



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

Giovana Fernanda Cosi Bento

**Estudo *in vitro* de infecção polibacteriana das membranas
corioamnióticas: modulação da resposta imune na
interface materno-fetal.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em Ciências- Área
Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Jossimara Poletini

**Botucatu
2020**

Giovana Fernanda Cosi Bento

Estudo *in vitro* de infecção polibacteriana das
membranas corioamnióticas: modulação da resposta
imune na interface materno-fetal.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Ciências- Área Patologia.

Orientadora: Profa.Dra. Márcia Guimarães da Silva
Coorientadora: Profa. Dra. Jossimara Poletini

Botucatu

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Bento, Giovana Fernanda Cosi.

Estudo in vitro de infecção polibacteriana das membranas corioamnióticas : modulação da resposta imune na interface materno-fetal / Giovana Fernanda Cosi Bento. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Márcia Guimarães da Silva
Coorientador: Jossimara Polettini
Capes: 40103005

1. Streptococcus. 2. Técnicas in vitro. 3. Micoplasma.
4. *Fusobacterium nucleatum*. 5. Resposta imune.

Palavras-chave: Estudo in vitro; Infecção polimicrobiana;
Membranas corioamnióticas; Micoplasmas genitais;
Streptococcus agalactiae.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Claudia e Enzo, que são meus exemplos de vida e
minha inspiração.

Às minhas avós, Neusa e Maria, por sempre me apoiarem e confiarem em mim.
Aos meus avôs, Altino e Elzo, por quem eu guardo ótimas lembranças, que mesmo na ausência
física estiveram ao meu lado esse tempo todo.

Agradecimentos

A **Deus** e à **Nossa Senhora**,

Por me iluminarem e me ampararem em todos os momentos da caminhada.

Aos **meus pais**, Enzo e Claudia, e à minha **família**,

Por se fazerem presentes mesmo com a distância, por sempre me apoiarem nos momentos difíceis e por serem minha base e porto seguro.

À minha orientadora, **Márcia Guimarães da Silva**,

Pela oportunidade de trilhar um caminho na carreira acadêmica, por sempre estar presente aconselhando e orientando, não só no aspecto profissional, mas pessoal também. Por ter me recebido de volta ao laboratório e por ter me dado todo o suporte em um capítulo difícil da minha vida.

À minha coorientadora, **Jossimara Polettini**,

Por não ter medido esforços, apesar da distância, para ajudar no que fosse preciso.

Ao meu namorado, **Thales Hilário Húngaro**,

Por ser meu companheiro em todo momento, por ter me apoiado, entendido minhas ausências e por ter tornado essa caminhada mais leve. Obrigada por essa parceria de amor.

À **Mariana de Castro Silva**,

Pela parceria e amizade que se fortaleceu ainda mais durante esse período. Sem você eu não teria chego aqui hoje. Obrigada por todos os conselhos, momentos e aprendizados que tivemos juntas. À você serei sempre gratidão.

Aos **meus filhos científicos**, Geovanna, Carolina e Guilherme,

Que felicidade foi ter vocês como iniciações científicas nesse projeto. Ter criado essa família (junto com a Mariana) do time das membranas me ajudou a passar por todos os momentos difíceis. Obrigada pelas noites em família regada a filmes e pipoca. Vocês são luz.

À **Júlia Andrade de Pessoa Morales**,

Que desde o início da faculdade me acompanha nos momentos bons e ruins e que há 8 anos eu tenho o prazer de dividir o teto e um pedacinho da vida. Obrigada por tanto.

Aos **meus amigos**, seja em São Paulo, Botucatu, Ribeirão Preto ou Arkansas, Agradeço a todos que não mediram esforços para estarem ao meu lado e me ajudarem, seja ouvindo minhas angústias ou me ajudando a não desanimar frente às dificuldades. Em especial à Julia Liv, Fernanda, Aline, Laís, Larissa H. e Larissa B., por me mostrarem que amizade vai além de qualquer tempo e distância.

À minha psicóloga, **Raquel Bertani**,
Por ter me ajudado a encontrar o equilíbrio nessa fase e a me manter tranquila e confiante diante de todas os obstáculos e dificuldades.

A todos do **Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal**, Bruna, Laura, Rosana, Juliano, Gabriel, por estarem presentes no meu dia-a-dia durante toda essa trajetória.

Aos meus companheiros de mestrado e amigos, **Jeniffer, Júlia A. e Rafael**,
Pela parceira nessa caminhada que, por muitas vezes difícil, ficou melhor com a companhia de vocês. Obrigada pelas confras e refeições em família.

Aos alunos e Professores do **Departamento de Imunologia e Microbiologia**, em especial à Ivana e à Professora Vera, pelos ensinamentos e suporte sem medir esforços junto a tantos desafios e questionamentos. Obrigada pela disponibilidade e auxílio.

Às enfermeiras do centro obstétrico do **Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu**, pela ajuda, paciência e disponibilidade em meio à correria do dia-a-dia.

Aos funcionários do **Programa de Pós-Graduação em Patologia**, em especial à Vânia, por ser sempre solícita e ter tido paciência frente às tantas dúvidas e pedidos.

Ao **Dr. Marcus Guazelli**,
Por ter aceitado nos ajudar com as coletas das amostras e ser sempre solícito aos nossos pedidos.

Às **gestantes**, por terem aceitado participar desse estudo.

À **CAPES**, pela bolsa concedida nesse período.

Resumo

Introdução: O parto pré-termo (PP) é considerado um dos principais problemas da clínica obstétrica que ocorre em quase 10% de todas as gestações no mundo. A invasão polibacteriana e a inflamação da cavidade amniótica são um cenário comum no PP que resulta em resposta inflamatória do hospedeiro. O objetivo do estudo foi avaliar a produção e cinética de mediadores inflamatórios em modelos *in vitro* de coinfecção da membrana fetal com micoplasmas genitais e outras espécies bacterianas.

Materiais e Métodos: Membranas corioamnióticas coletadas de gestações saudáveis por cesariana foram estimuladas com micoplasmas genitais (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*), *Streptococcus agalactiae* e *Fusobacterium nucleatum*, isoladamente ou em combinação. Os sobrenadantes da cultura foram coletados em cinco momentos diferentes: 0h, 6h, 12h, 18h e 24h. As Interleucinas (IL) -6, IL-8, IL-10 e fator de necrose tumoral α (TNF- α) foram dosadas no meio de cultura por ensaio imunoenzimático (ELISA).

Resultados: A estimulação por micoplasmas genitais, isoladamente ou em combinação, aumentou os níveis de citocinas pró-inflamatórias em relação ao grupo controle, enquanto *F. nucleatum* e *S. agalactiae* não tiveram diferenças significativas. Os níveis mais altos de TNF- α foram detectados nos momentos 6h e 12h, em contraste com a IL-10, cujos pico de produção ocorreu após 18h de estimulação.

Conclusão: *M. hominis* e *U. parvum* sustentam uma resposta pró-inflamatória nas membranas corioamnióticas *in vitro*, isoladamente ou em combinação, mas não responderam da mesma maneira na presença de outras bactérias. Portanto, a infecção polimicrobiana resulta em um padrão pró-inflamatório e em um equilíbrio da resposta anti-inflamatória.

Palavras-chave: Membranas corioamnióticas, estudo *in vitro*, infecção polimicrobiana, micoplasmas genitais, *Streptococcus agalactiae*, *Fusobacterium nucleatum*.

Abstract

Abstract

Problem: Preterm labor (PTL) is considered one of the main obstetric clinic problems that occurs in almost 10% of all pregnancies in the world. Polybacterial invasion and inflammation of the amniotic cavity is a common scenario in PTL that results in host inflammatory response. We aimed to evaluate the production and kinetics of inflammatory mediators in *in vitro* models of fetal membrane coinfection with mycoplasmas and other bacteria species.

Method of Study: Fetal membranes collected from healthy pregnancies by c-section were stimulated with heat-killed genital micoplasmas (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*), *Streptococcus agalactiae* and *Fusobacterium nucleatum*, alone or in combination. Culture supernatants were collected at five different time-points: 0h, 6h, 12h, 18h, and 24h. Interleukin (IL) -6, IL-8, IL-10 and Factor Necrosis Tumoral alpha (TNF- α) were measured in the culture medium by immunoenzymatic assay (ELISA).

Results: Stimulation by genital mycoplasmas, alone or in combination, increased the levels of proinflammatory cytokines in relation to control group, whereas *F. nucleatum* and *S. agalactiae* did not produce significant differences. Highest levels of TNF- α were detected at time-point 6 and 12, in contrast to IL-10, which peaks appeared at time-point 18h.

Conclusions: *M. hominis* and *U. parvum* sustain a proinflammatory response in the fetal membranes *in vitro* alone or in combination, but did not respond in the same way in the presence of other bacteria. Therefore, the polymicrobial infection results in a proinflammatory pattern and a balance of anti-inflammatory response.

Sumário

Capítulo I -----	15
Revisão de Literatura -----	16
1. Aspectos imunológicos da gravidez -----	17
1.1. Estrutura das membranas corioamnióticas-----	19
1.2. Mediadores da resposta imune inata e trabalho de parto pré-termo-----	20
1.3. Invasão microbiana da cavidade amniótica e parto pré-termo-----	22
1.3.1. Micoplasmas genitais e outros patógenos oportunistas -----	24
1.4. Cultura das membranas corioamnióticas <i>in vitro</i> -----	25
2. Referências -----	27
Capítulo II -----	35
Artigo Científico -----	36
1. Abstract -----	38
2. Introduction -----	39
3. Material and methods -----	41
3.1. Patients and fetal membranes collection -----	42
3.2. Stimulation of fetal membrane cultures -----	42
3.3. Immunoassays -----	43
3.4. Statistical analysis -----	44
4. Results-----	44
5. Discussion -----	46
6. Conclusion -----	49
7. References -----	49
Anexos -----	61

Capítulo I

Revisão de Literatura

1. Aspectos imunológicos da gravidez

O estudo e conhecimento dos mecanismos biológicos e imunológicos que ocorrem durante a gravidez contribuem para compreender a sobrevivência do feto e a dinâmica na interface materno-fetal. A combinação de fatores imunológicos fetais e maternos, tais como a mudança do perfil imunológico materno ao longo da gravidez e a imaturidade antigênica do feto, permitem o estabelecimento de uma interface que possibilita o sucesso gestacional.

Uma questão muito discutida é se o sistema imune materno age em favor ou contra a gravidez (1). No entanto, evidências mostram que a interface materno-fetal não se enquadra em um ambiente de supressão imunológica mas em um cenário de modulação (2), de modo que a presença de células imunes no momento da implantação não está associada à uma resposta ao feto, mas à facilitação e proteção da gestação (1). Dessa maneira, a imunologia da gravidez é resultado da combinação de sinais e respostas originados do sistema imune materno e do sistema imune fetal/placentário (3).

Por muitos anos o sucesso da gestação foi creditado ao predomínio de resposta imune mediada por linfócitos T *helper* tipo 2 (Th2) em detrimento da resposta imune de perfil Th1, que era associada a resultados gestacionais adversos (4, 5). Na atualidade, estudos demonstram que é um dinâmico balanço entre citocinas, que se modifica ao longo da gestação, está associado ao desfecho gestacional favorável (6, 7).

O primeiro trimestre gestacional é caracterizado pelo predomínio da resposta imune de perfil Th1, no qual o microambiente inflamatório é importante tanto para permitir o reparo do endométrio dos danos advindos da implantação do feto, quanto para remoção de *debris* celulares. Já o segundo trimestre é caracterizado pela resposta imune de perfil Th2 (4), tendo como objetivo a manutenção da gestação, com consequente aumento de citocinas com atividade anti-inflamatória. No terceiro trimestre e no momento do parto, o predomínio da resposta imune volta a ser de perfil Th1. Esse tipo de resposta ocorre tanto no tecido placentário (8) e líquido amniótico (9), quanto sistematicamente (10). Desse modo, o trabalho de parto é reconhecido como uma síndrome inflamatória (11).

Na espécie humana, uma complexa rede de eventos regulados por mediadores e mecanismos dos sistemas endócrino, imune e nervoso resultam no trabalho de parto a termo. Três processos distintos e interdependentes caracterizam o momento em que a gestação atinge

o desfecho: o remodelamento cervical, o enfraquecimento e rotura das membranas corioamnióticas, e a contratilidade miometrial, que, juntos, viabilizam a expulsão do feto após a 37ª semana de gestação (12, 13). Considerando o papel do sistema imune nesse contexto, as citocinas, polipeptídeos secretados por células da imunidade inata e adaptativa, permeiam e possibilitam esses mecanismos envolvidos no desencadeamento do parto (12).

Apesar do aumento no número de trabalhos ao longo dos anos e das tecnologias existentes, os mecanismos envolvidos no desencadeamento do trabalho de parto a termo ainda não estão completamente elucidados (14). A maior consequência desse incompleto conhecimento é a dificuldade em prevenir o trabalho de parto pré-termo (TPP), considerado um dos principais problemas da clínica obstétrica. O TPP é uma importante intercorrência caracterizada pela presença de um ou mais contrações de ritmo e frequências regulares a cada 10 minutos, acompanhadas de dilatação cervical superior a 2cm e/ou esvaecimento cervical igual ou superior a 50%, entre 22 e 37 semanas de gestação (15).

O parto pré-termo (PP) pode ser classificado em 3 categorias: os que ocorrem espontaneamente, sendo esta categoria mais prevalente (50%); por indicação médica (25%); ou por desfecho da rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT) (25%) (16). Nas últimas décadas, a prevalência do PP tem aumentado em nível mundial, sendo que nos Estados Unidos esteve presente em mais de 12% das gestações (17), sendo essa prevalência similar na África e Ásia (17, 18). Sua etiologia é multifatorial, e apesar de cerca de 40% dos casos serem idiopáticos (19), fatores associados à ocorrência de PP já são conhecidos, como sua ocorrência em gestações anteriores, abortos anteriores, idade materna inferior a 20 anos (20), rotura prematura de membranas (RPM), corioamnionite (19, 20), gestação múltipla, hipertensão gestacional, sangramento vaginal (19), pequeno ganho de peso materno durante a gestação, diabetes gestacional (21) e vaginose bacteriana (22).

