantes normais e com pré-eclâmpsia estão ativados *in vivo*, produzindo níveis elevados de TNF- α .

A interleucina 18 (IL-18) é uma citocina pró-inflamatória que foi originalmente caracterizada como indutora de IFN- γ ⁶⁹. Esta citocina pertencente à família da IL-1, é produzida por uma variedade de células, incluindo monócitos, macrófagos, células de Kupffer, células T, células B, osteoblastos, ceratinócitos e astrócitos, sendo as principais células produtoras os monócitos e macrófagos. Atua como forte estimuladora da resposta Th₁, agindo sinergisticamente com IL-12. A IL-18 é ativadora de células natural killer⁷⁰ e ativadora de outras citocinas do padrão Th₁ de resposta. Também é encontrada na interface materno-fetal, pois é expressa por células coriônicas e

deciduais⁷¹, porém poucos estudos avaliaram a participação de IL-18 nas complicações gestacionais⁷²⁻⁸¹.

Segundo Huang et al.⁷⁷, níveis séricos e placentários de IL-18 estão significativamente aumentados na pré-eclâmpsia quando comparados com gestações normais, sugerindo que a resposta inflamatória está presente no sítio placentário na pré-eclâmpsia e que o aumento da expressão de IL-18 no tecido placentário contribua para elevação dos níveis séricos de IL-18.

Por outro lado, em estudo caso-controle, Adams et al.⁷³ descreveram que os níveis séricos de IL-18 são similares em gestantes com pré-eclâmpsia e normotensas. Ainda segundo esses autores, não existe correlação entre os níveis de IL-18 e idade gestacional, tanto nas gestações normais como nas gestações complicadas pela pré-eclâmpsia. Nesse sentido, Sakai et al.⁷⁵ determinando as concentrações de IL-18, em culturas de sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico não estimuladas, descreveram que não foi detectada diferença significativa entre gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia e que a relação IL-18/IL-12 em gestantes com pré-eclâmpsia esteve significativamente diminuída.

A IL-18 participa de processos inflamatórios por estimulação de IFN- γ , TNF- α e IL-1 β ^{71,82} e está presente no líquido amniótico, soro materno e fetal.

Concentrações aumentadas de IL-18 no soro foram estatisticamente significativas em gestantes, já no início da gestação, quando comparadas com mulheres não grávidas⁸⁰. Segundo a literatura^{72,74,80}, níveis de IL-18 estão elevados no soro de gestantes em trabalho de parto prematuro e em gestações complicadas por restrição de crescimento intra-uterino ou rotura prematura de membranas. Segundo Ekelund et al.⁷⁴ o risco de parto

premature, com idade inferior a 34 semanas, esteve aumentado na presença da combinação de níveis baixos de IL-18 e elevados de IL-12. Pacora et al.⁷² contrariando Adams et al.⁷³ descrevem que as concentrações de IL-18 no líquido amniótico aumentam com a idade gestacional, e sugerem o papel dessa citocina no desenvolvimento gestacional. Ainda segundo esses autores, gestantes com trabalho de parto prematuro e invasão da cavidade amniótica apresentam níveis elevados de IL-18. Em contraste, a invasão da cavidade amniótica de pacientes com RPM-PT não esteve associada com aumento da concentração de IL-18. Esses achados foram corroborados por Jacobson et al.⁸¹.

Em conjunto, a presença de citocinas pró e anti-inflamatórias produzidas nos tecidos gestacionais, sugere que mecanismos de imunidade, importantes na defesa contra infecções, estejam agindo na interface materno-fetal. Muitas dessas citocinas estão envolvidas na indução da síntese de prostaglandina e/ou expressão do receptor para ocitocina. Assim, o estudo de citocinas com atividade pró-inflamatória, poderá contribuir para melhor compreensão do papel das citocinas na rotura prematura de membranas pré-termo.

Referências Bibliográficas*

1. Lee T, Silver H. Etiology and epidemiology of preterm premature rupture of the membranes. Clin Perinatol 2001; 28: 721-34.
2. Gibbs RS, Blanco JD. Premature rupture of membranes. Obstet Gynecol 1982; 60: 671-9.
3. Savitz DA, Blackmore CA, Thorp JM. Epidemiologic characteristics of preterm delivery: etiologic heterogeneity. Am J Obstet Gynecol 1991; 164: 467-71.
4. Mossman HW. Vertebrate fetal membranes. New Jersey: Rutgers University Press, 1987.
5. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. Obstet Gynecol. 2003;101:178-93.
6. Karat C, Madhivanan P, Krupp K, Poornima S, Jayanthi NV, Suguna JS, et al. The clinical and microbiological correlates of premature rupture of membranes. Indian J Med Microbiol 2006; 24: 283-5.
7. Blas MM, Canchihuaman FA, Alva IE, Hawes SE. Pregnancy outcome in woman infected with *Chlamydia trachomatis*: a population-based cohort study in Washington State. Sex Transm Infect 2007; 83: 314-8.
8. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. Semin Neonatol 2006; 11: 317-26.
9. Miller HC, Jekel JF. Epidemiology of spontaneous premature rupture of membranes: factors in preterm births. Yale J Biol Med 1989; 62: 241-51.
10. Harger JH, Hsing AW, Tuomala RE, Gibbs RS, Mead PB, Eschenbach DA, et al. Risk factors for preterm premature rupture of fetal membranes: a multicenter case-control study. Am J Obstet Gynecol 1990; 163: 130-7.
11. Meyer MB, Tonascia JA. Maternal smoking, pregnancy complications, and perinatal mortality. Am J Obstet Gynecol 1977; 128: 494-502.
12. Naye RL. Factors that predispose to premature rupture of the fetal membranes. Obstet Gynecol 1982; 60:93-8.
13. Soper DE, Mayhall CG, Dalton HP. Risk factors for intraamniotic infection: A prospective epidemiologic study. Am J Obstet Gynecol 1989; 161: 562-8.
14. Newton ER. Chorioamnionitis and intraamniotic infection. Clin Obstet Gynecol 1993; 36: 795-808.

*Elaboradas de acordo com o International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals. Ann Intern Med 1997; 126:36-47.

15. Üstün C, Kocak I, Baris S, Uzel A, Saltik F. Subclinical chorioamnionitis as an etiologic factor in preterm deliveries. *Int J Gynaecol Obstet* 2001; 72:109-15.
16. Simhan HN, Caritis SN, Krohn MA, Tejada BM, Landers AV, Hillier SL. Decreased cervical pro-inflammatory cytokines permit subsequent upper genital tract infection during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189:560-7.
17. Benirschke K. Routes and types of infection in the fetus and the newborn. *Am J Dis Child* 1965; 28: 714-7.
18. Romero R, Hanaoka S, Mazor M, Athanassiadis P, Callahan R, Hsu YC, et al. Meconium-stained amniotic fluid: a risk factor for microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 859-62.
19. Galask RP, Varner MW, Petzold CR, Wilbur SL. Bacterial attachment to the chorioamniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148: 915-28.
20. Gyr TN, Malek A, Mathez-Loic F, Altermatt HJ, Bodmer T, Nicolaides K, et al. Permeation of human chorioamniotic membranes by *Escherichia coli* in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 223-7.
21. Allen SR. Epidemiology of premature rupture of the fetal membranes. *Clin Obstet Gynecol* 1991; 34: 685-91.
22. Jacobsson B, Mattsby-Balrtzer I, Andersch B, Bokstrom H, Holst RM, Nikolaitchouk N, et al. Microbial invasion and cytokine response in fluid amniotic in a Swedish population of women with preterm prelabor rupture of membranes. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82: 423-31.
23. Menon R, Swan KF, Lyden TW, Rote NS, Fortunato S. Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1 β and interleukin-6) in amniochorionic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 493-500.
24. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T. Cytokine production in chorioamnionitis. *J Reprod Immunol* 2000;47:185-96.
25. Laham N, Brennecke SP, Rice GE. Interleukin-8 release from human gestational tissue explants: effect of gestation, labor and chorioamnionitis. *Biol Reprod* 1999; 61: 823-7.
26. Edwin SS, LaMarche SL, Thai D, Branch DW, Mitchell MD. 5-hydroxyeicosatetraenic acid biosynthesis by gestational tissues: Effects of inflammatory cytokines. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:1467-71.
27. Kauma SW, Johnson DE. The expression and localization of IL-1 β mRNA in chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 1994;163:1430-7.