O aumento da prevalência nos últimos anos demonstra cada vez mais uma complexidade dos fatores de risco e do papel que desempenham nos desfechos gestacionais adversos como, por exemplo, ao induzir alterações morfológicas, inflamatórias, bioquímicas e oxidativas, culminando em uma rede complexa que dificulta o entendimento dos mecanismos envolvidos. Além da mortalidade neonatal, as comorbidades associadas ao parto pré-termo geralmente levam a diversas consequências na vida do neonato resultando em custos econômicos, físicos e psicológicos (23). As primeiras manifestações de hipertensão e problemas cardiovasculares como consequência do parto pré-termo acontecem logo na infância (24). Além disso, neonatos

que sobrevivem ao PP têm comprometimento das funções pulmonares ao longo de toda a vida, condição que é caracterizada por uma limitação do fluxo aéreo (25).

A rotura das membranas corioamnióticas é um acontecimento normal que ocorre durante o trabalho de parto a termo. Quando precede do início do trabalho de parto é intitulada rotura prematura de membranas (26). Já a rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT) é definida pela rotura espontânea das membranas corioamnióticas que ocorre em idade gestacional inferior a 37 semanas, e é presente em 30% das gestações pré-termo (27). Essa intercorrência tem sido alvo de estudos, uma vez que tem sido associada à morbidade materna e morbimortalidade perinatal (28). A RPM-PT é uma das maiores causas de prematuridade (29), e a frequência e severidade das complicações neonatais variam de acordo com a idade gestacional, sendo aumentadas em casos de infecção perinatal (30, 31).

1.1. Estrutura das membranas corioamnióticas

As membranas corioamnióticas, que constituem a bolsa das águas que abriga o feto, formam uma estrutura de extrema importância para o desenvolvimento fetal, pois elas possuem importantes funções como a de proteção do feto contra traumas, de manutenção do volume do líquido amniótico e de proteção dos vasos do cordão umbilical contra compressão, além de atuarem como barreira contra infecções vindas do trato genital inferior (32).

Apesar da grande quantidade de microrganismos que colonizam o trato genital inferior, a visão que se tem da cavidade amniótica é a de um ambiente estéril (33). Além de revestir a superfície da placenta e constituir o saco amniótico, as membranas corioamnióticas também possuem o papel de manter as condições ideais de esterilidade do líquido amniótico e de ser barreira imunológica. A expressão dos receptores *Toll-like 2* (TLR-2) e *Toll-like 4* (TLR-4) pelo epitélio amniótico, sugere que esse epitélio não funciona apenas como barreira mecânica aos microrganismos, mas que também é fundamental na ativação do sistema imune inato.

Histologicamente, as membranas corioamnióticas são constituídas de diferentes camadas celulares e por componentes da matriz extracelular (MEC). O cório, camada mais externa, a qual mantém proximidade com a cavidade amniótica, é constituído pelas camadas celular e reticular e pela membrana basal (34). Já a camada celular mais interna é o âmnio, de origem ectodérmica, o qual é constituído por monocamada de células epiteliais cuboides ou colunares e camada de tecido conectivo rico em colágeno, intercalada por células mesenquimais (35). Várias microvilosidades são encontradas entre as células do epitélio amniótico, tanto na

porção apical quanto nas bordas laterais, as quais contribuem para a comunicação intercelular e atuam como barreira mecânica contra possível invasão de patógenos. Por fim, a camada decidual é associada externamente ao corio-âmnio e localiza-se internamente à parede uterina, desempenhando papel hormonal e imunológico (36).

1.2. Mediadores da resposta imune inata e trabalho de parto pré-termo

O sistema imune e seus processos inflamatórios estão associados à vários mecanismos associados à reprodução, como ovulação, implantação e desencadeamento do parto (37). Estudos mostram que mediadores da resposta inflamatória são sintetizados por células das membranas corioamnióticas mesmo na ausência de infecção neste microambiente (38). Desse modo, é possível confirmar que até mesmo o parto a termo é caracterizado por um perfil inflamatório.

Reconhecendo o parto como um processo inflamatório, entende-se que estímulos patogênicos podem estimular mais ainda a imunidade nesse ambiente. Em casos de infecção, ocorre recrutamento neutrofílico para as membranas corioamnióticas (39), resultando em amplificação da resposta inflamatória e corioamnionite histológica, esta última sendo considerada um indicador de invasão microbiana da cavidade amniótica (40).

O reconhecimento dos patógenos pelo sistema imune inato envolve moléculas de reconhecimento de padrões, conhecidos como TLRs, que pertencem à família dos receptores de reconhecimento de padrões (RRP) (41), sendo que cada tipo já descrito na literatura é específico para diferentes padrões de reconhecimento de patógenos (PAMPS) (42). A primeira linha de defesa contra infecções durante a gestação é constituída principalmente pelo TLR-2 e TLR-4 (43), visto que eles são expressos tanto no epitélio amniótico, quanto nas células coriônicas e deciduais (44, 45), porém já se sabe que ao longo da gestação, todos os tipos de TLRs são expressos na interface materno-fetal de uma maneira espaço-temporal específica (46). O TLR-2 reconhece PAMPS como lipoproteínas associadas à micobactérias, peptidoglicano e bactérias Gram-positivas (47, 48); já o TLR-4 medeia a resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) (49). Segundo Kim et al. (45), a expressão proteica desses dois receptores é significativamente maior no epitélio amniótico na presença de corioamnionite histológica, tanto em partos pré-termo quanto a termo. Isso sugere que a expressão aumentada dos TLRs nos tecidos

gestacionais no momento do trabalho de parto pode aumentar a proteção do hospedeiro contra invasão polimicrobiana da cavidade amniótica.

Em casos de infecção da cavidade amniótica no segundo trimestre de gestação, as próprias bactérias e seus produtos estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos gestacionais (12), perturbando o perfil anti-inflamatório da gestação nesse momento (5). A produção de Interleucina (IL)-6, IL-8, IL-10 e Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), em casos de estimulação bacteriana, revelou que as bactérias estimulam a expressão de RNAm de citocinas pró e anti-inflamatórias (50) e potencializando a indução do parto.

Além disso, a IL-6 já foi descrita como o principal biomarcador de inflamação e como preditor do parto pré-termo (37), sendo que níveis elevados no líquido amniótico de gestantes no segundo trimestre associados com maior risco (51). A identificação de IL-8 no líquido amniótico foi associada tanto à presença de RPM-PT quanto de TPP (52).

Ainda nessa linha, níveis elevados de TNF- α foram descritos no líquido amniótico na presença de PP e de infecção intra-amniótica (53). Em um estudo com diferentes modelos de estimulação, os resultados com *Escherichia coli in vitro* demonstraram que a produção de TNF- α estava significativamente aumentada no modelo em que ambos os lados da membrana (cório e âmnio) foram estimulados com a bactéria (54). Esse resultado sugere que, pelas propriedades imunotóxicas dessa citocina, sua produção e secreção ocorra em casos de infecção mais complicados, como foi mimetizado no estudo pela estimulação de ambos os lados da membrana. Nos tecidos gestacionais foram observados que a presença de IL-6 (55), IL-10 (56) e TNF- α (53) induz a produção de prostaglandina E2 (PGE2), que está intimamente relacionada com o início e a progressão do trabalho de parto.

Já no cenário anti-inflamatório, a IL-10 já teve sua função associada com a regulação das complicações gestacionais que tem como causa o processo inflamatório(57). Em gestações acometidas por TPP e infecção intra-amniótica foi observada concentrações aumentadas de IL-10 no líquido amniótico, quando comparado à pacientes sem infecção (58).

Ainda em relação aos mediadores da resposta imune inata, os antimicrobianos naturais secretados por células epiteliais desempenham funções importantes na mucosa do trato genital inferior, incluindo a manutenção do micro-ambiente interno, controle da inflamação e prevenção da invasão de microrganismos nas células do hospedeiro (59). Estudos mostraram

que alguns deles, como a *human beta defensin* (HBD) 2, têm uma estimulação aumentada por citocinas inflamatórias em tecidos gestacionais (60). Estudo demonstrou aumento de HBD-2 no líquido amniótico na presença de infecção e/ou inflamação na cavidade amniótica em pacientes em TPP e RPM-PT, demonstrando que essa defensina é constituinte do líquido amniótico e participa da resposta antimicrobiana (61).

1.3. Invasão microbiana da cavidade amniótica e parto pré-termo

Embora a etiologia do parto pré-termo seja multifatorial, vários microrganismos têm sido associados à sua patogênese, especialmente através da ascensão do trato genital inferior (37), com subsequente instalação de corioamnionite. A corioamnionite histológica é definida como inflamação das membranas corioamnióticas, sendo que pode estar presente em mais de 20% das gestações de termo e em mais de 50% dos partos pré-termo, e a maioria dos casos ocorrem na ausência de sinais clínicos e de sintomas de infecção (62-64). Marconi et al.(65), em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, demonstraram infecção da cavidade amniótica em gestantes que apresentaram essa intercorrência gestacional. O estudo demonstrou que tal infecção é de natureza polibacteriana e que, na maioria dos casos, há combinação de microrganismos aeróbios e anaeróbios.

Kim et al. (66) propuseram modelo de invasão microbiana intra-amniótica, no qual o estágio inicial ocorre por uma invasão intra-amniótica através de uma discreta região das membranas corioamnióticas, após ascensão do microrganismo pelo trato genital inferior feminino, seguido por uma proliferação bacteriana no líquido amniótico e, posteriormente, a extensão e espraiamento dessa infecção por toda a região das membranas. Nesse sentido, os patógenos mais frequentemente isolados no líquido amniótico de pacientes com infecção intra-amniótica são comumente encontrados na microbiota vaginal, incluindo *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Leptotrichia amnionii*, *Bacterioides fragilis*, *Prevotella bivia*, *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* (67, 68). Quando existe a predominância dessas espécies bacterianas em relação aos lactobacilos, caracteriza-se a alteração da microbiota vaginal.

Esse tipo de alteração está associada ao risco de parto pré-termo (22), já que espécies bacterianas em elevada concentração podem ascender à cavidade amniótica e suscitar resposta inflamatória nos tecidos gestacionais com subsequente deflagração do trabalho de parto, uma vez que ocorre o desbalanço do perfil inflamatório previamente estabelecido. Evidências desse

processo são as observações de que citocinas inflamatórias estão aumentadas no líquido amniótico de gestantes com infecção intra-amniótica, especialmente aquelas causadas por *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* (69, 70).

Considerando o cenário polibacteriano, as principais espécies bacterianas detectadas no líquido amniótico tanto no TPP como na RPM-PT são *U. urealyticum* e *M. hominis*. Em outros tipos de amostras, a prevalência de *U. urealyticum* e *M. hominis* durante a gravidez tem uma grande variabilidade que depende primariamente das características demográficas como localização geográfica, nível socioeconômico e número de parceiros sexuais, e secundariamente ao tipo de estudo e método diagnóstico (71). Nesse sentido, revisão feita por Capoccia et al. (71) mostrou que a prevalência de *U. urealyticum* e *M. hominis* pode variar no líquido amniótico de 3.3% a 63.0% e 1.4% a 35.5%, e no conteúdo vaginal de 3.7% a 89.7% e 2.5% a 55.0%, respectivamente.

Estudos têm associado à infecção por *U. urealyticum* tanto no TPP quanto na RPM-PT em conteúdos vaginais (72, 73), de líquido amniótico (74, 75) e secreção cervical (76), enquanto o *M. hominis* foi associado ao TPP em conteúdos vaginais (77) e de líquido amniótico (78) e com RPM-PT somente em conteúdos vaginais (73). Ainda que *U. urealyticum* seja mais prevalente na RPM-PT comparado ao *M. hominis* (73, 78), a coocorrência dessas bactérias no conteúdo vaginal suscita resultado adverso gestacional mais severo comparado à infecção simples por *U. urealyticum* (79).

Nos estudos relacionados à pesquisa e associação de *M. hominis* e desfechos gestacionais adversos, Harada et al. (77) demonstraram associação significativa de TPP e *M. hominis* em amostras de conteúdo vaginal e Lamont et al. (80) confirmaram essa associação quando rastrearam a colonização/infecção em líquido amniótico pelo método de biologia molecular.

Uma vez que a infecção polibacteriana envolve interações complexas entre as espécies, a presença na cavidade amniótica de diversas combinações de espécies bacterianas, sua carga e patogenicidade podem modificar o efeito causado pelos micoplasmas genitais. Além disso, essas interações podem resultar na modulação da expressão gênica dos fatores de virulência de algumas cepas, aumentando sua patogenicidade (81).

1.3.1. Micoplasmas genitais e outros patógenos oportunistas

O termo Mollicutes se tornou uma denominação genérica para todos os microrganismos da classe (82), que são caracterizados pela ausência da parede celular de peptidoglicano. Por isso, podem assumir formas cocóides ou filamentosas e são pouco coradas pela tradicional coloração do Gram, dificultando sua identificação direta em amostras clínicas.

Devido a sua capacidade de adesão, *Ureaplasma* e *Mycoplasma* são os dois gêneros da classe Mycoplasmataceae que podem colonizar o trato genitourinário humano. A presença de proteínas da superfície na membrana celular possibilitam sua ligação às células do hospedeiro. Oh et al. (83) descreveram que gestações complicadas por RPM-PT com infecção intra-amniótica por micoplasmas genitais, houve indução de resposta inflamatória mais intensa no líquido amniótico quando comparado à infecções por outras espécies bacterianas. A espécie *M. hominis* tem como característica a formação de colônias em forma de "ovo frito" (84) e utiliza a arginina como substrato no seu metabolismo (85). Em 1924, pela característica única entre os micoplasmas de utilizar como substrato a ureia e não a arginina ou glicose, foi designada a espécie *U. urealyticum* (86).

Os serotipos existentes de *Ureaplasma* spp. foram agrupados em duas espécies distintas, *U. parvum* e *U. urealyticum* (87), e sua patogenicidade está associada a capacidade de adesão à superfícies de mucosa. O antígeno de múltiplas bandas (AMB) é a principal lipoproteína de superfície e considerado o principal fator de virulência dessa espécie (88), sendo reconhecida pelo sistema imune através de TLR-1, TLR-2 e TLR-6 (89). Além disso, estudos já mostraram a capacidade de *Ureaplasma* spp. de formar biofilmes (90) e produzir protease IgA que funciona como mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro, resultando na colonização da espécie (91).