28. Dollner H, Vatten L, Halgunset J, Rahimipour S, Austgulen R. Histologic chorioamnionitis and umbilical serum levels of pro-inflammatory cytokines and cytokine inhibitors. *Br J Obstet Gynaecol* 2002; 109: 534-9.
29. Wilczynski, JR. Th1/Th2 cytokines balance – *yin* and *yang* of reproductive immunology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 122: 136-43.
30. Murtha AP, Greig PC, Jimmerson CE, Herbert WNP. Maternal serum interleukin-6 concentration as a marker for impending preterm delivery. *Obstet Gynecol* 1998; 91:161-4.
31. Fukuda H, Masuzaki H, Ishimaru T. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in amniotic fluid and cord blood in patients with preterm, premature rupture of the membranes. *Int J Gynecol Obstet* 2002; 77:123-9.
32. Witt A, Berger A, Gruber CJ, Petricevic L, Apfalter P, Husslein P. IL-8 concentrations in maternal serum, amniotic fluid and cord blood in relation to different pathogens within the amniotic cavity. *J Perinat Med* 2005; 33: 22–6.
33. Daher S, Denardi KAG, Blotta MHSL, Mamoni RL, Reck APM, Camano L, et al. Cytokines in recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2004; 62: 151-7.
34. Gücer F, Balkanlı-Kaplan P, Yüksel M, Sayin NC, Yüce MA, Yardim T. Maternal serum levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-2 receptor in threatened abortion: a comparison with normal and pathologic pregnancies. *Fertil Steril* 2001; 76: 707-9.
35. Lamarca BD, Ryan MJ, Gilbert JS, Murphy Sr, Granger JP. Inflammatory cytokines in the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. *Curr Hypertens Rep* 2007; 9: 480-5.
36. Laskowska M, Laskowska K, Leszczynska-Gorzela B, Oleszczuk J. Comparative analysis of the maternal and umbilical interleukin-8 levels in normal pregnancies and in pregnancies complicated by preeclampsia with intrauterine normal growth and intrauterine growth retardation. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007; 20: 527-32.
37. Holst RM, Laurini R, Jacobsson B, Samuelsson E, Savman K, Doverhaq C, et al. Expression of cytokines and chemokines in cervical and amniotic fluid: relationship to histological chorioamnionitis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007; 20: 885-93.
38. Orsi NM, Tribe RM. Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 462-9.

39. Shobokshi A, Shaarawy M. Maternal serum and amniotic fluid cytokines in patients with preterm premature rupture of membranes with and without intrauterine infection. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 79: 209-15.
40. Hill JA. Cytokines considered critical in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1992; 28: 123-6.
41. Leviton A. Preterm birth and cerebral palsy: is tumor necrosis factor the missing link? *Dev Med Child Neurol* 1993; 35: 553-8.
42. Yoon BH, Romero R, Jun JK, Park KH, Park JD, Ghezzi F, et al. Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:19-26.
43. Rodts-Palenik S, Pang Y, Barrilleaux PS, Thigpen B, Cai Z, Rodes P, et al. Maternal interleukin-10/antibiotic therapy suppresses the fetal brain inflammatory response. *Proceed Society Maternal-Fetal Med* 2003; 2: 3-8.
44. Bry K, Hallman M. Synergistic stimulation of amnion cell prostaglandin E2 synthesis by interleukin-1, tumor necrosis factor and products from activated human granulocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1991; 44: 241-5.
45. Li Y, Matsuzaki N, Masuhiro K, Kameda T, Taniguchi T, Saji, F, et al. Trophoblast-derived tumor necrosis factor- α induces release of human chorionic gonadotropin using interleukin-6 (IL-6) and IL-6-receptor-dependent system in the normal human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 184-91.
46. Fortunato SJ, Menon R. IL-1 β is a better inducer of apoptosis in human fetal membranes than IL-6. *Placenta* 2003; 24: 922–8.
47. Chen HL, Yang YP, Xu XL, Yelavarthi KK, Fishback JL, Hunt JS. Tumor necrosis factor-alpha mRNA and protein are present in human placental and uterine cells at early and late stages of gestation. *Am J Pathol* 1991; 139: 327-35.
48. Simon C, Frances A, Piquette G, Hemdrii C, Son M, Milki A, et al. Interleukin-1 system in the matern-trophoblast unit in human implantation: immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 78: 847-54.
49. Goffinet F, Kayem G, Maillard F, Trebeden H, Cabrol D, Weill B, et al. Detection of interleukin 6 mRNA by RT-PCR in vaginal secretions: association with preterm delivery and neonatal infection in women with preterm labour and intact membranes. *Europ J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005, 123: 167–73.

50. Goepfert AR, Andrewa WW, Carlo W, Ramsey PS, Cliver SP, Goldenberg RL, et al. Umbilical cord plasma interleukin-6 concentrations in preterm infants and risk of neonatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191:1375-81.
51. Lockwood CJ, Ghidini A, Wein R, Lapinski R, Casae D, Berkowitz RL. Increased interleukin-6 concentrations in cervical secretions are associated with preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 1097-102.
52. Gomez R, Romero R, Edwin SS, David C. Pathogenesis of preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. *Infect Dis Clin North Am* 1997, 11: 135-75.
53. Shimoya K, Moriyama A, Matsuzaki N. Human placental cells show enhanced production of interleukin (IL)-8 in response to lipopolysaccharide (LPS), IL-1 and tumour necrosis factor TNF (-alpha), but not to IL-6. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 885-9.
54. Hsu CD, Meaddough E, Aversa K, Copel JA. The role of amniotic L-secretin, GRO- α , and interleukin-8 in the pathogenesis of intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 428-32.
55. C Marconi. Interleucina 1 β e interleucina 6 no líquido amniótico: relação com invasão microbiana da cavidade amniótica em gestantes em trabalho de parto prematuro. [Dissertação]. Botucatu. Faculdade de Medicina de Botucatu. 2008.
56. Kaplan PB, Gücer F, Sayin NC, Yüksel M, Yüce MA, Yardim T. Maternal serum cytokine levels in women with hyperemesis gravidarum in the first trimester of pregnancy. *Fertil Steril* 2003, 79: 498-502.
57. Soriano SD, Hugol D, Quang NT, Darai E. Serum concentrations of interleukin-2R (IL-2R), IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor alpha in patients with ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 2003, 79: 975-80.
58. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Role of tumor necrosis factor-alpha in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187: 1159-62.
59. Yui J, Garcia-Loret M, Wegmsnn TG, Guilbert LJ. Cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 1994, 15: 819-35.
60. Eades DK, Corneium P, Pekala PH. Characterization of tumor necrosis factor receptor in human placenta. *Placenta* 1988; 9: 247-51.
61. Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, Wu YK, Oyarzun E, Hobbins JC, et al.

- Infection and labor. IV. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 336-41.
62. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. The effect of transforming growth factor and interleukin-10 on interleukin-8 release by human amniochorion may regulate histologic chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 794-9.
 63. Casey ML, Cox SM, Beuther B, Milewich L, MacDonald PC. Cachectin/ tumor necrosis factor α formation in the human decidua: potential role of cytokines in infection-induced preterm labor. *J Clin Invest* 1989; 83: 430-6.
 64. Vince G, Shorter S, Starkey P, Humphreys J, Clover L, Wilkins T, et al. Localization of tumor necrosis factor production in cells at the materno-fetal interface in human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1992; 88:174-80.
 65. Omu AE, Al-Qaltan F, Diejomoo ME, Al-Yatama M. Differential levels of T helper cytokines in preeclampsia: pregnancy, labor and puerperium. *Acta Gynecol Scand* 1999; 78: 675-80.
 66. Benyo DF, Smarason A, Redman CWG, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2505-12.
 67. Peraçoli JC, Rudge MV, Peraçoli MT. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestacional hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2007; 57: 177-85.
 68. Martins RAR. Atividade de monócitos em gestantes normais e com pré-eclâmpsia. [Dissertação]. Botucatu. Faculdade de Medicina de Botucatu. 2002.
 69. Dinarello CA. Interleukin 18. *Methods* 1999; 19: 121-32.
 70. Matsumoto S, Tsuji-Takayama K, Aizawa Y, Koide K, Takeuchi M, Ohta T, et al. Interleukin 18 activates NF-KappaB in murine T helper type I cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234: 454-7.
 71. Menon R, Lombardi SJ, Fortunato SJ. IL-18, a product of choriodecidual cells, increases during premature rupture of membranes but fails to turn on the Fas-FasL-mediated apoptosis pathway. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 276-84.
 72. Pacora P, Romero R, Mayamon E, Gervasi MT, Gomez R, Edwin SS, et al. Participation of the novel cytokine interleukin 18 in the host response to intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 1138-43.