Na era da determinação do microbioma placentário, Aagaard et al. (92) observaram que esse órgão possui um nicho composto por uma microbiota comensal não patogênica composta por espécies dos filos Firmicutes, Tenericutes e Fusobacteria. Em discordância com esses resultados, estudo recente mostrou ausência de bactérias em amostras de placentas coletadas antes do início do trabalho de parto, exceto pelo fato da presença de *S. agalactiae* em 5% das amostras (93).

As espécies *M. hominis* e *U. urealyticum* são constituintes do *core* patológico da vaginose bacteriana, principal alteração da microbiota vaginal, na qual ocorre a substituição do predomínio de *Lactobacillus* spp. por outras espécies, predominantemente anaeróbias (94). De forma interessante, Rosenstein et al. (94) demonstraram uma correlação positiva entre o aumento do escore da vaginose bacteriana e o número de amostras em que se detectava a presença de *M. hominis*.

Além das bactérias encontradas na microbiota vaginal, no cenário da infecção no parto pré-termo, *Streptococcus agalactiae* (GBS) tem papel importante. Aproximadamente 6,8% dos recém-nascidos com infecção precoce por GBS evoluem para o óbito (95). Estudos vêm mostrando associação significativa da prevalência de colonização por GBS com parto pré-termo (96), assim como com sepse neonatal (97). Além disso, GBS foi a espécie bacteriana mais comumente isolada em tecidos maternos e fetais em mulheres com aborto espontâneo (98).

Adicionalmente, *Fusobacterium nucleatum*, que é um patógeno oral, está sendo frequentemente identificado em culturas de placenta e de membranas corioamnióticas em gestantes com TPP e RPM-PT assim como em óbito neonatal (99, 100) e sua abundância relativa na placenta suporta a ideia de propagação hematogênica da cavidade oral para a placenta (92, 101), o que é reforçada pela sua presença no cordão umbilical de gestantes normais (102).

1.4. Cultura das membranas corioamnióticas *in vitro*

Os trabalhos *in vitro* que mimetizam a infecção intra-amniótica são importantes para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na interface materno-fetal que levam ao desfecho gestacional adverso, uma vez que revelam que os tecidos gestacionais, respondem ao estímulo bacteriano com o aumento da produção de citocinas (54).

Fortunato et al. (103) desenvolveram uma técnica de cultura de membranas corioamnióticas que mantém a integridade do tecido, assim como suas funções autócrinas e parácrinas. Desde então foram desenvolvidos diversos trabalhos utilizando essa técnica, visando o melhor entendimento da relação materno-fetal, assim como o funcionamento e resposta dos diferentes sistemas do organismo (104, 105). Menon et al. (40) demonstraram que a produção de citocinas inflamatórias e expressão de receptores Toll-like, em membranas corioamnióticas *in vitro*, dependem da espécie bacteriana envolvida na infecção. Utilizando-se

uma outra técnica, mas com o mesmo princípio e objetivos, Zaga-Clavellina et al. (54) identificaram aumento significativo na produção de citocinas pró- e anti-inflamatória IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IL-10 nas membranas fetais *in vitro* na presença de *Escherichia coli*.

Nesse mesmo sentido, trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (106) foi observado que a produção de citocinas e o perfil inflamatório de membranas corioamnióticas *in vitro* varia de acordo com a carga bacteriana e as interações entre espécies. Além disso, observou-se que a estimulação das membranas corioamnióticas *in vitro* com micoplasmas genitais isolados ou em combinação levaram a resposta inflamatória moderada que pode ser regulada por marcadores anti-inflamatórios como IL-10, IL-13 e receptor solúvel TNFR-2. Outro estudo identificou que a estimulação das membranas corioamnióticas *in vitro* com *Gardnerella vaginalis* aumentou a produção tanto de IL-1 β e IL-6 como de peptídeos antimicrobianos, HBD-1, HBD-2 e HBD-3 (107).

Nos últimos anos, com a evolução das tecnologias e métodos de pesquisa, uma nova técnica de cultura começou a ser utilizada. Foi desenvolvido o método *organ-on-chip* para membranas corioamnióticas, onde é possível observar as interações e transições celulares em um sistema *transwell* (108, 109). Desse modo, diferentemente do método de cultura utilizado antes, é possível observar a comunicação entre as diversas camadas das membranas corioamnióticas frente a inúmeros estímulos e eventos, sendo um grande avanço para os estudos na área. Considerando os achados, se torna fundamental o papel dos estudos *in vitro* com membranas corioamnióticas para elucidar os mecanismos e a patogênese de eventos que contribuem para o desfecho gestacional adverso.

2. Referências

1. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1221:80-7.
2. Sarafana S, Coelho R, Neves A, Trindade J. Aspectos da imunologia da gravidez. *Acta Med Port* 2007;355-8.
3. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:425-33.
4. Raghupathy R. Maternal anti-placental cell-mediated reactivity and spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 1997;37:478-84.
5. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353-6.
6. Chaouat G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol* 2007;29:95-113.
7. Denney JM, Nelson EL, Wadhwa PD, et al. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. *Cytokine* 2011;53:170-7.
8. Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. *Hum Pathol* 2004;35:47-54.
9. von Dadelszen P, Watson RW, Noorwali F, et al. Maternal neutrophil apoptosis in normal pregnancy, preeclampsia, and normotensive intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:408-14.
10. Arntzen KJ, Lien E, Austgulen R. Maternal serum levels of interleukin-6 and clinical characteristics of normal delivery at term. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997;76:55-60.
11. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG* 2006;113 Suppl 3:17-42.
12. Peltier MR. Immunology of term and preterm labor. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:122.
13. Orsi NM. Cytokine networks in the establishment and maintenance of pregnancy. *Hum Fertil (Camb)* 2008;11:222-30.
14. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci* 2009;16:206-15.
15. Jacinto S, Pamplona K, Soares M. Manual Técnico de Gestação de Alto Risco. *MS, editor* 2012. p. 302.

16. Menon R, Nicolau NN, Bredson S, Polettini J. Fetal Membranes: Potential Source of Preterm Birth Biomarkers. *General Methods in Biomarker Research and their Applications. Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications*. Springer, Dordrecht 2015.
17. Crump C, Sundquist K, Sundquist J, Winkleby MA. Gestational age at birth and mortality in young adulthood. *JAMA* 2011;306:1233-40.
18. Beck S, Wojdyla D, Say L, et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ* 2010;88:31-8.
19. Slattery MM, Geary M, Morrison JJ. Obstetric antecedents for preterm delivery. *J Perinat Med* 2008;3:306-9.
20. Lo CC, Hsu JJ, Hsieh CC, Hsieh TT, Hung TH. Risk factors for spontaneous preterm delivery before 34 weeks of gestation among Taiwanese women. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2007;46:389-94.
21. Jensen DM, Damm P, Moelsted-Pedersen L, et al. Outcomes in type 1 diabetic pregnancies: a nationwide, population-based study. *Diabetes Care* 2004;27:2819-23.
22. Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, et al. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG* 2009;116:1315-24.
23. Behrman RE, Butler AS, Institute of Medicine (US) Committee on Understanding Premature Birth and Assuring Healthy Outcomes. Preterm birth: Causes, Consequences, and Prevention. *The National Academic press*. 2007; 313-429.
24. Luu TM, Rehman Mian MO, Nuyt AM. Long-Term Impact of Preterm Birth: Neurodevelopmental and Physical Health Outcomes. *Clin Perinatol*. 2017;44:305-14.
25. Baraldi E, Carraro S, Filippone M. Bronchopulmonary dysplasia: definitions and long-term respiratory outcome. *Early Hum Dev* 2009;85(10 Suppl):S1-3.
26. Lee T, Silver H. Etiology and epidemiology of preterm premature rupture of the membranes. *Clin Perinatol* 2001;28:721-34.
27. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 2003;101:178-93.
28. Bulletins-Obstetrics ACoP. ACOG Practice Bulletin No. 80: premature rupture of membranes. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. *Obstet Gynecol* 2007;109:1007-19.
29. Corchia C, Ferrante P, Da Frè M, et al. Cause-specific mortality of very preterm infants and antenatal events. *J Pediatr* 2013;162:1125-32, 32.e1-4.

30. Storness-Bliss C, Metcalfe A, Simrose R, Wilson RD, Cooper SL. Correlation of residual amniotic fluid and perinatal outcomes in periviable preterm premature rupture of membranes. *J Obstet Gynaecol Can* 2012;34:154-8.
31. Goldenberg RL. The management of preterm labor. *Obstet Gynecol* 2002;100:1020-37.
32. Parry S, Strauss JF, 3rd. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998;338:663-70.
33. Romero R, Gotsch F, Pineles B, Kusanovic JP. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. *Nutr Rev* 2007;65:S194-202.
34. French JI, McGregor JA. The pathobiology of premature rupture of membranes. *Semin Perinatol* 1996;20:344-68.
35. Kendal-Wright CE. Stretching, mechanotransduction, and proinflammatory cytokines in the fetal membranes. *Reprod Sci* 2007;14:35-41.
36. Calvin SE, Oyen ML. Microstructure and mechanics of the chorioamnion membrane with an emphasis on fracture properties. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1101:166-85.
37. 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.
38. Haddad R, Gould BR, Romero R, et al. Uterine transcriptomes of bacteria-induced and ovariectomy-induced preterm labor in mice are characterized by differential expression of arachidonate metabolism genes. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:822-8.
39. Andrews WW, Goldenberg RL, Faye-Petersen O, Cliver S, Goepfert AR, Hauth JC. The Alabama Preterm Birth study: polymorphonuclear and mononuclear cell placental infiltrations, other markers of inflammation, and outcomes in 23- to 32-week preterm newborn infants. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:803-8.
40. Menon R, Peltier MR, Eckardt J, Fortunato SJ. Diversity in cytokine response to bacteria associated with preterm birth by fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2009;201:306.e1-6.
41. Olmos-Ortiz A, Flores-Espinosa P, Mancilla-Herrera I, Vega-Sánchez R, Díaz L, Zaga-Clavellina V. Innate Immune Cells and Toll-like Receptor-Dependent Responses at the Maternal-Fetal Interface. *Int J Mol Sci* 2019;20(.
42. Bauer S, Müller T, Hamm S. Pattern recognition by Toll-like receptors. *Adv Exp Med Biol* 2009;653:15-34.
43. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
44. Leroy MJ, Dallot E, Czerkiewicz I, Schmitz T, Breuiller-Fouché M. Inflammation of choriodecidua induces tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of human myometrial cells. *Biol Reprod* 2007;76:769-76.

45. Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, et al. Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:1346-55.
46. Koga K, Mor G. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:587-600.
47. Patni S, Flynn P, Wynen LP, Seager AL, Morgan G, White JO, et al. An introduction to Toll-like receptors and their possible role in the initiation of labour. *BJOG* 2007;114:1326-34.
48. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
49. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990;249:1431-3.
50. Griesinger G, Saleh L, Bauer S, Husslein P, Knofler M. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines of human placental trophoblasts in response to pathogenic bacteria. *J Soc Gynecol Investig* 2001;8:334-40.
51. Goepfert AR, Goldenberg RL, Andrews WW, et al. The Preterm Prediction Study: association between cervical interleukin 6 concentration and spontaneous preterm birth. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:483-8.
52. Jia X. Value of amniotic fluid IL-8 and Annexin A2 in prediction of preterm delivery in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *J Reprod Med* 2014;59:154-60.
53. Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, 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.
54. Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera H, et al. In vitro secretion profiles of interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF alpha after selective infection with *Escherichia coli* in human fetal membranes. *Reprod Biol Endocrinol* 2007;5:46.
55. Mitchell MD, Dudley DJ, Edwin SS, Schiller SL. Interleukin-6 stimulates prostaglandin production by human amnion and decidual cells. *Eur J Pharmacol* 1991;192:189-91.
56. Mitchell MD, Simpson KL, Keelan JA. Paradoxical proinflammatory actions of interleukin-10 in human amnion: potential roles in term and preterm labour. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4149-52.
57. Hanna N, Hanna I, Hleb M, et al. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J Immunol* 2000;164:5721-8.
58. Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, et al. The anti-inflammatory limb of the immune response in preterm labor, intra-amniotic infection/inflammation, and spontaneous parturition at term: a role for interleukin-10. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008;21:529-47.

59. Yarbrough VL, Winkle S, Herbst-Kralovetz MM. Antimicrobial peptides in the female reproductive tract: a critical component of the mucosal immune barrier with physiological and clinical implications. *Hum Reprod Update* 2015;21:353-77.
60. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta* 2007;28:161-9.
61. Soto E, Espinoza J, Nien JK, et al. Human beta-defensin-2: a natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007;20:15-22.
62. Polettini J, Peraçoli JC, Candeias JM, 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;144:27-31.
63. Edwards RK. Chorioamnionitis and labor. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2005;32:287-96.
64. Silva MG, Peraçoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Peraçoli MT. Cervical Lactobacillus and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynaecol Obstet* 2003;81:175-82.
65. Marconi C, de Andrade Ramos BR, Peraçoli JC, Donders GG, da Silva MG. Amniotic fluid interleukin-1 beta and interleukin-6, but not interleukin-8 correlate with microbial invasion of the amniotic cavity in preterm labor. *Am J Reprod Immunol* 2011;65:549-56.
66. Kim MJ, Romero R, Gervasi MT, et al. Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection. *Lab Invest* 2009;89:924-36.
67. Sherman DJ, Tovbin J, Lazarovich T, et al. Chorioamnionitis caused by gram-negative bacteria as an etiologic factor in preterm birth. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:417-23.
68. DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. *Semin Fetal Neonatal Med* 2012;17:2-11.
69. Perni SC, Vardhana S, Korneeva I, 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;191:1382-6.
70. Lee SM, Park KH, Jung EY, Kook SY, Park H, Jeon SJ. Inflammatory proteins in maternal plasma, cervicovaginal and amniotic fluids as predictors of intra-amniotic infection in preterm premature rupture of membranes. *PLoS One* 2018;13:e0200311.
71. Capoccia R, Greub G, Baud D. Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis and adverse pregnancy outcomes. *Curr Opin Infect Dis* 2013;26:231-40.