73. Adams KM, Mandel LS, Guthrie KA, Atkinson MW. Interleukin-18 in the plasma of women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 1234-7.
74. Ekelund CK, Vogel I, Skogstrand K, Thorsen P, Hougaard DM, Langhoff-Roos J, et al. Interleukin-18 and interleukin-12 in maternal serum and spontaneous preterm delivery. *J Reprod Immunol* 2008; 77: 179-85.
75. Sakai M, Shiozaki A, Sasaki Y, Yoneda S, Saito S. The ratio of interleukin (IL)-18 to IL-12 secreted by peripheral blood mononuclear cells is increased in normal pregnant subjects and decreased in pre-eclamptic patients. *J Reprod Immunol* 2004; 61: 133-43.
76. Naeimi S, Ghiam AF, Mojtahedi Z, Dehaghani AS, Amani D, Ghaderi A. Interleukin-18 gene promoter polymorphisms and recurrent spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 128: 5-9.
77. Huang X, Huang H, Dong M, Yao Q, Wang H. Serum and placental interleukin-18 are elevated in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2005; 66: 77-87.
78. Wang X, Hagberg H, Mallard C, Zhu C, Hedtjarn M, Tiger CF, et al. Disruption of interleukin-18, but not interleukin-1, increases vulnerability to preterm delivery and fetal mortality after intrauterine inflammation. *Am J Pathol* 2006; 169: 967-76.
79. Wilson R, Moor J, Jenkins C, Miller H, Walker JJ, McLean MA, et al. Abnormal first trimester serum interleukin-18 levels are associated with a poor outcome in women with a history of recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 2004; 51:156-9.
80. Ida A, Tsuji Y, Muranaka J, Kanazawa R, Nakata Y, Adachi S, et al. IL-18 in pregnancy; the elevation of IL-18 in maternal peripheral blood during labour and complicated pregnancies. *J Reprod Immunol* 2000; 47: 65-74.
81. Jacobsson B, Holst RM, Mattsby-Baltzer I, Nikolaitchouk N, Wennerholm UB, Hagberg H. Interleukin-18 in cervical mucous and amniotic fluid: relationship to microbial invasion of the amniotic fluid, intraamniotic inflammation and preterm delivery. *BJOG* 2003; 110: 598-603.
82. Tokmadzic VS, Tsuji Y, Bogovic T, Laskarin G, Cupurdija K, Strbo N, et al. IL-18 is present at the maternal-fetal interface and enhances cytotoxic activity of decidual lymphocytes. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48: 20-5.

Expressão de IL-18 por PCR em tempo real em membranas corioamnióticas de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo

Vieira EP¹, Pereira AC¹, Poletini J¹, Marconi C¹, Peraçoli JC², Silva MG¹

¹ Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

² Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Resumo

Introdução: A rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT), é uma das principais causas de prematuridade, ocorrendo em 30% a 40% dos nascimentos prematuros. Sua etiologia está relacionada à ascensão bacteriana do trato genital inferior para a decídua e membranas corioamnióticas. **Objetivo:** Quantificar a expressão de IL-18 pelas membranas corioamnióticas de gestantes com RPM-PT e avaliar a relação dessa expressão com a presença de corioamnionite histológica. **Material e Métodos:** Foram incluídas no estudo 30 gestantes com RPM-PT em trabalho de parto e 20 gestantes com RPM-PT fora do trabalho de parto. Como grupo controle, foram avaliadas 30 gestantes normais, fora de trabalho de parto, que tiveram indicação de cesárea para resolução da gestação de termo. No momento da resolução da gestação, após a dequitação, foram retirados fragmentos das membranas corioamnióticas e acondicionados em *RNA later* para posterior quantificação do RNAm de interleucina (IL)-18 pela técnica de PCR em tempo real. Outros fragmentos das membranas foram submetidos à análise histopatológica para avaliação da presença de corioamnionite. **Resultados:** No período do estudo, a incidência de RPM-PT foi de 6,2%. A presença de corioamnionite foi de 44% no grupo RPM-PT. A concentração relativa de RNAm de IL-18 não foi estatisticamente diferente nos grupos estudados. Não houve relação entre concentração relativa de RNAm de IL-18 e presença de corioamnionite. **Conclusão:** A RPM-PT não é capaz de induzir aumento na concentração relativa de RNAm de IL-18 e não existe relação entre expressão relativa dessa citocina e corioamnionite.

Detection of IL-18 mRNA by real time PCR in chorioamniotic membranes from the pregnant women with preterm premature rupture of membranes

Vieira EP¹, Pereira AC¹, Poletini J¹, Marconi C¹, Peraçoli JC², Silva MG¹

¹ Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

² Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Abstract

Introduction: Preterm premature rupture of the membranes (PPROM) is one of the major causes of prematurity, accounting for 30-40% of all preterm births. Its etiology is related to the ascending pathway of bacteria from the lower genital tract to the decidua and chorioamniotic membranes. **Objective:** To quantify the expression of the inflammatory cytokine interleukin-18 in the chorioamniotic membranes of pregnant women with PPRM and evaluate the correlation of this expression with the presence of the chorioamnionitis present in the membranes. **Material and Methods:** Thirty PPRM women in labor and 20 PPRM without labor women were studied. As a control group 30 normal pregnant that underwent selective cesarean section without labor were studied. After delivery, samples of the chorioamniotic membranes were collected for histopathological analyses and others fragments were conditioned in *RNA later* for posterior quantification of cytokine mRNA expression by real time PCR. **Results:** In the study period, the incidence of PPRM was 6.2% and in 44% of these samples the presence of chorioamnionitis was observed. mRNA expression of IL-18 was not statistically different in the groups studied. No difference occurred in the presence of chorioamnionitis in the membranes and the concentration of IL-18 mRNA. **Conclusion:** The concentration of IL-18 mRNA in the chorioamniotic membranes was not statistically different in the groups studied and this cytokine in PPRM is not related with the presence of the chorioamnionitis in the membranes.

1. Introdução

A rotura espontânea das membranas ovulares ou amniorrexe é um acontecimento normal durante o trabalho de parto, ocorrendo rotineiramente após o início do mesmo. Quando precede o início do trabalho de parto é intitulada de rotura prematura de membranas. Sua ocorrência em idade gestacional inferior a 37 semanas recebe a denominação de rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT)^{1,2}.

Pela associação com nascimento prematuro e morbidade perinatal², a RPM é objeto de muitos estudos epidemiológicos e clínicos, na tentativa de identificar fatores de risco. Esses fatores são múltiplos, incluindo-se raça³, tabagismo^{4,5}, atividade sexual⁶, deficiência materna de zinco⁷ ou vitamina C⁸, cirurgia cervical prévia⁶, gemelaridade, sangramento vaginal durante a gestação, polidrâmnio, hipertensão e diabetes materna⁹⁻¹², vaginose bacteriana¹² e infecção da cavidade amniótica, sendo essa última associada à maioria dos casos de RPM-PT¹³⁻¹⁵.

A invasão da cavidade amniótica e infecção intra-amniótica induzem resposta inflamatória materna e fetal, caracterizada pela presença de corioamnionite histológica e aumento da produção de citocinas inflamatórias. Trabalhos relatam elevadas concentrações de citocinas no líquido amniótico^{16,17} e tecidos gestacionais¹⁸ de gestantes com RPM-PT e infecção da cavidade amniótica.

De acordo com Menon et al.¹⁸, as membranas corioamnióticas são locais de produção de citocinas inflamatórias. Esses mediadores do sistema imune são moléculas-chave no processo de indução da RPM-PT, pois segundo Fortunato et al.¹⁹, a biodisponibilidade do fator de necrose tumoral (TNF- α), a

apoptose e a atividade de metaloproteinases são mecanismos responsáveis pela rotura prematura de membranas.

Além do TNF- α , níveis elevados de interleucina (IL)-18 na RPM-PT tem sugerido seu papel no processo de apoptose nas membranas pela via Fas-Fas ligante²⁰.

Vários trabalhos descrevem a interação das citocinas inflamatórias nas complicações gestacionais²¹⁻²⁵. Níveis elevados de IL-18 têm sido demonstrados na gestação normal e em complicações gestacionais como trabalho de parto prematuro²⁶⁻²⁸, pré-eclâmpsia²⁹⁻³¹ e restrição de crescimento intra-uterino²⁶, porém, poucos estudos correlacionaram IL-18 e RPM-PT^{26,27}.

Considerando que a IL-18 é importante na defesa do hospedeiro na presença de infecção via indução de outras citocinas e que a literatura é escassa de trabalhos demonstrando o envolvimento de IL-18 nas complicações gestacionais, particularmente na RPM-PT e corioamnionite, o objetivo desse estudo foi quantificar a expressão de RNAm de IL-18 pelas membranas corioamnióticas de gestantes com RPM-PT bem como avaliar a relação dessa expressão com a presença de corioamnionite.

2. Material e Métodos

2.1. Casuística

No período de julho de 2006 a novembro de 2007, foram estudadas 30 pacientes com gestação única, cuja rotura de membranas ovulares tenha ocorrido espontaneamente entre a 26^a e 36^a semanas de gestação e que estavam em trabalho de parto e 20 gestantes com RPM-PT fora do trabalho de parto. Gestantes portadoras de diabetes, anomalias fetais congênitas comprovadas, placenta prévia, infecção urinária ou outras infecções foram excluídas do estudo. Como grupo controle, foram avaliadas 30 gestantes normais, fora de trabalho de parto, atendidas no Serviço de Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e que tiveram indicação de cesárea para resolução da gestação de termo.

A idade gestacional foi estabelecida pela data da última menstruação e por exame ultra-sonográfico precoce (até 20 semanas). O tempo de rotura das membranas na admissão da paciente foi obtido por informação materna.

O diagnóstico de RPM foi confirmado pela história clínica e constatação de líquido amniótico na cavidade vaginal ou quando isto não fosse possível, por meio de testes realizados na secreção do fundo de saco vaginal: cristalização do esfregaço em lâmina seca, queima de esfregaço em lâmina, pH vaginal e pesquisa de células fetais pela coloração do azul de Nilo³².

As pacientes permaneceram internadas na Enfermaria de Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, sendo controladas clinicamente por meio de avaliação da frequência cardíaca e temperatura a cada 6 horas e,

laboratorialmente por hemograma em dias alternados até a resolução da gestação.

Todas as gestantes envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento esclarecido (Anexo1), tendo sido o projeto de pesquisa enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (Anexo 2).

2.2. Coleta de membranas corioamnióticas e análise histopatológica

No momento da resolução da gestação, logo após a dequitação, foram colhidas membranas corioamnióticas das gestantes com RPM-PT em trabalho de parto e fora de trabalho de parto e das gestantes normais. Foram retirados fragmentos de um cm² da borda das membranas, com bisturi, que foram acondicionados em tubos de 1,5 mL tipo *ependorf* contendo RNA later (RNA Stabilization Reagent – Qiagen) por 4 horas e após esse período foram armazenados a -70°C para posterior semi-quantificação do RNA mensageiro pela técnica de PCR em tempo real. Após esses procedimentos, as membranas foram acondicionadas em recipiente apropriado, contendo formalina a 10%, por 24 horas para fixação. Fragmentos das membranas corioamnióticas foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol e a seguir incluídos em blocos de parafina. Os blocos obtidos foram seccionados em micrótomo comum, obtendo-se cortes de 6 µm de espessura que foram montados em lâminas de vidro. As lâminas foram coradas pelo método clássico de Hematoxilina-Eosina (HE) para a análise histopatológica das membranas. O critério histopatológico empregado para diagnóstico de corioamnionite foi o descrito por Hargitai et al.³³.

2.3. Detecção de IL-18 por PCR em tempo real

2.3.1. Extração de RNA

Os fragmentos de membranas corioamnióticas armazenados em tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL contendo RNA later foram submetidos à extração de RNA total, usando o RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente foi determinada a quantidade de 30 mg de tecido a ser macerado em N₂ líquido, com posterior adição de 350µL de tampão RA1, acrescido de β-mercaptoetanol e lisado no vórtex. A seguir, o tecido lisado foi transferido para um filtro com tubo coletor e centrifugado por 1 minuto a 11.000g. Após a centrifugação, o filtro foi descartado e o filtrado transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Foram adicionados 350µL de etanol 70% e homogeneizado no vórtex duas vezes. Posteriormente o lisado foi transferido para a coluna com membrana gel-sílica e centrifugado por 30 segundos a 8.000g. Em seguida foram adicionados 350 µL de tampão MBD e centrifugados por 1 minuto a 11.000g para a secagem da membrana. O filtrado foi descartado e o tubo coletor retornado à coluna. Após esse procedimento, as amostras foram então submetidas ao tratamento com a enzima DNase livre de RNase, com objetivo de eliminar possível contaminação com DNA residual genômico. A seguir, foram adicionados 200 µL de tampão RA2 com centrifugação por 1 minuto a 8.000g, e as colunas foram transferidas para novos tubos coletores. Seguindo o processo de lavagem da membrana, foram adicionados 600 µL de tampão RA3, centrifugados por 1 minuto a 11.000g e, após descarte do conteúdo do tubo coletor, foram adicionados 250 µL de

tampão RA3, centrifugados por 2 minutos a 11.000g. As colunas foram transferidas para novos tubos e o RNA foi eluído em 40 µL de água RNase-free, com posterior centrifugação por 1 minuto a 11.000g. O RNA extraído foi quantificado pela leitura em biofotômetro (Eppendorf), na densidade óptica de 260nm.

A eficácia desse tratamento foi verificada por amplificação do gene constitutivo da β-globina por PCR direta de cDNA obtido, e visualização em gel de agarose 1,5%. As amostras que não apresentaram essa amplificação foram consideradas no estudo.

2.3.2. Obtenção de cDNA

Em seguida à extração de RNA, as amostras com concentração entre 0,02 e 0,2µg/ µL de RNA foram submetidas à obtenção de cDNA utilizando-se o *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA produzido foi quantificado por biofotômetro (Eppendorf), na densidade óptica de 260 nm e armazenado a -70°C para posterior utilização na detecção e quantificação das citocinas pela técnica da PCR em tempo real.

2.3.3. PCR em tempo real

A partir do cDNA obtido foi efetuada a amplificação dos genes da citocina IL-18 (Hs 00155517_m1) de acordo com o protocolo da Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays em ABI Prism® 7300 Sequence Detector, em volume final de 20 µL com adição de 5 µL de cDNA das amostras na diluição 1:10. As condições da reação foram de 95°C por 10

minutos, seguidos de 40 ciclos compostos por 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, sendo os sinais de fluorescência adquiridos nos passos de anelamento e extensão do ciclo de amplificação (60 °C por 1 minuto). Em todos os ensaios, as amostras foram processadas em duplicata. Paralelamente, foi realizada a amplificação do gene da β -actina, como controle endógeno, visto que o valor real de expressão gênica foi dado através da comparação do resultado de amplificação dos genes da citocina e desse gene constitutivo.

O cDNA de referência para a citocina estudada consistiu de uma mistura de vários cDNAs produzidos a partir do RNA das próprias amostras das membranas corioamnióticas incluídas no estudo. Esse cDNA foi diluído na razão de 1:2 a 1:128 em água ultrapura estéril e estas diluições foram testadas, em duplicatas, na PCR em tempo real para IL-18 e para o gene da β -actina. Pela determinação do *baseline*, *threshold* e dos Ct (*cycle threshold*) produzidos por cada diluição, a curva padrão foi estabelecida de acordo com os dados fornecidos pelo programa SDS versão 1.2.3 ("Sequence Detection Systems" 1.2.3 – 7300 Real Time PCR System – Applied Biosystems). As quatro diluições que apresentaram Ct entre os ciclos 25 e 35 foram escolhidas para constituir a curva padrão utilizada em todas as reações. A menor diluição do cDNA de referência recebeu o valor relativo igual a 100 e, seguindo a mesma razão da diluição, as outras três diluições do cDNA foram determinadas como 50; 25 e 12,5, e foram consideradas como referência na quantificação relativa da expressão dos genes da IL-18. A concentração de cada amostra testada foi fornecida diretamente pelo programa SDS 1.2.3, calculada em relação à curva padrão e ao valor igual a 100, estabelecido para o cDNA de referência.

2.4. Análise Estatística

Os dados referentes à idade materna, idade gestacional no momento do parto e concentração relativa de RNAm de IL-18 nos grupos estudados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. As variáveis estado civil, raça, hábito de fumar, bem como as características obstétricas das pacientes, como paridade, frequência de intercorrências gestacionais anteriores, tempo de rotura das membranas e frequência de corioamnionite foram submetidos ao teste de comparação de proporção (Teste z). A idade gestacional no momento da rotura das membranas foi submetida ao teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre os grupos com RPM-PT. O nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5%³⁴.

3. Resultados

3.1. Características das gestantes

As variáveis sócio-demográficas e gestacionais das pacientes incluídas no estudo estão apresentadas na Tabela 1. Em relação à variável via de parto, em função do delineamento do estudo, houve aumento significativo na taxa de resolução da gestação nos grupos controle e RPM-PT fora de TP quando comparado ao grupo RPM-PT em TP. A idade gestacional no momento do parto foi significativamente superior no grupo controle em relação aos grupos RPM-PT. As variáveis paridade e intercorrências gestacionais anteriores, não apresentaram diferença estatisticamente significativa nos grupos estudados ($p > 0,05$).