72. Abele-Horn M, Scholz M, Wolff C, Kolben M. High-density vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization as a risk factor for chorioamnionitis and preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000;79(9):973-8.
73. Kacerovský M, Drahosová M, Hornychová H, et al. [Amniotic fluid interleukin 6 levels in preterm premature rupture of membranes]. *Ceska Gynekol* 2009;74:403-10.
74. Gerber S, Vial Y, Hohlfeld P, Witkin SS. Detection of *Ureaplasma urealyticum* in second-trimester amniotic fluid by polymerase chain reaction correlates with subsequent preterm labor and delivery. *J Infect Dis* 2003;187:518-21.
75. Witt A, Berger A, Gruber CJ, et al. Increased intrauterine frequency of *Ureaplasma urealyticum* in women with preterm labor and preterm premature rupture of the membranes and subsequent cesarean delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:1663-9.
76. Aaltone R, Jalava J, Laurikainen E, Kärkkäinen U, Alanen A. Cervical *ureaplasma urealyticum* colonization: comparison of PCR and culture for its detection and association with preterm birth. *Scand J Infect Dis* 2002;34:35-40.
77. Harada K, Tanaka H, Komori S, et al. Vaginal infection with *Ureaplasma urealyticum* accounts for preterm delivery via induction of inflammatory responses. *Microbiol Immunol* 2008;52:297-304.
78. 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;32:323-6.
79. Larsen B, Hwang J. *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2010;2010.
80. Lamont RF, Taylor-Robinson D, Wigglesworth JS, Furr PM, Evans RT, Elder MG. The role of mycoplasmas, ureaplasmas and chlamydiae in the genital tract of women presenting in spontaneous early preterm labour. *J Med Microbiol* 1987;24:253-7.
81. Sibley CD, Duan K, Fischer C, et al. Discerning the complexity of community interactions using a *Drosophila* model of polymicrobial infections. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000184.
82. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1094-156.
83. Oh KJ, Lee KA, Sohn YK, et al. Intraamniotic infection with genital mycoplasmas exhibits a more intense inflammatory response than intraamniotic infection with other microorganisms in patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2010;203:211.e1-8.
84. Taylor-Robinson D, Furr PM. Recovery and identification of human genital tract mycoplasmas. *Isr J Med Sci* 1981;17:648-53.
85. Edward D. A suggested classification and nomenclature for organisms of the pleuropneumonia. *Int J Syst Evol Microbiol* 1955;85-93.

86. Shepard MC, Lunceford CD. Occurrence of urease in T strains of Mycoplasma. *J Bacteriol* 1967;93:1513-20.
87. Kong F, Ma Z, James G, Gordon S, Gilbert GL. Molecular genotyping of human Ureaplasma species based on multiple-banded antigen (MBA) gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1921-9.
88. Zheng X, Teng LJ, Watson HL, Glass JI, Blanchard A, Cassell GH. Small repeating units within the Ureaplasma urealyticum MB antigen gene encode serovar specificity and are associated with antigen size variation. *Infect Immun* 1995;63:891-8.
89. Shimizu T, Kida Y, Kuwano K. Ureaplasma parvum lipoproteins, including MB antigen, activate NF- κ B through TLR1, TLR2 and TLR6. *Microbiology* 2008;154:1318-25.
90. Pandelidis K, McCarthy A, Chesko KL, Viscardi RM. Role of biofilm formation in Ureaplasma antibiotic susceptibility and development of bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates. *Pediatr Infect Dis* 2013;32:394-8.
91. Tantengco OAG, Yanagihara I. Current understanding and treatment of intra-amniotic infection with Ureaplasma spp. *J Obstet Gynaecol Res* 2019;45:1796-808.
92. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 2014;6:237ra65.
93. de Goffau MC, Lager S, Sovio U, et al. Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens. *Nature* 2019;572:329-34.
94. Rosenstein IJ, Morgan DJ, Sheehan M, Lamont RF, Taylor-Robinson D. Bacterial vaginosis in pregnancy: distribution of bacterial species in different gram-stain categories of the vaginal flora. *J Med Microbiol* 1996;45:120-6.
95. Phares CR, Lynfield R, Farley MM, et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA* 2008;299:2056-65.
96. Valkenburg-vandenBerg AW, Sprij AJ, Dekker FW, Dörr PJ, Kanhai HH. Association between colonization with Group B Streptococcus and preterm delivery: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009;88:958-67.
97. Park HR, Harris SM, Boldenow E, et al. Group B streptococcus activates transcriptomic pathways related to premature birth in human extraplacental membranes in vitro. *Biol Reprod* 2018;98:396-407.
98. Hooper K, McDonald TA. The PBDEs: an emerging environmental challenge and another reason for breast-milk monitoring programs. *Environ Health Perspect* 2000;108:387-92.
99. Cahill RJ, Tan S, Dougan G, et al. Universal DNA primers amplify bacterial DNA from human fetal membranes and link Fusobacterium nucleatum with prolonged preterm membrane rupture. *Mol Hum Reprod* 2005;11:761-6.

100. Han YW, Fardini Y, Chen C, et al. Term stillbirth caused by oral *Fusobacterium nucleatum*. *Obstet Gynecol* 2010;115:442-5.
101. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG* 2002;109:527-33.
102. Jiménez E, Fernández L, Marín ML, et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 2005;51:270-4.
103. Fortunato SJ, Menon R, Swan KF, Lyden TW. Organ culture of amniochorionic membrane in vitro. *Am J Reprod Immunol* 1994;32:184-7.
104. Menon R, Swan KF, Lyden TW, Rote NS, Fortunato SJ. Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1 beta and interleukin-6) in amniochorionic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:493-500.
105. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Presence of four tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3 and -4) in human fetal membranes. *Am J Reprod Immunol* 1998;40:395-400.
106. Noda-Nicolau NM, Poletini J, Peltier MR, da Silva MG, Menon R. Combinations and loads of bacteria affect the cytokine production by fetal membranes: An in vitro study. *Am J Reprod Immunol* 2016;76:504-11.
107. Zaga-Clavellina V, Martha RV, Flores-Espinosa P. In vitro secretion profile of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6, and of human beta-defensins (HBD)-1, HBD-2, and HBD-3 from human chorioamniotic membranes after selective stimulation with *Gardnerella vaginalis*. *Am J Reprod Immunol* 2012;67:34-43.
108. Richardson L, Jeong S, Kim S, Han A, Menon R. Amnion membrane organ-on-chip: an innovative approach to study cellular interactions. *FASEB J* 2019;33:8945-60.
109. Richardson L, Gnecco J, Ding T, et al. Fetal Membrane Organ-On-Chip: An Innovative Approach to Study Cellular Interactions. *Reprod Sci* 2019:1933719119828084.

Capítulo II

Artigo científico

Manuscrito apresentado de acordo com as normas para submissão no periódico *American Journal of Reproductive Immunology* (Fator de impacto: 3.091).

***In vitro* study of polybacterial infection of chorioamniotic membranes: modulation of immune response at maternal-fetal interface.**

Giovana Fernanda Cosi Bento¹, Mariana de Castro Silva¹, Carolina Santimaria Rampazzo¹, Geovanna Cristofani Cursino¹, Guilherme Nastaro¹, Jossimara Polettini², Márcia Guimarães da Silva¹.

Affiliation:

¹ Department of Pathology, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

² Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Passo Fundo, RS, Brazil.

1. ABSTRACT

Problem: Preterm labor (PTL) is considered one of the main obstetric clinic problems that occurs in almost 10% of all pregnancies in the world. Polybacterial invasion and inflammation of the amniotic cavity is a common scenario in PTL that results in host inflammatory response. We aimed to evaluate the production and kinetics of inflammatory mediators in *in vitro* models of fetal membrane coinfection with mycoplasmas and other bacteria species.

Method of Study: Fetal membranes collected from healthy pregnancies by c-section were stimulated with heat-killed genital micoplasmas (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*), *Streptococcus agalactiae* and *Fusobacterium nucleatum*, alone or in combination. Culture supernatants were collected at five different time-points: 0h, 6h, 12h, 18h, and 24h. Interleukin (IL) -6, IL-8, IL-10 and Factor Necrosis Tumoral alpha (TNF- α) were measured in the culture medium by immunoenzymatic assay (ELISA).

Results: Stimulation by genital mycoplasmas, alone or in combination, increased the levels of proinflammatory cytokines in relation to control group, whereas *F. nucleatum* and *S. agalactiae* did not produce significant differences. Highest levels of TNF- α were detected at time-point 6 and 12, in contrast to IL-10, which peaks appeared at time-point 18h.

Conclusions: *M. hominis* and *U. parvum* sustain a proinflammatory response in the fetal membranes *in vitro* alone or in combination, but did not respond in the same way in the presence of other bacteria. Therefore, the polymicrobial infection results in a proinflammatory pattern and a balance of anti-inflammatory response.

Keywords: Genital mycoplasmas, polybacterial infection, fetal membranes *in vitro* cultivation, *Streptococcus agalactiae*, *Fusobacterium nucleatum*.

2. INTRODUCTION

The term labor is a result of a complex network of events, including mechanisms and mediators of the endocrine, immune and nervous system (1,2). However, despite existing technologies and numerous studies, the whole knowledge of the mechanism involved in term labor are not fully elucidated (3). The major consequence of this is the difficulty in preventing preterm labor (PTL), considered one of the main problems of the obstetric clinic, and a multifactorial obstetric complication that occurs in approximately 9.6% of all pregnancies in the world (4,5).

Despite the multifactorial etiology of PTL, microbial invasion of the amniotic cavity and inflammation are the most common factors associated with this occurrence. In addition to neonatal mortality, preterm delivery-associated comorbidities often lead to several consequences in the newborn's life resulting in economic, physical and psychological costs (6).

Previous studies demonstrated that 30% of preterm births are associated with infection and inflammatory processes (7), caused mainly by the bacteria presence in the amniotic cavity (8,9). Such infections are usually subclinical and may be caused by microorganisms that are difficult detected by microbiological cultures (8). The main route of amniotic cavity infection is through the ascending microorganisms from lower genital tract (10). In 2009, Kim et al. (11) proposed a model of intra-amniotic microbial invasion, in which the initial stage occurs by intra-amniotic invasion through a discrete fetal membrane region, followed by bacterial proliferation in the amniotic fluid and, subsequently, the extent of this infection would reach the entire fetal membrane surface, starting by the amnion. The presence of the microorganisms can be recognized by the immune system, which stimulate inflammatory pathways (12), increasing proinflammatory cytokines production that induce additional prostaglandins release, responsible for the onset of uterine contractions (7, 13).

Studies have demonstrated that the ethiology of the maternal-fetal interface infection comprehends a polybacterial scenario, notably from species also detected in the lower genital

tract (13,14). Among this bacteria diversity, the most frequently detected bacteria in the amniotic fluid of pregnancies complicated by preterm premature rupture of membranes (pPROM) are *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma. spp* (15,16). The prevalence of these species depends on demographic features, and *M. hominis* presence can vary from 1.4% to 35.5% in amniotic fluid and 2.5% to 55.0% in vaginal fluid in different studies (17,18). Regarding *Ureaplasma spp.*, *U. parvum* and *U. urealyticum* are the most common species identified in preterm birth infants (19,20), and the *U. urealyticum* presence in amniotic fluid can vary from 3.3% to 63.0%, whereas in vaginal fluid, the rate varies from 3.7% to 89.7% (17).

The real contribution of the genital mycoplasmas amniotic cavity infection in the pathogenesis of PTL and pPROM is still to be elucidated. Recent studies show that although *U. urealyticum* is more prevalent in pPROM compared to *M. hominis* (21,22), the cooccurrence of these bacteria in vaginal fluid leads to more severe adverse pregnancy outcomes compared to the presence of *U. urealyticum* alone (23,24).

Once genital mycoplasmas are usually not the sole microorganism present in the intraamniotic cavity, the polybacterial invasion and inflammation of the amniotic cavity is a common scenario in PTL (14,25). Besides mollicutes, the presence of *Streptococcus agalactiae* in maternal genital tract has been associated with PTL (26) and early neonatal sepsis (27). Approximately 6.8% of infants diagnosed with early onset disease from *S. agalactiae* results in mortality (28).

Additionally, *Fusobacterium nucleatum*, which is an oral opportunistic pathogen, is often being identified by culture of amniotic fluid and placenta in pregnant women with PTL and pPROM, as well as in neonatal death (29,30). Its relative abundance in the placenta supports the idea of hematogenous propagation from the oral cavity to the placenta (31), which is reinforced by its presence in the umbilical cord blood of healthy pregnancies (32).

The inflammatory milieu that results from specific bacteria combination may influence the pregnancy outcome, once the produced cytokines can be related to the mechanisms involved in the fetal membranes weakness (33), a feature of parturition. *In vitro* studies that mimic intra-amniotic infection are important for a better understanding of the mechanisms involved in the maternal-fetal interface that lead to adverse gestational outcome, since they reveal the gestational tissues, especially the amniotic epithelium, chorionic and deciduous cells responses to bacterial stimulation (34,35). Fortunato et al. (36) have described a fetal membrane culture technique, which maintains the morphology and autocrine and paracrine relationships within this tissue.

We hypothesized that different combinations of species, including mycoplasmas and other opportunistic pathogens, may produce a distinct inflammatory response in the fetal membranes. Besides that, according to our previous study, mycoplasmas may not be a threat to pregnancy, and its response depend on their load, localization, and the presence of other bacteria, such as *Gardnerella vaginalis* (37).

The knowledge of innate immune response at intrauterine environments according to different species interactions is important for understanding the mechanisms that trigger the infection-associated pathways that culminate in PTL or pPROM. We aimed to evaluate the inflammatory mediators production in *in vitro* models of amniochorion membrane coinfection with *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, *Streptococcus agalactiae* and *Fusobacterium nucleatum*.

3. MATERIAL AND METHODS

Collection of data and samples as well as their utilization for research purposes were approved by Ethics in Research Committee of Botucatu Medical School, UNESP (protocol 96278418.9.0000.5411-2018, FMB, UNESP). All patients signed written informed consent.