Tabela 1. Variáveis sócio-demográficas e gestacionais das pacientes incluídas no estudo, no período de julho de 2006 a novembro de 2007.

| Variáveis | Controle (n=30) | RPM-PT em TP (n=30) | RPM-PT fora TP (n=20) |
|--|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Idade (anos) | 28,9 (15-39) ^a | 23,9 (14-44) ^b | 26,2 (16-42) ^a |
| Estado civil | | | |
| Solteira | 5 (16,7%) ^a | 12 (40,0%) ^a | 6 (30,0%) ^a |
| Casada | 16(53,3%) ^a | 14 (46,7%) ^a | 6 (30,0%) ^a |
| União estável | 9 (30,0%) ^a | 4 (13,3%) ^a | 8 (40,0%) ^a |
| Etnia | | | |
| Branca | 21 (70,0%) ^b | 29(96,7%) ^a | 14 (70,0%) ^a |
| Não branca | 9 (30,0%) ^a | 1 (3,3%) ^a | 6 (30,0%) ^a |
| Via de parto | | | |
| Vaginal | - | 23 (76,7%) | - |
| Cesárea | 30(100,0%) ^a | 7 (23,3%) ^b | 20 (100,0%) ^a |
| Idade gestacional no momento do parto | 38s5d (37s1d – 41s) ^a | 33s2d (26s – 36s6d) ^b | 35s (26s – 36s6d) ^b |
| Paridade | | | |
| Primigesta | 5 (16,7%) ^a | 15 (50,0%) ^a | 10 (50,0%) ^a |
| Secundigesta | 7 (23,3%) ^a | 6 (20,0%) ^a | 5 (25,0%) ^a |
| Multigesta | 18 (60,0%) ^a | 9 (30,0%) ^a | 5 (25,0%) ^a |
| Intercorrências gestacionais anteriores | | | |
| RPM | 1/25 ^a | 3/15 ^a | 2/10 ^a |
| Aborto | 10/25 ^a | 6/15 ^a | 5/10 ^a |
| TPP | 5/25 ^a | 4/15 ^a | 2/10 ^a |

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

Quanto ao tempo de rotura das membranas ovulares, podemos observar que mais de 50% das gestantes, em cada grupo, apresentaram período de latência superior à 24 horas (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição das gestantes em relação à idade gestacional e ao tempo de rotura das membranas corioamnióticas.

| | RPM-PT em TP (n=30) | RPM-PT fora TP (n=20) | Estatística p |
|--|----------------------------------|---------------------------------|------------------|
| Idade gestacional no momento da RPM | 33s (25s2d – 36s6d) ^a | 34s (22s5d -36s4d) ^a | 0,79 |
| Tempo RPM | | | |
| < 12 horas | 9 (30,0%) | 4 (20,0%) | 0,76 |
| 12-24 horas | 5 (16,7%) | 4 (20,0%) | 0,47 |
| > 24 horas | 16 (53,3%) | 12 (60,0%) | 0,98 |

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

3.2. Análise histopatológica das membranas corioamnióticas

A corioamnionite esteve presente em 53,3% das membranas corioamnióticas do grupo RPM-PT em TP. No grupo RPM-PT fora de TP, 30% das membranas corioamnióticas apresentaram infiltrado inflamatório. Já no grupo controle todas as membranas corioamnióticas apresentaram-se dentro dos padrões histológicos de normalidade (Tabela 3, Figuras 1 e 2).

Tabela 3. Porcentagem de corioamnionite presente nas amostras membranas corioamnióticas nos grupos estudados.

| | Controle (n=30) | RPM-P T em TP (n=30) | RPM-PT fora TP (n=20) |
|-----------------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------------|
| Presença de Corioamnionite | - | 16 (53,3%) ^a | 6 (30,0%) ^a |
| Ausência de Corioamnionite | 30 (100,0%) | 14 (46,7%) | 14 (70,0%) |

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

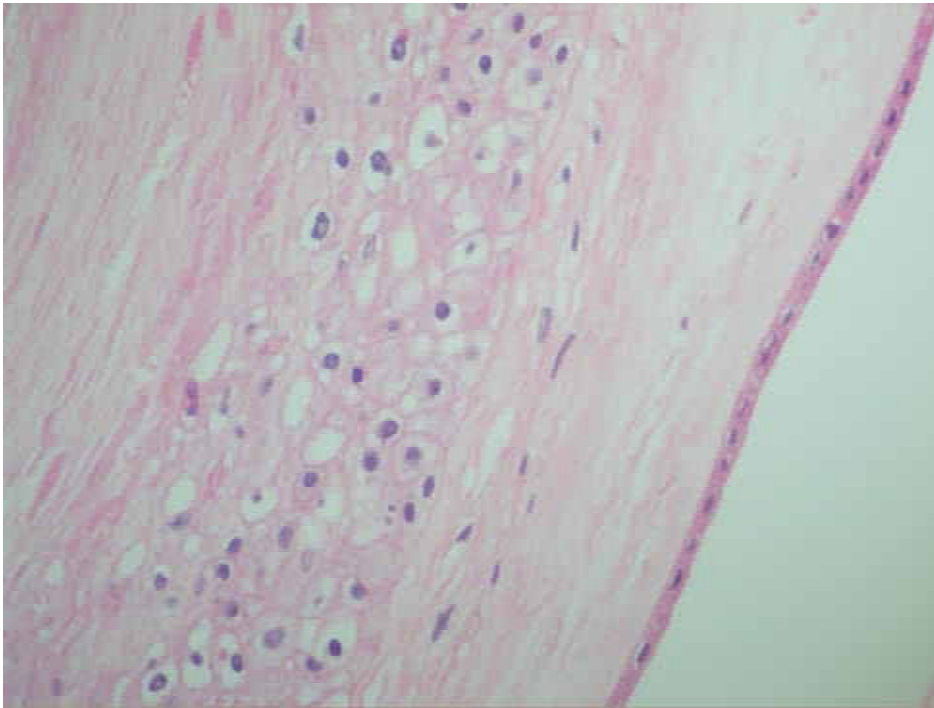


Figura 1. Fotomicrografia das membranas corioamnióticas normais evidenciando o âmnio e cório livres de infiltrado inflamatório. HE. 400X.

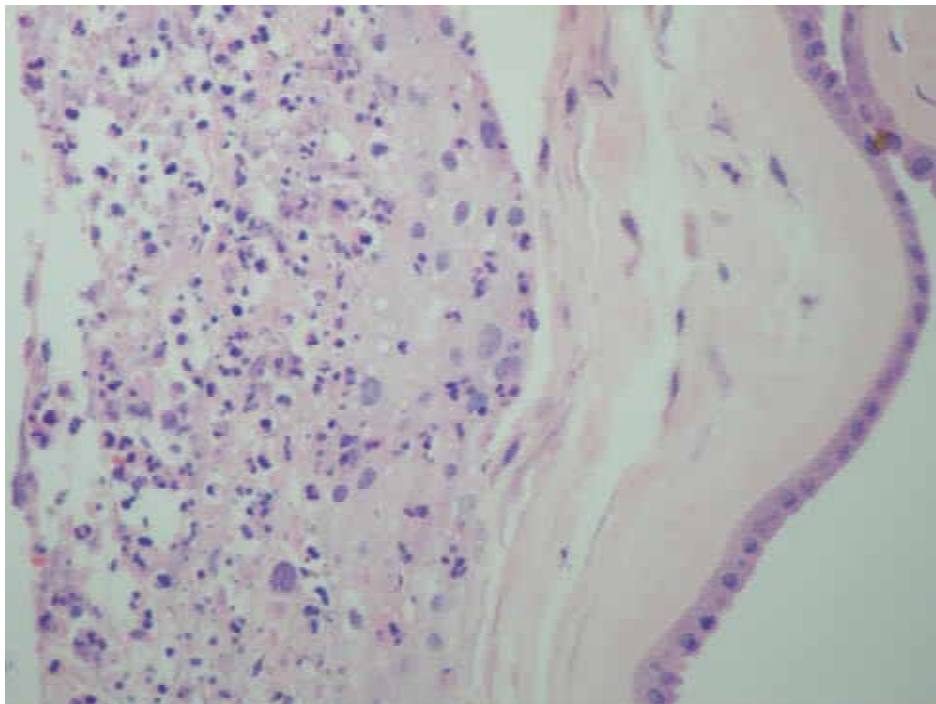


Figura 2. Fotomicrografia das membranas corioamnióticas de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo demonstrando rico exsudato polimorfonuclear. HE. 400X.

3.3. Quantificação relativa da expressão de IL-18

3.3.1. Determinação da curva padrão na PCR em tempo real para os genes da IL-18 e β -actina com TaqMan®

As diluições do cDNA de referência testadas para serem utilizadas na quantificação relativa da expressão de IL-18 e β -actina estão representadas nas Tabelas 4 e 5 e Figuras 3 e 4. Para isso, foram selecionadas quatro diluições: 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 para IL-18 e 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128 para β -actina, com o *threshold* determinado na fase exponencial da curva de amplificação.