3.1. Patients and fetal membranes collection

We cross-sectionally obtained fetal membranes immediately after delivery from elective cesarean sections at term (>37 weeks of gestation) prior to the onset of labor (n=7) at Unimed Botucatu Hospital-Brazil, from January to October of 2019. Women with a prior history of PTB or pPROM or with PTB or pPROM in the current pregnancy were not included, as well as patients with obstetrical and medical complications or clinical/subclinical infections (subclinical infections as indicated by fever, or those undergoing antibiotic treatment). Samples were immediately transported to lab under appropriate conditions. Decidua and adhering clot clots were removed from the membranes using warm saline and sterile cotton gauze, and the remaining amnion–chorion were placed in Hanks' balanced salt solution (HBSS; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) containing penicillin/streptomycin (5000IU/mL penicillin + 5000ug/mL streptomycin), and amphotericin B. Then, amnion–chorion tissue sections (6-mm diameter) were placed into a tissue culture plate as previously described (38,39) with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with fetal bovine serum, penicillin/streptomycin (5000IU/mL penicillin + 5000ug/mL streptomycin), and amphotericin B. Cultures were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 48 hours, and culture media was changed every 24 hours.

3.2. Stimulation of fetal membrane cultures

The American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) of *U. parvum* (formerly classified as *U. urealyticum* serotype 1 ATCC #27813), *M. hominis* (ATCC #15488), *S. agalactiae* (ATCC #12386), and *F. nucleatum* (ATCC #25586) were prepared and used to stimulate the fetal membranes. Preparation of *U. parvum* was performed through cultivation on Tryptic Soy Broth (TSB) supplemented with NaCl + KH₂PO₄ + 20% (v/v) horse serum + 25% (w/v) yeast extract + 20% (w/v) urea + 2% phenol red (pH=4.0). For *M. hominis* cultivation,

we used Tryptic Soy Broth (TSB) supplemented with NaCl + KH_2PO_4 + dextrose+ 20% (v/v) horse serum + 25% (w/v) yeast extract + VX supplement + 30% L-arginine HCL + 2% phenol red (pH=4.0). *F. nucleatum* was cultivated in anaerobe agar (HiMedia) supplemented with 5% defibrinated blood. Lastly, *S. agalactiae* was cultivated in blood agar.

In order to prepare a specific load of bacteria as proposed in this study, colony-forming units (CFU) were established for *S. agalactiae* and *F. nucleatum* through determination by McFarland standard

no. 4 to the turbidity on saline of 10^9CFU/mL . For *M. hominis* and *U. parvum*, colour-changing units (CCU) were established. Determination of CCUs was performed by 10-fold serial dilutions in 225 μl broth as described elsewhere (40), and it was defined as the lowest 10-fold serial dilution to cause a color change in the broth. Then, bacteria were heat-killed at 80°C for 1 hour and stored at -80°C until use.

Tissue cultures were stimulated for 24 hours with either 10^5CCU , 10^6CCU , or 10^6CFU of heat-killed bacterial suspension diluted in tissue culture media. Different treatments were performed as described in Table 1. Unstimulated samples were used as control in which was included only culture media without bacteria, and Lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli* O55:B5; Sigma, St. Louis, MO, USA) at 100 ng/mL was used as positive control in culture media for testing the stimulatory potential power of the fetal membranes in our culture environment. After stimulation, supernatants were collected from the culture at the moments of 0h, 6h, 12h, 18h and 24h from samples, stimulated and unstimulated controls and stored at -80°C until further analysis.

3.3. Immunoassays

Levels of interleukin (IL)-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were measured in culture supernatants were evaluated by using commercially available ELISA kit (R&D Systems, MN, USA), 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 492 nm in an automatic ELISA reader (Biotek Instruments Inc, BE, USA). Samples in which cytokine levels were below the sensitivity of the assay were set equal to the lower sensitivity value of the assay. The intra and interassay variability rates were < 10.0%. The minimum detectable levels for IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α were, respectively, 191.50 pg/mL, 212.70 pg/mL, 9.55 pg/mL, and 4.35 pg/mL.

3.4. Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism® software (version 5.00; GraphPad, Inc., San Diego, CA). The Kolmogorov-Smirnov test was used to check the data distribution. The levels of IL-6, IL-8, IL-10, and TNF- α were compared among groups at different moments using the nonparametric Kruskal-Wallis test, followed by Dunns post hoc test for comparison among groups. Differences where $p < 0.05$ were considered statistically significant.

4. RESULTS

The different combinations of either genital mycoplasmas alone or with *F. nucleatum*/*S. agalactiae* are defined here as polybacterial treatments, and the results of these treatments were compared with negative control group. Figure 1 (A-D) shows an overview of the IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α kinetics in the stimulation moment, and after 6, 12, 18 and 24 hours. Interleukin-6 had a peak point of production after 6 hours of stimulation for all treatments, whereas IL-8 had a heterogeneous production throughout the moments. Similar to IL-6, TNF- α had a peak of its production after 6 hours of stimulation, and IL-10 had it highest peak at moment 18h, moment which the modulation started.

Table 2 depicts proinflammatory cytokines levels among different groups at each time point after stimulation. Regarding IL-8, there were no statistical differences among the groups, except for the mycoplasmas combined with *F. nucleatum* that showed decreased levels at moment 6 hours [809.2 (804.5 - 973.4) pg/mL] compared to moment of the stimulation group [1048 (1048-1836) pg/mL] ($p<0.05$).

Interleukin-6 had the highest production among the cytokines analyzed (2520 pg/mL) and it is possible to observe a constant higher production after six hours of stimulation in all groups, including negative control group. The combination of mycoplasmas and *S. agalactiae* show significant increase of IL-6 after 6h ($p<0.05$) (Table 2).

The TNF- α production and liberation started six hours after bacterial stimulation. Mycoplasmas, alone or in combination (Mh+Up), induced increased levels of this cytokine after 6 and 12 hours of incubation ($p<0.05$) (Table 2). This scenario did not appear when culture was stimulated with *F. nucleatum* and *S. agalactiae*.

The anti-inflammatory pattern was observed according to the IL-10 levels. A significant increase in its concentration was seen after 18 hours of stimulation among mycoplasmas groups, either alone or combined [669.50 (56.67-924.60) pg/mL] ($p<0.05$). Stimulation of *M. hominis* alone showed a peak of concentration in the moment 24 hours [398.60 (127.10-423.20) pg/mL], but when combined with *U. parvum* the highest production occurred at moment 18h [669.50 (56.67-924.60) pg/mL], as shown in Table 3. The lowest levels of IL-10 were observed in the group where *S. agalactiae* was alone (12 hours - 9.88 (0-82.81) pg/mL).

Figures 2-5 show the cytokine concentrations of the groups in all time points after stimulation for each cytokine. Although levels of IL-6, IL-8 and IL-10 did not reach statistical difference among the groups, *S. agalactiae* at point 6 and 12 induced lower levels of TNF- α compared to positive control ($p<0.05$).

5. DISCUSSION

Polybacterial invasion and infection of the fetal membranes and amniotic cavity are a well-established risk factor for adverse pregnancy outcomes (14, 41). There is evidence indicating that IL-6 (42), IL-10 (43), and TNF- α (44) in gestational tissues are able to induce secretion of prostaglandin E2, culminating in the onset and progression of labor. An association between microbial infection of the decidua, placenta, fetal membranes, and different patterns of proinflammatory cytokines have been demonstrated by some *in vitro* studies (35,45). However, these studies are limited to a single pathogen and a specific time-point of cytokine production evaluation.

A limitation of the present study is that we were not able to stimulate the fetal membranes with different loads of the species, due to the size of the collected sample, and the short time required for the tissue culture preparation. Also, levels of IL-6 could not represent the real scenario of this cytokine, since the values were above the limit of detection of the assay, and further analysis are needed to better understand this response to the studied bacteria, including analysis of its receptors. Another limitation of the study was the number of cytokines measured; due to the quantity of supernatant, it was not possible to perform more assays, such as IL-1 β , IL-4, and IL-13.

A strength of our study is that we evaluated different combinations of opportunistic pathogens at various time points after stimulation, showing the cytokines kinetics, including the anti-inflammatory profile by IL-10 concentration. As in previous studies (35,37,38), we found that host inflammatory response varies based on the species and the combination of bacteria.

The most studied biomarker of inflammation associated with PTL is IL-6 (46), given that its high levels in the amniotic fluid were associated with this occurrence and infection (47). In our study, it was possible to demonstrate that the production of IL-6 started after six hours of stimulation and remain in its higher concentration during all 24h-stimulation. It is important

to note that the receptors and different models of signaling of IL6 are important to better understand its role. Study showed that *U. urealyticum*, alone or in combination with *M. hominis* increased the production of soluble receptor of IL-6 (sIL-6R) (48).

Considering IL-8 as a plausible biomarker for pPROM, the measure of this cytokine in amniotic fluid is more accurate than the measure in cervicovaginal fluid (49). Rizzo et al. (50) found increased IL-8 concentrations in cervical secretions in the presence of microbial invasion of the amniotic cavity by *U. urealyticum*, *M. hominis*, *F. nucleatum*, *S. agalactiae*, and *S. milleri*, although this study did not analyze the kinetics of these infection. In contrast, our results demonstrated higher levels of this cytokine from moment zero, which can be associated with neutrophil recruitment by the presence of bacteria species.

TNF- α was previously characterized in different trimesters of pregnancy, and its role involves influence in cell differentiation, including cell adhesion, hormone production and tissue remodeling (51,52). Its concentration was reported to be increased in the amniotic fluid in PTL cases and intra-amniotic infection (44). Zaga-Clavellina et al. (35) have demonstrated that TNF- α production was significantly higher when both sides of the membrane were stimulated with *Escherichia coli*, suggesting a coordination of this cytokine secretion by chorion-amnion layers. In our model, TNF- α was detected from 6h-culture in all groups, and increased significantly in the groups with mycoplasmas alone or in combination. Levels of TNF α increased until 12 hours after stimulation, and then started to decrease, due to IL-10 production.

A prior work of our study group (37), showed that genital mycoplasmas tend to buffer overwhelming inflammation generated by other pathogens by increasing the anti-inflammatory cytokine response (increasing IL- 10, IL-13 and sTNFR2) after 24h-culture. In this present study we confirm such trend regarding TNF- α production, as *M. hominis* and *U. parvum* alone or in combination produced greater levels of this cytokine stable manner after 6h-culture,

whereas in the presence of *F. nucleatum* or *S. agalactiae* the levels did not differ. Oh et al. (53) also observed that intra-amniotic infection with genital mycoplasmas induced a higher inflammatory response in amniotic fluid than an infection with other microorganisms in patients with pPROM. Furthermore, both *U. urealyticum* and *U. parvum* are able to produce IgA proteases that help the bacteria to escape the host mucosal immune system, resulting in colonization of the genital tract (54). This could facilitate the rise of the bacteria and the consequent infection of the amniotic cavity, triggering a proinflammatory response.

Accordingly, in the other studied bacteria showed the same trend regarding TNF- α and IL-10 kinetics: higher TNF- α production at the first time points of stimulation, whereas IL-10 was lower, probably by the beginning of its production. By the time point of 18 hours, IL-10 reached the production peak and TNF- α decreased its levels. Gotsch et al. (55) observed that women with PTL and intra-amniotic infection had higher concentration of IL-10 in amniotic fluid compared to patients without infection.

Different studies have demonstrated that *S. agalactiae* (56) and *F. nucleatum* (30) are associated with gestational adverse outcomes. Although in a recent study (57) *S. agalactiae* was the only microorganism present in the placenta before labor, in our model this specie neither alone or in combination have a significant production in chorioamniotic membranes. Since *S. agalactiae* has been classified by sequence types according different allelic profile, and the polysaccharide capsule may allow the establishment of biofilms and different response of the host, it could be plausible to assume that the strain used in this study could not have virulence factors to trigger an inflammatory response (58-60).

The different inflammatory response among species may be explained by the polybacterial scenario, that is, for certain bacteria is required to trigger an inflammatory response, and also that the immune cascade is specie-dependent.

6. CONCLUSION

Mycoplasma hominis and *Ureaplasma parvum* have an important role triggering the immune response, by themselves or in combination. Considering other bacteria, such as *Streptococcus agalactiae* and *Fusobacterium nucleatum*, did not have the same response in isolated groups, but in combination with Mycoplasmas may result in a proinflammatory pattern with a balance of anti-inflammatory response. It may be plausible to assume that is necessary to look for the whole polybacterial scenario and virulence factors, not only species alone, to verify the host immune response, and that genital micoplasmas disturb maternal interface and predispose adverse gestational outcomes.

7. REFERENCES

- 1 Peltier MR. Immunology of term and preterm labor. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003; 1:122.
- 2 Orsi NM. Cytokine networks in the establishment and maintenance of pregnancy. *Hum Fertil (Camb)*. 2008; 11:222-230.
- 3 Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, et al. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci*. 2009; 16:206-215.
- 4 Slattery MM, Geary M, Morrison JJ. Obstetric antecedents for preterm delivery. *J Perinat Med*. 2008; 36: 306–309.
- 5 Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, et al. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG*. 2009; 116:1315–1324.
- 6 Behrman RE, Butler AS, Institute of Medicine (US) Committee on Understanding Premature Birth and Assuring Healthy Outcomes. Preterm birth: Causes, Consequences, and Prevention. *The National Academic press*. 2007; 313-429.
- 7 Challis JRG. Mechanism of parturition and preterm labor. *Obstet Gynecol Surv*. 2000; 55: 650-60.
- 8 Andrews WW, Hauth JC, Goldenberg RL. Infection and preterm birth. *Am J Perinatol*. 2000; 17:357-365.
- 9 Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2002; 8:3-13.