Tabela 4. Valor relativo e Ct do cDNA de referência para IL-18 obtidos, em diferentes diluições, pela PCR em tempo real das amostras de membranas corioamnióticas.

| cDNA | Valor relativo | Ct IL-18 |
|------|----------------|----------|
| 1:2 | 100 | 27,68 |
| 1:4 | 50 | 28,42 |
| 1:8 | 25 | 29,59 |
| 1:16 | 12,5 | 30,38 |

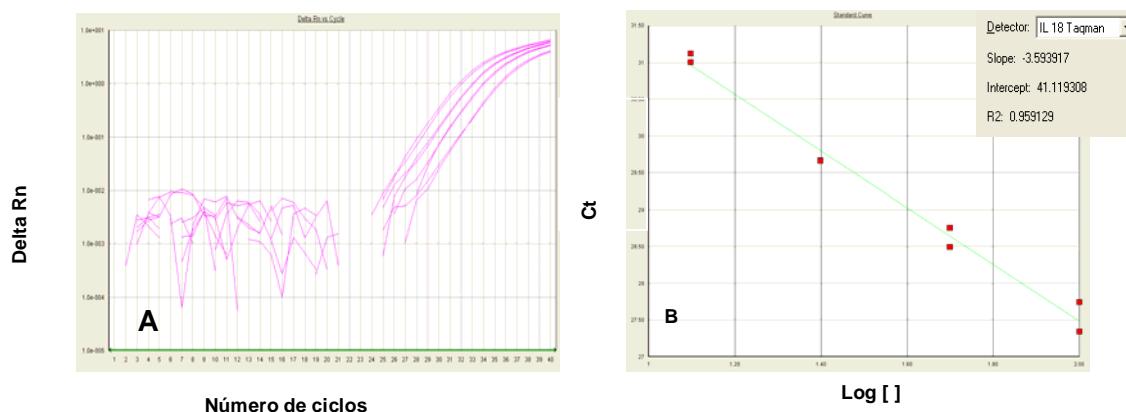


Figura 3. **A.** Representação gráfica da curva de amplificação da PCR em tempo real para IL-18 (lilás) das diluições do cDNA de referência utilizado como padrão nas reações. Em ordem decrescente de diluição, da esquerda para a direita, apresentam-se as diluições 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16. **B.** Representação gráfica da curva padrão,

construída com quatro pontos nas referidas diluições, obtidas a partir da PCR em tempo real para IL-18.

Tabela 5. Valor relativo e Ct do cDNA de referência para β -actina obtidos, em diferentes diluições, pela PCR em tempo real das amostras de membranas corioamnióticas.

| cDNA | Valor relativo | Ct β -actina |
|-------|----------------|--------------------|
| 1:16 | 100 | 25,2 |
| 1:32 | 50 | 26,14 |
| 1:64 | 25 | 27,11 |
| 1:128 | 12,5 | 28,10 |

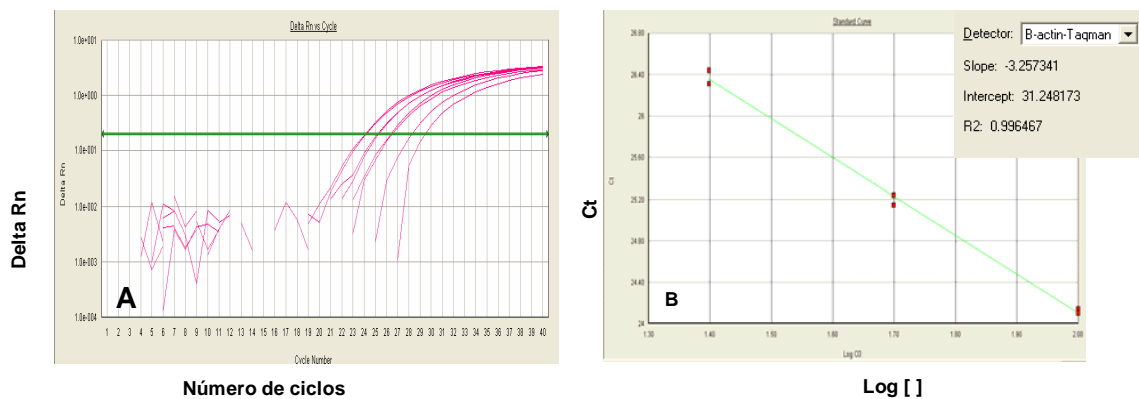


Figura 4. **A.** Representação gráfica da curva de amplificação da PCR em tempo real para β -actina (rosa) das diluições do cDNA de referência utilizado como padrão nas reações. Em ordem decrescente de diluição, da esquerda para a direita, apresentam-se as diluições 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128. **B.** Representação gráfica da curva padrão, construída com quatro pontos nas referidas diluições, obtidas a partir da PCR em tempo real para β -actina.

3.3.2. Quantificação relativa de RNAm de IL-18 nas membranas corioamnióticas

As concentrações relativas de RNAm de IL-18 nas membranas corioamnióticas das gestantes controle, com RPM-PT em TP e RPM-PT fora de TP estão apresentadas na Figura 5. Podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa da expressão de IL-18 entre os grupos estudados.

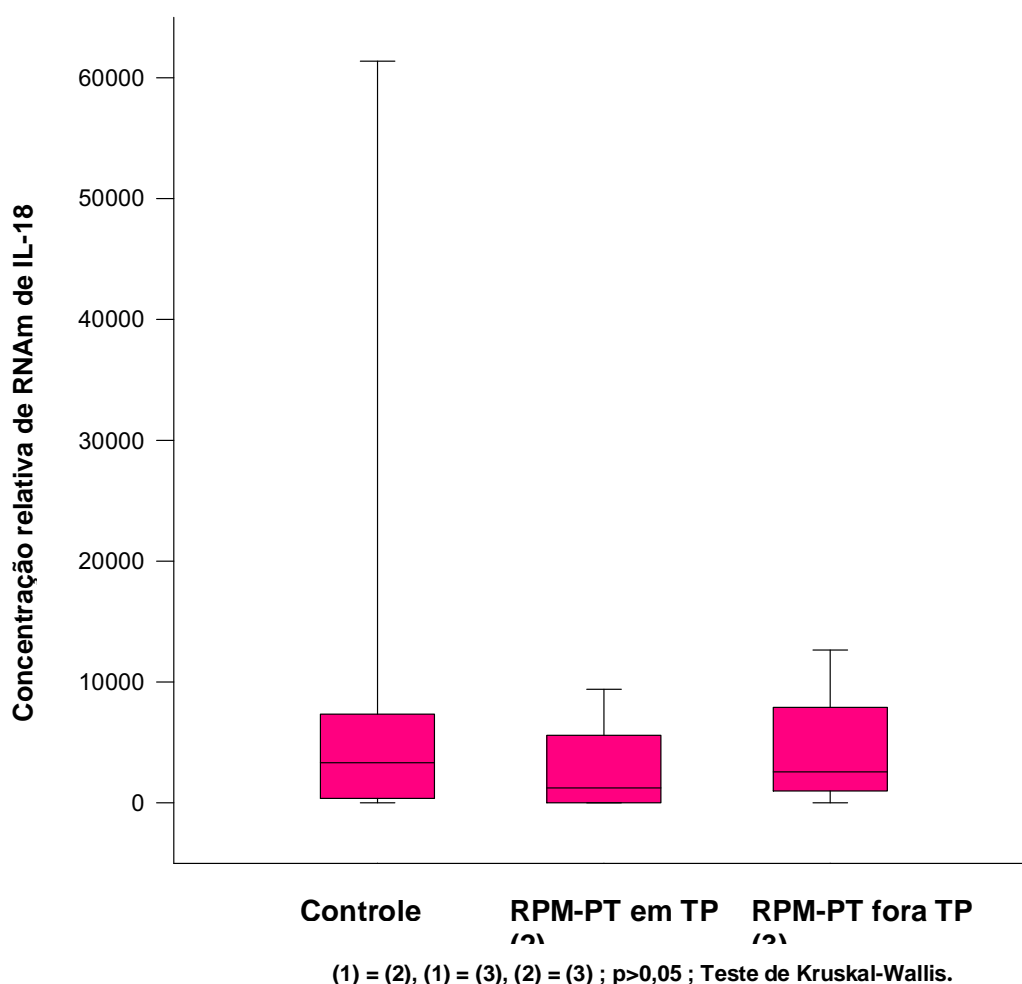
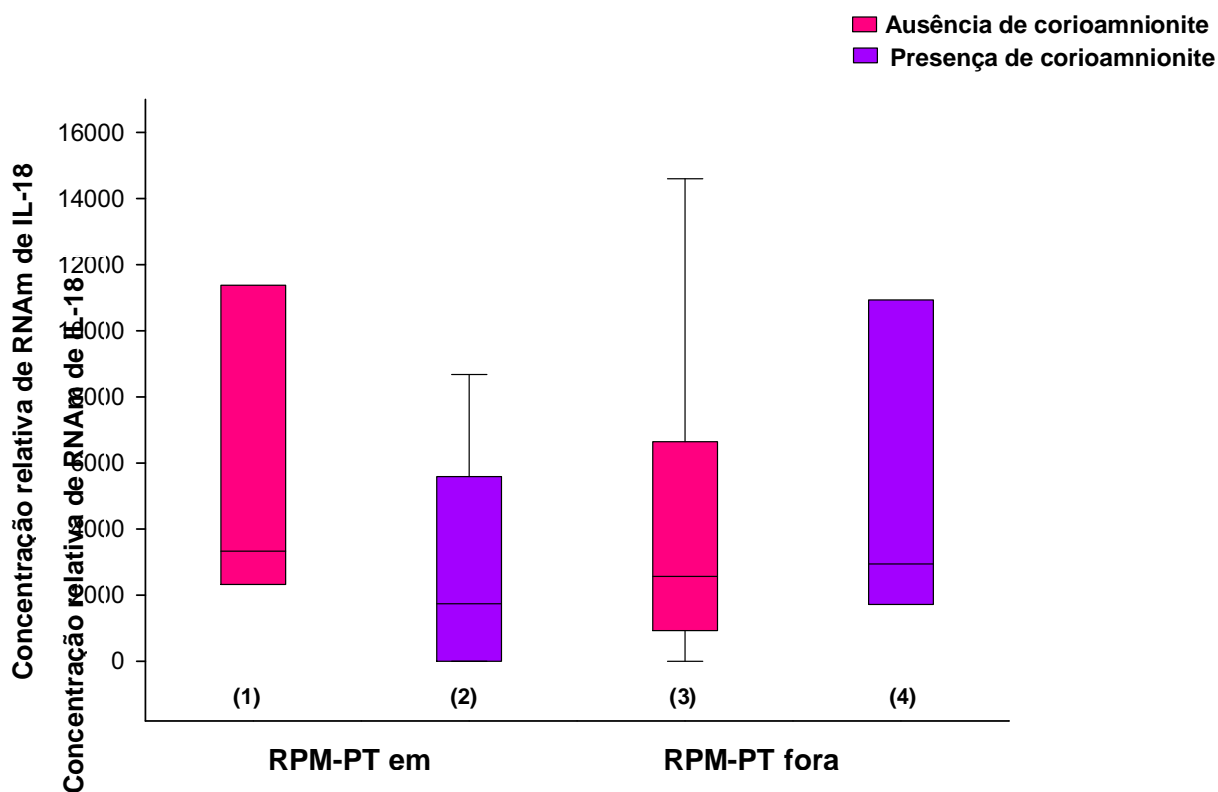