- 10 Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, et al. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006; 11:317-326.
- 11 Kim MJ, Romero R, Gervasi MT, et al. Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection. *Lab Invest.* 2009; 89:924-936.
- 12 Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* 2008; 371(9606):75-84.
- 13 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;11:317–326.
- 14 DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2012;17:2–11.
- 15 Gdoura R, Kchaou W, Chaari C, et al. Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium infections and semen quality of infertile men. *BMC Infect Dis.* 2007;7:129.
- 16 Yoon BH, Chang JW, Romero R. Isolation of Ureaplasma urealyticum from the amniotic cavity and adverse outcome in preterm labor. *Obstet Gynecol.* 1998;92:77-82.
- 17 Capoccia R, Greub G, Baud D. Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis and adverse pregnancy outcomes. *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26:231–240.
- 18 Marconi C, de AndradeRamos, BR, Peraçoli JC et al. Amniotic fluid interleukin-1 beta and interleukin-6, but not interleukin-8 correlate with microbial invasion of the amniotic cavity in preterm labor. *Am J Reprod Immunol.* 2011 Jun;65(6):549-56.
- 19 Gomez R, Romero R, Nien JK et al. A short cervix in women with preterm labor and intact membranes: A risk factor for microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192: 678–689.
- 20 Kemp MW, Miura Y, Payne MS et al. Repeated maternal intramuscular or intraamniotic erythromycin incompletely resolves intrauterine Ureaplasma parvum infection in a sheep model of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2014; 211: 134. e1–134.e9.
- 21 Kacerovský M, Pavlovský M, Tosner J. Preterm premature rupture of the membranes and genital mycoplasmas. *Acta Medica.* 2009;52:117–120.
- 22 Nguyen DP, Gerber S, Hohlfeld P, Sandrine G, Witkin SS. Mycoplasma hominis in mid-trimester amniotic fluid: relation to pregnancy outcome. *J Perinat Med.* 2005;32:323–326.
- 23 Larsen B, Hwang J. Mycoplasma, Ureaplasma, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2010;2010. pii: 521921.
- 24 Kwak D-W, Hwang H-S, Kwon J-Y, Park Y-W, Kim Y-H. Co-infection with vaginal Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis increases adverse pregnancy

- outcomes in patients with preterm labor or preterm premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013;7058:1–5.
- 25 Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, et al. A novel molecular microbiologic technique for the rapid diagnosis of microbial invasion of the amniotic cavity and intra-amniotic infection in preterm labor with intact membranes. *Am J Reprod Immunol.* 2014;71:330–358.
 - 26 Valkenburg-VanDenBerg AW, Sprij AJ, Dekker FW, Dorr PJ, Kanhai HHH. Association between colonization with Group B Streptococcus and preterm delivery: A systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2009;88(9):958–67.
 - 27 Hill AJ, Sanders A, Baillargeon G, Menon R. Association of group B Streptococcus colonization with early term births. *J. Perinat. Med.* 2015; 43(5): 559–564.
 - 28 Phares CR, Lynfield R, Farley MM, et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999–2005. *J Am Med Assoc.* 2008;299:2056–65.
 - 29 Cahill RJ, Tan S, Dougan G, et al. Universal DNA primers amplify bacterial DNA from human fetal membranes and link *Fusobacterium nucleatum* with prolonged preterm membrane rupture. *Mol Hum Reprod. England;* 2005;11(10):761–6.
 - 30 Han YW, Fardini Y, Chen C, et al. Term Stillbirth Caused by Oral *Fusobacterium nucleatum*. *Obs Gynecol.* 2010;115(2 PT 2):442–5.
 - 31 Aagaard K, Ma J, Antony K, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Sci Transl Med.* 2014;6(237):1–22.
 - 32 Jiménez E, Fernández L, Marín M, et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol.* 2005;51(4):270–4.
 - 33 Hsu C, Meaddough E, Aversa K, et al. Dual roles of amniotic fluid nitric oxide and prostaglandin E2 in preterm labor with intra-amniotic infection. *Am J Perinatol.* 1998;15:683–687.
 - 34 Lo CC, Hsu JJ, Hsieh CC, et al. Risk factors for spontaneous preterm delivery before 34 weeks of gestation among Taiwanese women. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2007; 46:389–394.
 - 35 Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera H, et al. In vitro secretion profiles of interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF alpha after selective infection with *Escherichia coli* in human fetal membranes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2007; 5:46.
 - 36 Fortunato SJ, Menon R, Swan KF, et al. Organ culture of amniochorionic membrane in vitro. *Am J Reprod Immunol.* 1994; 32:184–187.

- 37 Noda-Nicolau NM, Poletini J, Peltier MR, et al. Combinations and loads of bacteria affect the cytokine production by fetal membranes: An in vitro study. *Am J Reprod Immunol*. 2016; 76: 504–511.
- 38 Menon R, Peltier MR, Eckardt J, Fortunato SJ. Diversity in cytokine response to bacteria associated with preterm birth by fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;201:306.e1–306.e6.
- 39 Menon R, Swan KF, Lyden TW, Rote NS, Fortunato SJ. Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1 beta and interleukin-6) in amniochorionic membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;172:493–500.
- 40 Taylor-Robinson D, Purcell RH, Wong DC, Chanock RM. A colour test for the measurement of antibody to certain Mycoplasma species based upon the inhibition of acid production. *J. Hyg*. 1966;64, 91–104.
- 41 DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One*. 2008;3:1–10.
- 42 Mitchel MD, Dudley DJ, Edwin SS, Schiller SL. Interleukin-6 stimulates prostaglandin production by human amnion and decidual cells. *Eur J Pharmacol*. 1991, 192:189-191.
- 43 Mitchell MD, Simpson KL, Keelan JA. Paradoxical proinflammatory actions of interleukin-10 in human amnion: potential role in term and preterm labor. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004, 89:4149-4152.
- 44 Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, et al. Infection and preterm labor. IV. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*. 1989, 161:336?341.
- 45 Zaga-Clavellina V, Martha RVM, Flores-Espinosa P. In vitro secretion profile of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6, and of Human Beta-Defensins (HBD)-1, HBD-2, and HBD-3 from human chorioamniotic membranes after selective stimulation with *Gardnerella vaginalis*. *Am J Reprod Immunol*. 2012;67(II):34–43.
- 46 Menon R, Torloni MR, Voltolini C, et al. Biomarkers of spontaneous preterm birth: an overview of the literature in the last four decades. *Reprod. Sci*. 2011;18: 1046–1070.
- 47 Kim A, Lee ES, Shin JC, Kim HY. Identification of biomarkers for preterm delivery in mid-trimester amniotic fluid. *Placenta*. 2013;34:873–878.
- 48 Noda-Nicolau NM, Poletini J, da Silva MG, Peltier MR, Menon R. Polybacterial stimulation suggests discrete IL-6/IL-6R signaling in human fetal membranes: Potential implications on IL-6 bioactivity. *J Reprod Immunol*. 2018;126:60-68.
- 49 Jung EY, Park KH, Han BR et al. Measurement of interleukin 8 in cervicovaginal fluid in women with preterm premature rupture of membranes: a comparison of amniotic fluid samples. *Reprod Sci*. 2017; 24(1):142-147.

- 50 Rizzo G, Capponi A, Vlachopoulou A, et al. Ultrasonographic assessment of the uterine cervix and interleukin-8 concentrations in cervical secretions predict intrauterine infection in patients with preterm labor and intact membranes. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1998 Aug;12(2):86-92.
- 51 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, 166:1576-1587.
- 52 Hunt JS, Chen HL, Miller L. Tumor necrosis factors: pivotal components of pregnancy? *Biol Reprod.* 1996;54:554-562.
- 53 Oh KJ, Lee KA, Sohn YK, et al. Intraamniotic infection with genital mycoplasmas exhibits a more intense inflammatory response than intraamniotic infection with other microorganisms in patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;203(3): 211.e1–211.e8.
- 54 Tantengco OAG, Yanagihara I. Current understanding and treatment of intra-amniotic infection with *Ureaplasma* spp. *J Obstet Gynaecol Res.* 2019;45(9):1796-1808
- 55 Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, et al. The anti-inflammatory limb of the immune response in preterm labor, intra-amniotic infection/inflammation, and spontaneous parturition at term: a role for interleukin-10. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008;21(8):529-47.
- 56 Seale AC, Bianchi-Jassir F, Russel NJ, et al. Estimates of the burden of group B streptococcal disease worldwide for pregnant women, stillbirths, and children. *Clin Infect Dis* 2017;65(suppl_2):S200–S219.
- 57 de Goffau MC, Lager S, Sovio U, et al. Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens. *Nature.* 2019;572(7769):329-334.
- 58 Patras KA, Nizet V. Group B Streptococcal Maternal Colonization and Neonatal Disease: Molecular Mechanisms and Preventative Approaches. *Front Pediatr.* 2018; 6:27.
- 59 Jones N, Bohnsack JF, Takahashi S, et al. Multilocus sequence typing system for group B Streptococcus. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(6):2530–6.
- 60 Xia FD, Mallet A, Caliot E, Gao C, Trieu-Cuot P, Dramsi S. Capsular polysaccharide of Group B Streptococcus mediates biofilm formation in the presence of human plasma. *Microbes Infect.* 2015; 17(1):71–6.

Table1. Treatments used to stimulated fetal membranes *in vitro*

Ctl-: negative control
Ctl+: positive control – LPS <i>E. coli</i>
Mh: <i>Mycoplasma hominis</i> (10 ⁶ CCU)
Up: <i>Ureaplasma parvum</i> (10 ⁵ CCU)
Sa: <i>Streptococcus agalactiae</i> (10 ⁶ CFU)
Fn: <i>Fusobacterium nucleatum</i> (10 ⁶ CFU)
Mh+Up: <i>M. hominis</i> (10 ⁶ CCU)+ <i>U. parvum</i> (10 ⁵ CCU)
Mh+Up+Sa: <i>M. hominis</i> (10 ⁶ CCU)+ <i>U. parvum</i> (10 ⁵ CCU)+ <i>S. agalactiae</i> (10 ⁶ CFU)
Mh+Up+Fn: <i>M. hominis</i> (10 ⁶ CCU)+ <i>U. parvum</i> (10 ⁵ CCU)+ <i>F. nucleatum</i> (10 ⁶ CFU)

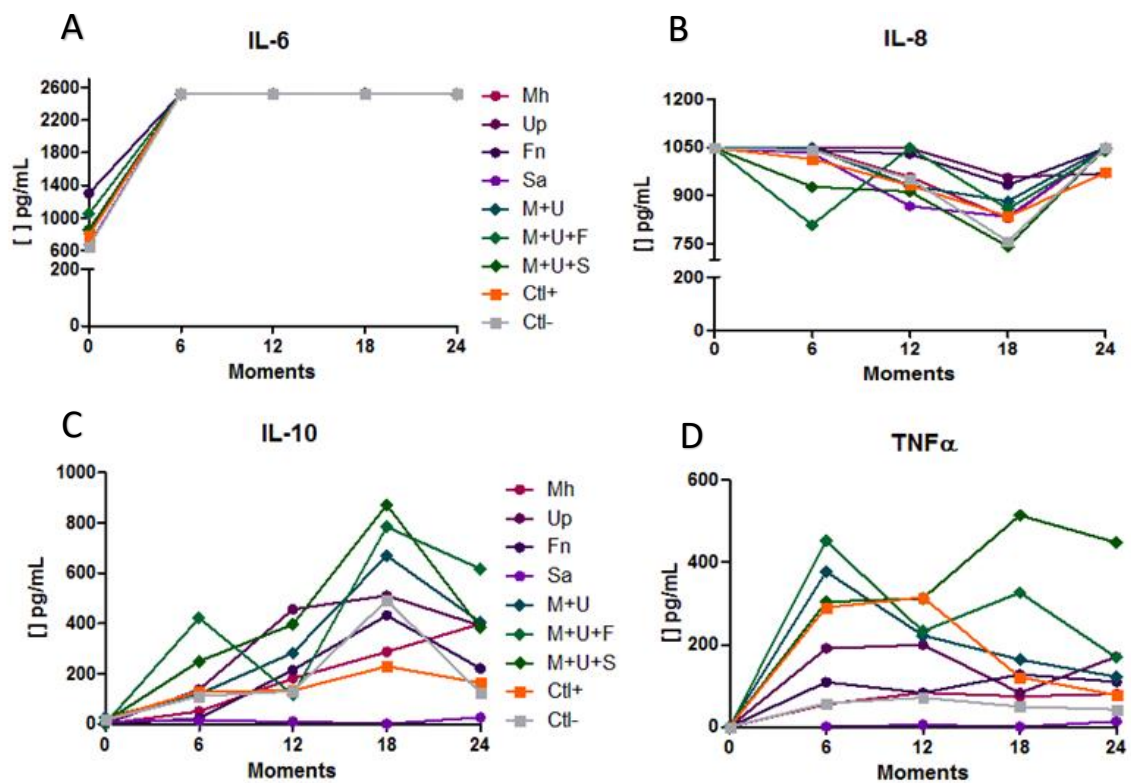


Figure 1. Kinetics of IL-6, IL-8, IL-10, and TNF- α in different groups of stimulation with *Mycoplasma. hominis*, *Ureaplasma. parvum*, *Fusobacterium. nucleatum*, and *Streptococcus. agalactiae*. Kruskal-Wallis test. Values expressed as median. Ctl: control; Mh/M: *Mycoplasma hominis*; Up/U: *Ureaplasma parvum*; Fn/F: *Fusobacterium nucleatum*; Sa/S: *Streptococcus agalactiae*.