Figura 5. Concentração relativa de RNAm de IL-18 em membranas corioamnióticas de gestantes pertencentes aos grupos RPM-PT fora de TP, RPM-PT em TP e controle. No *Box-plot*, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores, o traço horizontal, a mediana; as barras de erro correspondem aos percentis 5 e 95

3.3.3. Quantificação relativa de RNAm de IL-18 nas membranas corioamnióticas em relação à corioamnionite.

A concentração relativa de RNAm de IL-18 foi avaliada em relação à presença do infiltrado inflamatório presente nas membranas corioamnióticas e não houve relação entre essas variáveis nos grupos analisados (Figura 7). A relação entre concentração de RNAm de IL-18 e presença de corioamnionite em função do tempo de rotura das membranas não foi detectada ($p>0,05$).



(1) = (2), (3) = (4), (1) = (3), (2) = (4); $p>0,05$, Teste de Kruskal-Wallis

Figura 7. Concentração relativa de RNAm de IL-18 em membranas corioamnióticas de gestantes pertencentes aos grupos RPM-PT em TP e RPM-PT fora de TP em relação à presença de corioamnionite. No *Box-plot*, os quadrantes representam de 25 a 75% dos valores e o traço horizontal, a mediana; as barras de erro correspondem aos percentis 5 e 95.

4. Discussão

No presente estudo foram avaliados a concentração de RNAm de IL-18 nas membranas corioamnióticas de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo em trabalho de parto e fora dele e gestantes normais, bem como a relação entre presença de corioamnionite com a expressão da citocina de interesse.

No período avaliado, foram realizados 1560 partos no Serviço de Obstetrícia da Faculdade de Botucatu, Unesp. A prevalência de RPM foi de 7,7% em gestações de termo e 6,2% em gestações pré-termo, freqüências semelhantes às relatadas na literatura^{22,35}.

A similaridade das variáveis obstétricas entre as pacientes constituintes dos grupos RPM-PT em TP, RPM-PT fora de TP e controle demonstraram homogeneidade dos grupos estudados. Nessa mesma linha, a paridade e a freqüência de TPP, RPM e abortos anteriores foi a mesma nos grupos avaliados, não tendo portanto influência maior do antecedente do parto prematuro como fator de risco para desencadeamento de RPM como sugerido por Newton³⁶.

Em relação ao tempo de rotura das membranas corioamnióticas no momento da resolução da gestação, pudemos observar que 53,3% das gestantes em RPM-PT em TP e 60% das gestantes em RPM-PT fora de TP tinham mais de 24 horas de rotura. Esse dado é diferente do descrito em nosso último estudo²², que relatou 76,7% das gestantes com menos de 24 horas de período de latência. Esse período é muito importante nos estudos que se pretende analisar o padrão da microbiota vaginal, pois se considerarmos a

etiologia infecciosa ascendente da RPM, a presença de microbiota alterada antes de 12 horas após a rotura, sugere fortemente alteração microbiológica anterior à essa intercorrência, como afirmam Hillier et al.³⁷, ao descreverem associação entre alterações da microbiota vaginal e resultados adversos da gestação. Porém nesse estudo, o conhecimento do tempo de rotura, no momento do parto, também se faz importante, se considerarmos que, devido a cinética de produção de citocinas, tempos superiores de latência podem estar relacionados à produção de citocinas anti-inflamatórias, que regulam a produção de citocinas inflamatórias³⁸.

A concentração de RNAm de IL-18 similar nos grupos RPM-PT e controle pode ser explicada pelo fato de que a produção de citocinas inflamatórias pelos tecidos gestacionais pode ser produzida de maneira constitutiva ou estimulada. A IL-18, a exemplo do TNF- α , pode promover apoptose nas membranas corioamnióticas por aumento da expressão de Fas ligante²⁰. A apoptose pode levar a ativação de enzimas que degradam a matriz extracelular, promovendo degradação e rotura precoce das membranas ovulares³⁹. Porém, segundo Menon et al.²⁰ as células coriônicas produzem IL-18 constitutivamente e esses autores documentaram a expressão de IL-18 em cultura de células coletadas no momento da resolução da gestação à termo. Segundo Ida et al.²⁶ não existe diferença entre as concentrações de IL-18 no soro de gestantes entre os diferentes trimestres gestacionais, porém os níveis dessa citocina estão significativamente aumentados nas gestantes em relação às mulheres não grávidas, sugerindo ação da IL-18 na gestação.

Em relação a esses achados temos que considerar que o grupo controle foi constituído de gestantes com idade gestacional superior ao grupo RPM-PT,

com mediana de 38s5d (37s1d-41s), sugerindo que a expressão de IL-18 possa ser influenciada pela idade gestacional, culminando com maior produção no momento do parto à termo, explicando os níveis similares entre os grupos. Essa hipótese é contrária aos achados relatados por Adams et al.²⁹, porém esta concordância com os resultados de Pacora et al.²⁷ que descreveram que as concentrações de IL-18 no líquido amniótico aumentam com a idade gestacional, sugerindo importante papel dessa citocina no desenvolvimento gestacional.

Além da variável idade gestacional, novos resultados podem ser explicado pois a IL-18 por ter papel importante no mecanismo de apoptose, pode ter seus níveis de IL-18 equivalentes aos da gestação normal logo após a rotura das membranas. Considerando o tempo de latência superior a 24 horas em cerca de 50% das gestantes incluídas no estudo, a expressão de IL-18, no momento do parto, poderia não estar representando seus níveis no momento da rotura das membranas ovulares.

Pacora et al.²⁷ descreveram que gestação com RPM-T esteve associada à significativa redução das concentrações de IL-18 no líquido amniótico e segundo esses mesmos autores não existe explicação para essas observações e que estudos futuros são necessários para estabelecer a relação entre IL-18 e regulação da degradação enzimática que ocorre na rotura prematura.

Em relação à corioamnionite, a incidência foi de 53,3% no grupo RPM-PT em TP, 30,0% em RPM-PT fora de TP e todas as membranas corioamnióticas de pacientes do grupo controle apresentaram-se dentro dos padrões histológicos de normalidade. Incidência similar de corioamnionite é descrita na literatura, variando de 30 a 80% nos casos de RPM⁴⁰⁻⁴². Segundo

Ramsey et al.⁴³, a incidência de corioamnionite aumenta significativamente em idades gestacionais inferiores.