Table 2. Proinflammatory cytokines levels (pg/mL) after bacterial species different stimulation in each time point

	Moments					
	Groups	0h	6h	12h	18h	24h
IL-8	Ctl+	1048 (922.70-1311) ^a	1014 (826.80-1048) ^a	932.20 (848-1048) ^a	834.70 (785.90-1048) ^a	971.80 (795.90-1048) ^a
	Mh	1048 (957.20-1048) ^a	1048 (822.60-1142) ^a	958.30 (812.70-1048) ^a	829.10 (724.60-1048) ^a	1048 (722.40-1048) ^a
	Up	1048 (974.90-1048) ^a	1048 (904.40-1048) ^a	1048 (777.40-1048) ^a	956.70 (829.10-1048) ^a	969.40 (888.60-1048) ^a
	Fn	1048 (1048-1783) ^a	1042 (893-1327) ^a	1029 (960.90-1225) ^a	932.60 (509.30-1027) ^a	1048 (1048-1099) ^a
	Sa	1048 (730.50-1048) ^a	1032 (940.20-1048) ^a	867.30 (715.40-1048) ^a	834.40 (404.60-1048) ^a	1048 (1016-1048) ^a
	Mh+Up	1048 (960.70-1048) ^a	1048 (782.60-1048) ^a	931.30 (736.60-1003) ^a	882.20 (739.10-1048) ^a	1048 (841.30-1048) ^a
	Mh+Up+Fn	1048 (1048-1836) ^a	809.2 (804.50-973.4) ^b	1048 (926.80-1138) ^{ab}	858.90 (549.80-1013) ^{ab}	1039 (892.10-1048) ^{ab}
	Mh+Up+Sa	1048 (982.20-1048) ^a	927.5 (809.60-945.8) ^a	912.10 (740.80-1048) ^a	741.70 (459.80-876.20) ^a	1048 (866.90-1048) ^a
	Ctl -	1048 (905.70-1048) ^a	1041 (775.70-1105) ^a	952.70 (699.10-1080) ^a	757.10 (212.70-884.20) ^a	1048 (757.80-1048) ^a
	Moments					
	Groups	0h	6h	12h	18h	24h
IL-6	Ctl+	787(608.50-1628) ^a	2520(2205-2520) ^b	2520(2205-2520) ^{bc}	2520(2520-2520) ^{bcd}	2520(2507-2520) ^{abcd}
	Mh	807(484.90-1644) ^a	2520(1260-2520) ^{abc}	2520(2520-2520) ^b	2520(1890-2520) ^{abc}	2520(2520-2520) ^{bc}
	Up	857.20(302.60-1446) ^a	2520(2520-2520) ^b	2520(2505-2520) ^{bc}	2520(2505-2520) ^{bcd}	2520(2183-2520) ^{bcd}
	Fn	1302(558-2301) ^a	2520(1575-2520) ^a	2520(1575-2520) ^a	2520(1575-2520) ^a	2520(1548-2520) ^a
	Sa	666.30(191.50-974.30) ^a	2520(1170-2520) ^a	2520(630-2520) ^a	2520(2520-2520) ^a	2520(2143-2520) ^a
	Mh+Up	844.10(386.60-1301) ^a	2520(1260-2520) ^a	2520(2205-2520) ^a	2520(2520-2520) ^a	2520(1683-2520) ^a
	Mh+Up+Fn	1050(419.10-1994) ^a	2520(1575-2520) ^a	2520(630-2520) ^a	2520(1575-2520) ^a	2520(872.90-2520) ^a
	Mh+Up+Sa	851.10(771-896.80) ^a	2520(2520-2520) ^b	2520(2520-2520) ^{bc}	2520(2520-2520) ^{bcd}	2520(2520-2520) ^{abcd}
	Ctl -	646.40(457.40 -1372) ^a	2520(1255-2520) ^{ab}	2520(2047-2520) ^{ab}	2520(1261-2520) ^{ab}	2520(2520-2520) ^b
	Moments					
	Groups	0h	6h	12h	18h	24h
TNF-α	Ctl+	0 (0-39.67) ^a	290.60 (140-770.30) ^b	315.20 (190.80-742.70) ^{bc}	120.50 (87.17-499.30) ^{abc}	77.66 (40.70-4888) ^{abc}
	Mh	0 (0-0) ^a	55.10 (35-1510) ^b	83.17 (28.92-1010) ^{bc}	74.13 (38.87-753.30) ^{abc}	80.27 (20.09-813.10) ^{abc}
	Up	0 (0-0) ^a	190.60 (76.51-611.90) ^b	199.60 (93.22-426) ^{bc}	82.57 (65.20-392.90) ^{bcd}	170.80 (80.31-201.40) ^{abcd}
	Fn	0 (0-0) ^a	108.90 (60.38-142.10) ^a	82.52 (17.77-126.70) ^a	127.60 (27.87-285.70) ^a	109.60 (19.95-310.20) ^a
	Sa	0 (0-7.07) ^a	0 (0-15.19) ^a	5.21 (0-15.93) ^a	0 (0-19.02) ^a	13.09 (0-22.17) ^a
	Mh+Up	0 (0-8.27) ^a	377.50 (114.60-477.20) ^b	222.50 (97.38-433) ^{bc}	163.70 (51.28-371.20) ^{abc}	121.70 (32.95-203.60) ^{abc}
	Mh+Up+Fn	0 (0-0) ^a	452.90 (125.10-1212) ^a	232.90 (68.22-635.60) ^a	326.50 (41.39-697.20) ^a	168.50 (16.69-619.60) ^a
	Mh+Up+Sa	0 (0-0) ^a	304.40 (110.50-1517) ^a	312.60 (54.38-1096) ^a	514.60 (83.47-1264) ^a	448.40 (37.65-495.20) ^a

Ctl -	0 (0-16.58) ^a	57.54 (36.87-148.60) ^{ab}	71.17 (44.27-82.37) ^b	49.39 (29.64-209.7) ^{ab}	42.49 (4.35-46.51) ^{ab}
--------------	--------------------------	------------------------------------	----------------------------------	-----------------------------------	----------------------------------

Values followed by the same letter do not differ; Kruskal-Wallis test. Values in pg/mL expressed as median(P25-P75).

Ctl: control; Mh: *Mycoplasma hominis*; Up: *Ureaplasma parvum*; Fn: *Fusobacterium nucleatum*; Sa: *Streptococcus agalactiae*.

Table 3. Interleukin 10 levels (pg/mL) after bacterial species different stimulation in each time point.

	Groups	Moments				
		0h	6h	12h	18h	24h
IL-10	Ctl+	18.25 (0-21.59) ^a	130.20 (26.65-224.90) ^{ab}	132.60 (35.71-438.40) ^{ab}	229.70 (46.87-580.50) ^b	163.60 (38.17-292.60) ^{ab}
	Mh	0 (0-24.44) ^a	50.49(0-69.55) ^{abc}	181.40(55.32-453.50) ^{abc}	287.10 (116.60-622.80) ^b	398.60 (127.10-423.20) ^{bc}
	Up	0 (0-21.85) ^a	137.30 (0-235.80) ^{ab}	456.50 (121.20-680.90) ^{ab}	511.40 (43.67-668.60) ^b	391.40 (56.27-986.30) ^{ab}
	Fn	0 (0-25.79) ^a	22.03 (0-164.20) ^a	214.90 (9.55-562.70) ^a	432.10 (148.20-610.90) ^a	220.90 (44.52-887.30) ^a
	Sa	10.01 (0-24.70) ^a	12.90 (0-114.20) ^a	9.88 (0-82.81) ^a	0 (0-17.09) ^a	26.26 (0-56.49) ^a
	Mh+Up	25.48 (0-27.31) ^a	119.30 (25.61-464.80) ^{abc}	282.60 (127.10-720.40) ^{abc}	669.50 (56.67-924.60) ^b	405.80 (288.80-823.30) ^{bc}
	Mh+Up+Fn	2.38 (0-41.57) ^a	422.20 (82.93-530.80) ^a	116.40 (0-572.80) ^a	784.90 (166.90-1461.00) ^a	618.00 (108.50-1104.00) ^a
	Mh+Up+Sa	9.88 (0-16.20) ^a	249.40 (56.64-543.80) ^a	396.40 (185.90-493.70) ^a	872.00 (146.90-1275.00) ^a	382.90 (143.60-1408.00) ^a
	Ctl -	15.95 (0-110.00) ^a	111.40 (22.24-414.40) ^a	130.30 (0-311.80) ^a	493.20 (71.64-814.30) ^a	124.20 (10.38-903.60) ^a

Values followed by the same letter do not differ; Kruskal-Wallis test. Values in pg/mL expressed as median (P25-P75).

Ctl: control; Mh: *Mycoplasma hominis*; Up: *Ureaplasma parvum*; Fn: *Fusobacterium nucleatum*; Sa: *Streptococcus agalactiae*.

IL6

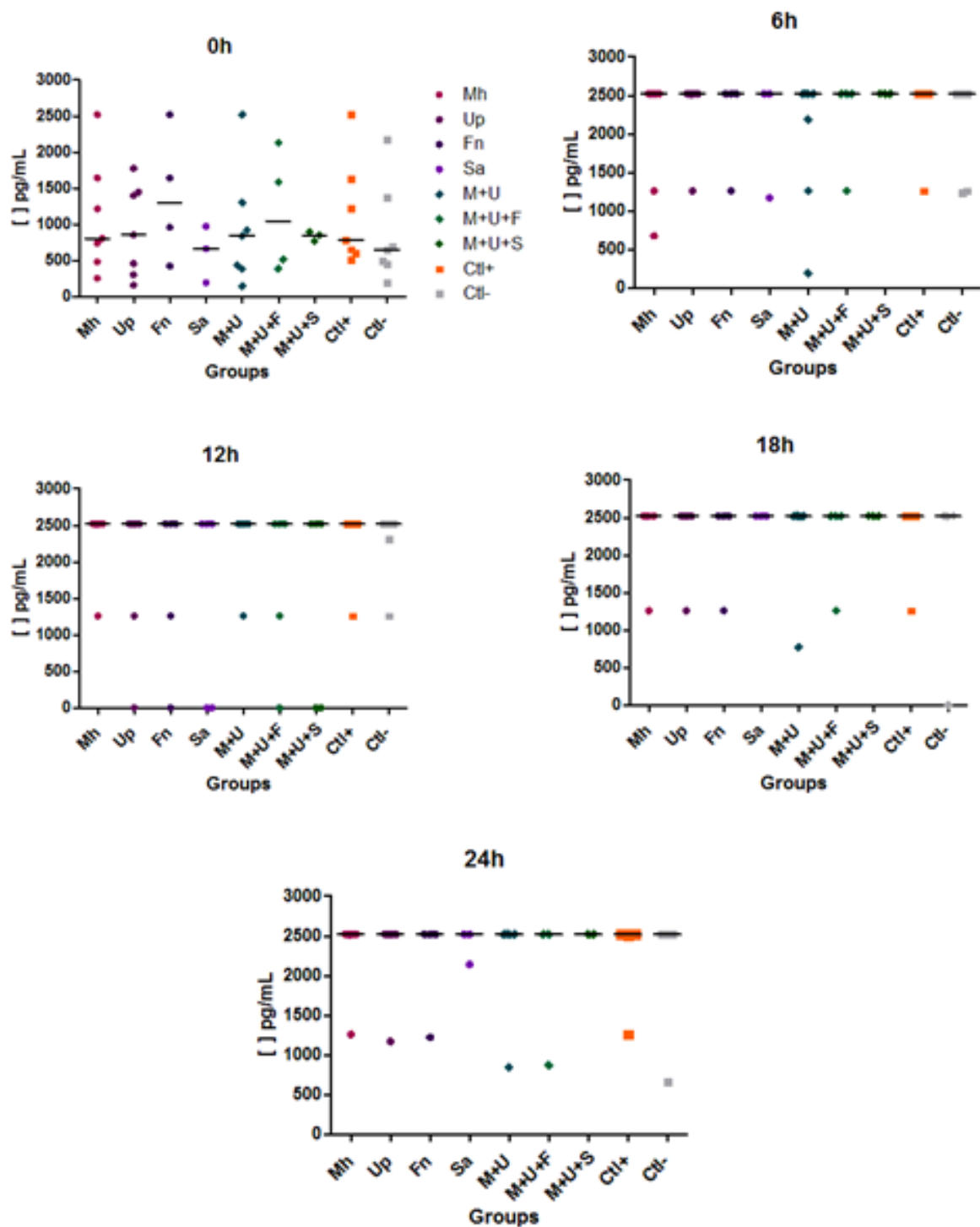


Figure 2. Concentration of Interleukin 6 (IL-6)- of all groups in each stimulation time points. Kruskal Wallis test. Values expressed as median (P25-P75) $p > 0.05$. Ctl: control; Mh/M: *Mycoplasma hominis*; Up/U: *Ureaplasma parvum*; Fn/F: *Fusobacterium nucleatum*; Sa/S: *Streptococcus agalactiae*.

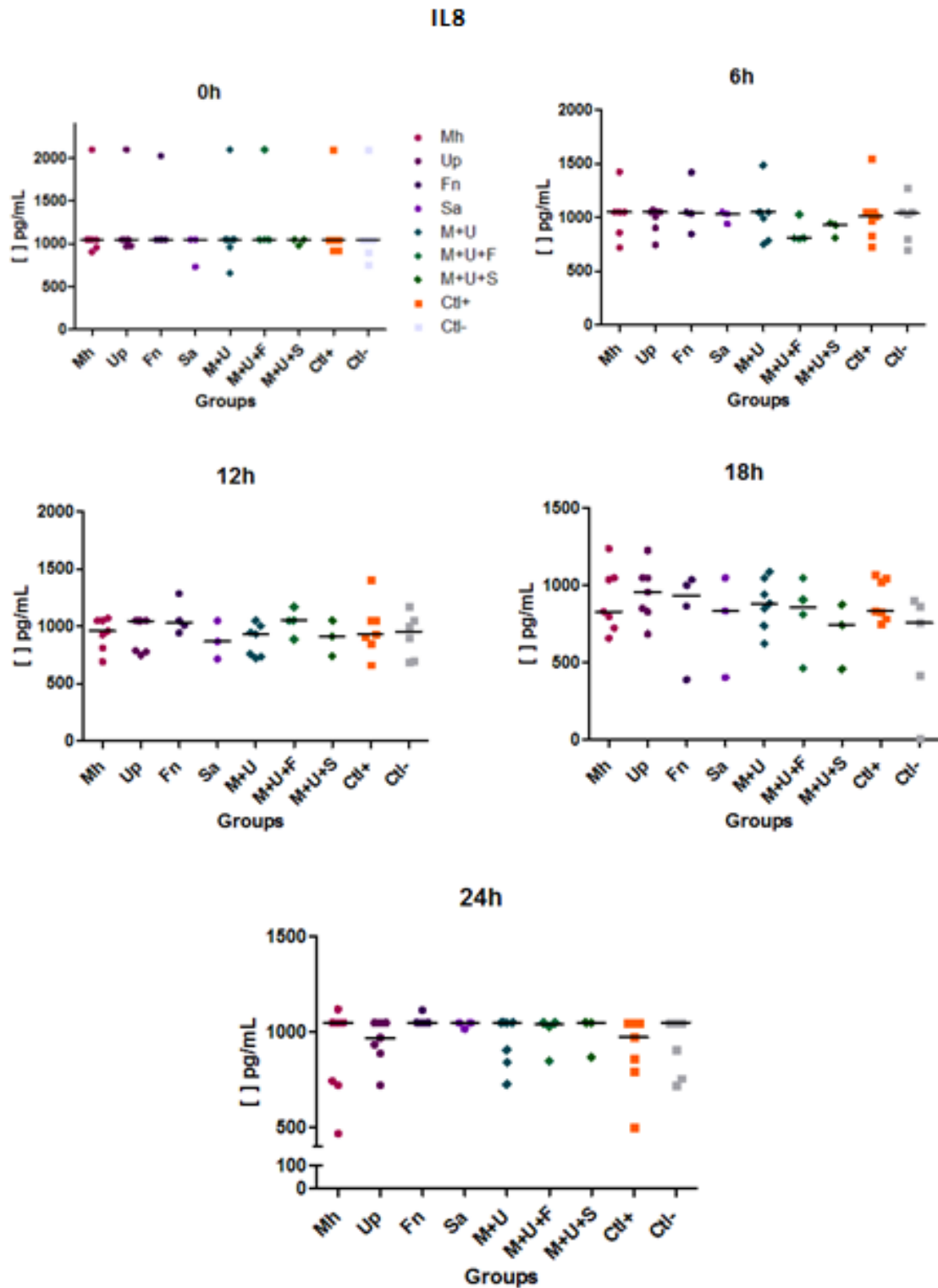


Figure 3. Concentration of Interleukin 8 (IL-8)- of all groups in each stimulation time points. Kruskal-Wallis test. Values expressed as median (P25-P75) $p > 0.05$. Ctl: control; Mh/M: *Mycoplasma hominis*; Up/U: *Ureaplasma parvum*; Fn/F: *Fusobacterium nucleatum*; Sa/S: *Streptococcus agalactiae*.