Quando analisamos a presença da corioamnionite não observamos relação entre esse achado e a concentração relativa de RNAm de IL-18 nos grupos RPM-PT em TP e RPM-PT fora de TP. Na presença de corioamnionite, a produção de citocinas inflamatórias pode estar aumentada, e segundo Menon et al.¹⁸, a detecção de RNAm de IL-1 e IL-6 está aumentada em membranas infectadas ou estimuladas com endotoxinas. Porém, não podemos deixar de considerar que a presença de RNAm não significa, necessariamente, produção de citocinas.

A quantidade de proteína produzida depende da estabilidade dos RNAm correspondente no citoplasma e da taxa de sua tradução. A estabilidade do RNAm também determina quanto tempo deve durar a síntese da proteína codificada e a maioria dos RNAm dos organismos multicelulares tem meia-vida de várias horas. No entanto, algumas proteínas são necessárias apenas durante curtos períodos de tempo e devem ser expressas sem pulsos, como as citocinas. A expressão dessas proteínas ocorre em pulsos curtos porque a transcrição dos seus genes pode ser ligada ou desligada rapidamente e seu RNAm geralmente tem meia-vida curta, em torno de 30 minutos ou menos⁴⁴.

Considerando a metodologia empregada e os resultados obtidos podemos concluir que a RPM-PT não é capaz de induzir aumento na concentração relativa de RNAm de IL-18 e não existe relação entre concentração relativa dessa citocina e presença de corioamnionite. Esses achados poderão ser confirmados com a quantificação de IL-18, presente nas

membranas corioamnióticas, empregando-se a técnica de *Western Blott* seguido de *immunoblotting* com reagente quimioluminescente.

5. Referências Bibliográficas*

1. Lee T, Silver H. Etiology and epidemiology of preterm premature rupture of the membranes. *Clin Perinatol* 2001;28:721-34.
2. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 2003;101: 178-93.
3. Savitz DA, Blackmore CA, Thorp JM. Epidemiologic characteristics of preterm delivery: etiologic heterogeneity. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 467-71.
4. Kyrklund-Blomberg NB, Granath F, Cnattingius S. Maternal smoking and causes of very preterm birth. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005; 84: 572-7.
5. Simhan HN, Caritis SN, Krohn MA, Hillier SL. The vaginal inflammatory milieu and risk of early premature preterm rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 213-8.
6. Naeye RL. Factors that predispose to premature rupture of the fetal membranes. *Obstet Gynecol* 1982; 60: 93-8.
7. Scholl TO, Hediger ML, Schall JI, Fisher RL, Khoo CS. Low zinc intake during pregnancy: its association with preterm and very preterm delivery. *Am J Epidemiol* 1993 ;137: 1115-24.
8. Casanueva E, Ripoll C, Meza-Camacho C, Coutiño B, Ramírez-Peredo J, Parra A. Possible interplay between vitamin C deficiency and prolactin in pregnant women with premature rupture of membranes: facts and hypothesis. *Med Hypotheses* 2005; 64: 241-7.
9. French JI, Mcgregor JA. The pathobiology of premature rupture of membranes. *Semin Perinatol* 1996; 20: 344-68.
10. Spinillo A, Piazzzi NG, Ghazal K, Colonna L, Baltaro F. Epidemiological correlates of preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynecol Obstet* 1994; 4: 7-15.
11. Harger JH, Hsing AW, Tuomala RE, Gibbs RS, Mead PB, Eschenbach DA, et al. Risk factors for preterm premature rupture of membranes: a multicenter case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163:130-7.

*Elaboradas de acordo com o International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals. *Ann Intern Med* 1997; 126:36-47.

12. Karat C, Mathivanan P, Krupp K, Poornima S, Jayanthi NV, Suguna JS, et al. The clinical and microbiological correlates of premature rupture of membranes. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24: 283-5.
13. Gonçalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002; 8: 3-13.
14. Gomez R, Romero R, Edwin SS, David C. Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11: 135-76.
15. Menon R, Fortunato SJ. Fetal membranes inflammatory cytokines: a switching mechanism between the preterm premature rupture of membranes and preterm labor pathways. *J Perinat Med* 2004; 32: 391-9.
16. Jacobsson B, Mattsby-Baltzer I, Andersch B, Bokström H, Holst R, Nikolaitchouk N, et al. Microbial invasion and cytokine response in amniotic fluid in a Swedish population of women with preterm prelabor rupture of membranes. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82: 423-31.
17. Shobokshi A, Shaarawy M. Maternal serum and fluid cytokines in patients with preterm premature rupture of membranes with and without intrauterine infection. *Int J Gynecol Obstet* 2002; 79: 209-15.
18. Menon R, Swan KF, Lyden TW, Rote NS, Fortunato S. Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1 β and interleukin-6) in amniochorionic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 493-500.
19. Fortunato SJ, Menon R, Bryant C, Lombardi SJ. Programmed cell death (apoptosis) as a possible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrane degradation in premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182:1468-76.
20. Menon R, Lombardi SJ, Fortunato SJ. IL-18, a product of choriodecidual cells, increases during premature rupture of membranes but fails to turn on the Fas-FasL-mediated apoptosis pathway. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18:276-84.
21. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Role of tumor necrosis factor- α in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 1159-62.
22. J Poletini. Análise quantitativa da expressão de citocinas inflamatórias em membranas corioamnióticas de gestantes com rotura prematura de

membranas pré-termo. [Dissertação]. Botucatu. Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, 2007.

23. Montagnana M, Lippi G, Albiero A, Salvagno GL, Franchi m, Guidi GC. Serum pro-inflammatory cytokines in physiological and pre-eclamptic pregnancies. *Gynecol Endocrinol* 2008; 24: 113-6.
24. Orsi NM, Tribe RM. Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 462-9.
25. Romero R, Gotsch F, Pineles B, Kusanovic JP. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. *Nutr Rev* 2007; 65: 5194-202.
26. Ida A, Tsuji Y, Muranaka J, Kanazawa R, Nakata Y, Adachi S, et al. IL-18 in pregnancy; the elevation of IL-18 in maternal peripheral blood during labour and complicated pregnancies. *J Reprod Immunol* 2000; 47: 65-74.
27. Pacora P, Romero R, Mayamon E, Gervasi MT, Gomez R, Edwin SS, et al. Participation of the novel cytokine interleukin 18 in the host response to intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 1138-43.
28. Jacobsson B, Holst RM, Mattsby-Baltzer I, Nikolaitchouk N, Wennerholm UB, Hagberg H. Interleukin-18 in cervical mucous and amniotic fluid: relationship to microbial invasion of the amniotic fluid, intra-amniotic inflammation and preterm delivery. *BJOG* 2003; 110: 598-603.
29. Adams KM, Mandel LS, Guthrie KA, Atkinson MW. Interleukin-18 in the plasma of women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 1234-7.
30. Sakai M, Shiozaki A, Sasaki Y, Yoneda S, Saito S. The ratio of interleukin (IL)-18 to IL-12 secreted by peripheral blood mononuclear cells is increased in normal pregnant subjects and decreased in pre-eclamptic patients. *J Reprod Immunol* 2004; 61: 133-43.
31. Huang X, Huang H, Dong M, Yao Q, Wang H. Serum and placental interleukin-18 are elevated in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2005; 66: 77-87.
32. Rezende J. *Obstetrícia*. 10ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

33. Hargitai B, Marton T, Cox PM. Examination of the human placenta. *J Clin Path* 2005; 57: 775-82.
34. Curi PR. Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas. 1ª edição. Botucatu: Editora Tipomic, 1997.
35. Silva MG, Peraçoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Peraçoli MTS. Cervical *Lactobacillus* and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynecol Obstet* 2003; 81:175-83.
36. Newton ER. Chorioamnionitis and intraamniotic infection. *Clin Obstet Gynecol* 1993; 36:795-808.
37. Hillier SL, Krohn MA, Kiviat NB, Watts DH, Eschenbach DA. Microbiologic causes and neonatal outcomes associated with chorioamnion infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 955-61.
38. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones. *J Exp Med* 1989; 170:2081-95.
39. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Programmed cell death (apoptosis): A possible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrane degradation in PPRM. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182:1468-76.
40. Ghidini A, Salafia CM, Kirn V, Doria V, Spong CY. Biophysical profile in predicting acute ascending infection in preterm rupture of membranes before 32 weeks. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 201-6.
41. Hensch SA, Stephens L, Markeson G, Bsat F. Prediction of pregnancy outcome in preterm premature rupture of membranes using vaginal pool amniotic fluid markers. *Obstet Gynecol* 2001; 97: S5.
42. Nguyen TN, Meyer WJ, Gauthier DW, Myles T. Chorioamnionitis does not affect fetal urine production in patients with premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Med* 1997; 6: 96-8.
43. Ramsey PS, Lieman JM, Brumfield CG, Carlo W. Chorioamnionitis increases neonatal morbidity in pregnancies complicated by preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192:1162-6.

44. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP. *Biologia Celular e Molecular*. 5ª edição. Porto Alegre: ArtMed, 2005.