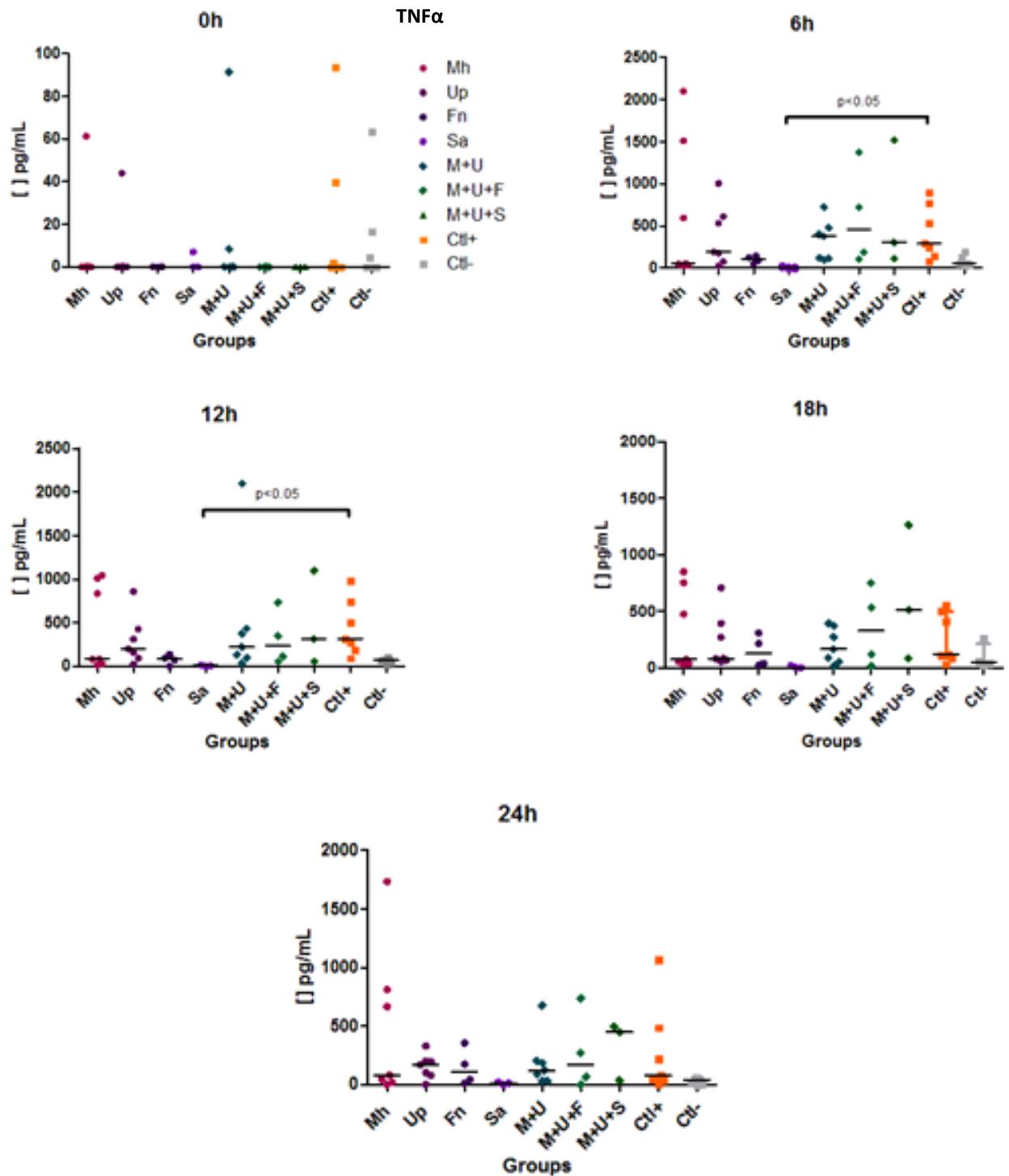


Figure 4. Concentration of Tumor Necrosis Factor α -(TNF- α)- of all groups in each stimulation time points. Kruskal-Wallis test. Values expressed as median (P25-P75) $p > 0.05$. Ctl: control; Mh/M: *Mycoplasma hominis*; Up/U: *Ureaplasma parvum*; Fn/F: *Fusobacterium nucleatum*; Sa/S: *Streptococcus agalactiae*.

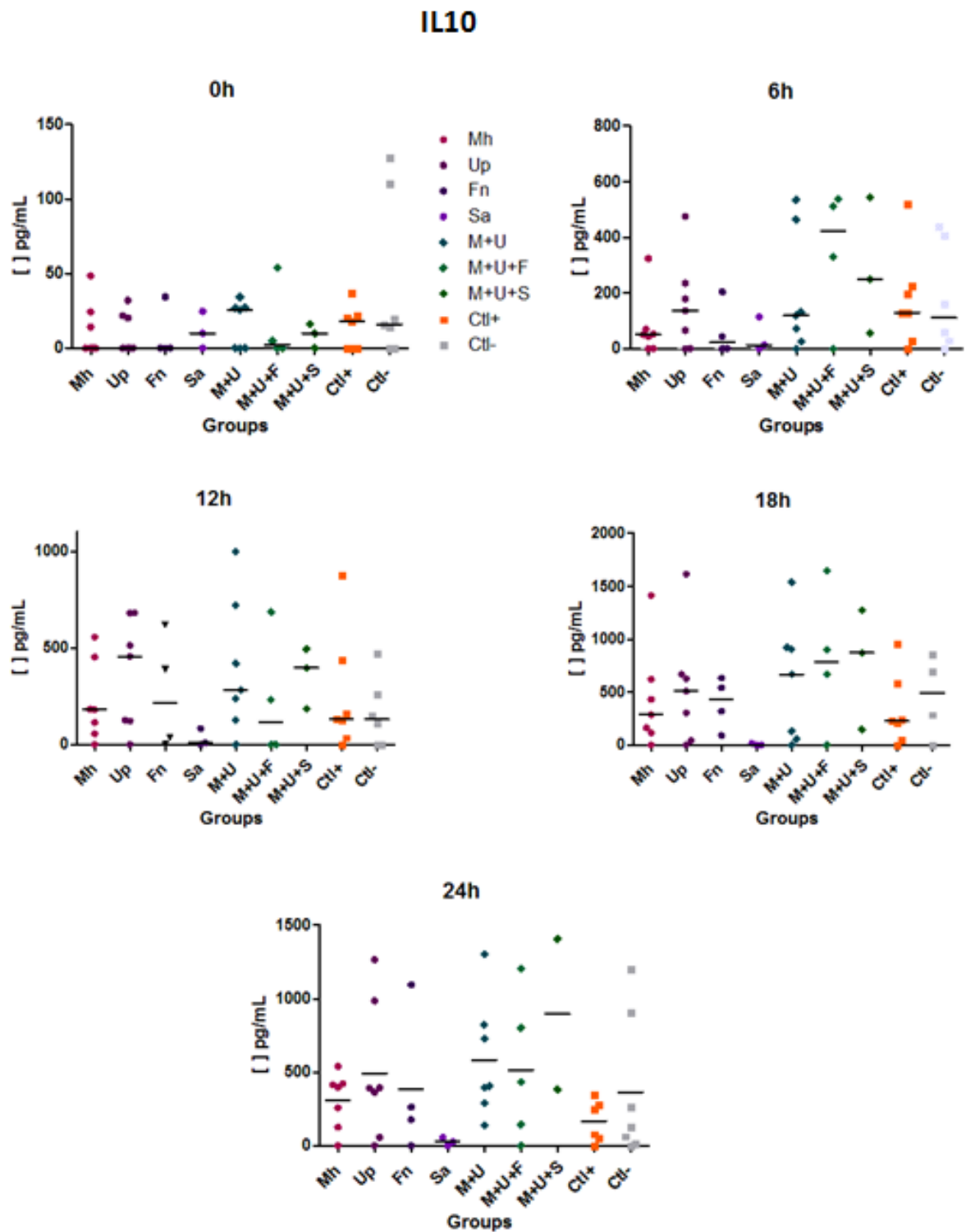
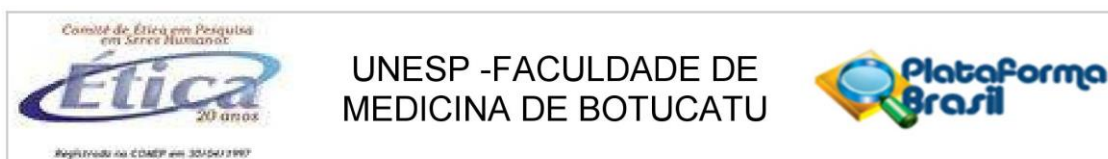


Figure 5. Concentration of Interleukin 10 (IL-10)- of all groups in each stimulation time points. Kruskal-Wallis test. Values expressed as median (P25-P75) $p > 0.05$. Ctl: control; Mh/M: *Mycoplasma hominis*; Up/U: *Ureaplasma parvum*; Fn/F: *Fusobacterium nucleatum*; Sa/S: *Streptococcus agalactiae*.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo in vitro de infecção polibacteriana das membranas corioamnióticas: modulação da resposta imune na interface materno-fetal

Pesquisador: GIOVANA FERNANDA COSI BENTO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 96278418.9.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
Capes Coordenação Aperf Pessoal Nivel Superior

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.900.344

Apresentação do Projeto:

Trata-se de pesquisa com finalidade acadêmica (pós-graduação) a ser conduzida por Giovana Fernanda Cosi Bento orientado pela Profa. Márcia Guimarães da Silva financiado pelo Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação e CAPES.

O estudo está baseado no fato de que infecções bacterianas em membranas corioamnióticas de gestantes podem constituir fator de risco para partos pré-termo. A maioria dos estudos associa a presença de *Mycoplasma* a estas infecções, no entanto ainda existem controvérsias na literatura. Assim, este estudo buscará avaliar mediadores inflamatórios na coinfeção por *Mycoplasmas* genitais na presença de *Prevotella bivia* em membranas corioamnióticas in vitro.

Para a realização do estudo serão coletadas 20 membranas corioamnióticas de gestantes que tiveram a gestação resolvida por cesárea eletiva de termo (37 semanas de gestação), na ausência de trabalho de parto e/ou rotura prematura de membranas. As culturas de membranas corioamnióticas serão estimuladas por suspensão bacteriana de *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* e *P. bivia* isolados ou em combinação. Serão realizados controle negativo e positivo, este último utilizando LPS de *E. coli*. Serão avaliados os mediadores inflamatórios (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF-, GM-CSF, sIL-6R, sgp130, sTNF-R1, sTNF-R2, PTX3, HBD-1, HBD-2 e HBD-3) a partir dos sobrenadante das culturas nos intervalos de tempo 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas e 30 horas pela tecnologia Luminex xMAP.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

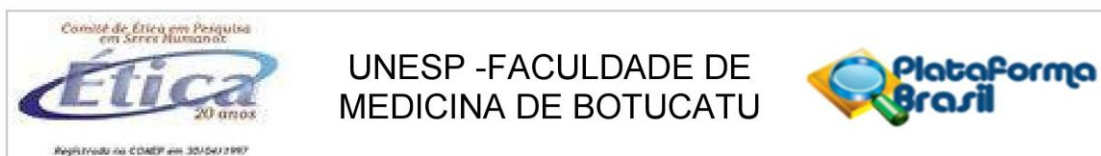
UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

CEP: 18.618-970

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.900.344

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do estudo é avaliar a produção de mediadores inflamatórios em modelos in vitro de coinfeção das membranas corioamnióticas com *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* e *Prevotella bivia*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisadora relata que não existe risco porque afirma que: "O material empregado no estudo é decorrente da dequitação da placenta após o parto e, portanto, a aquisição das amostras não oferece nenhum risco à paciente, pois é parte inerente do processo"

O benefício poderá trazer informações importantes no entendimento da resposta imune no ambiente intrauterino para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no desencadeamento do trabalho de parto e do parto pré-termo, especialmente nas vias associadas à infecção que culminam em desfechos gestacionais desfavoráveis.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários adicionais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Segundo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde foram apresentados os documentos obrigatórios conforme segue: folha de rosto adequadamente preenchida e assinada pelo diretor da instituição proponente; anuência do EAP do HCFMB, anuência do Hospital das Clínicas devidamente assinado pelo superintendente do HC, termo de ciência do Serviço de Obstetria do HC, termo de anuência da Unipex.

A pesquisadora incluiu o documento relativo ao Biorrepositório conforme solicitado por este CEP.

Conforme solicitado foi apresentado TCLE adequado a pesquisa em linguagem acessível com garantia de sigilo.

Recomendações:

Recomenda-se envio de relatório final tão logo o projeto seja concluído.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise, o Colegiado deliberou APROVAÇÃO do projeto de pesquisa apresentado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em reunião extraordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 18 de setembro de 2018, o projeto encontra-se APROVADO, sem (com) necessidade de envio à CONEP.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

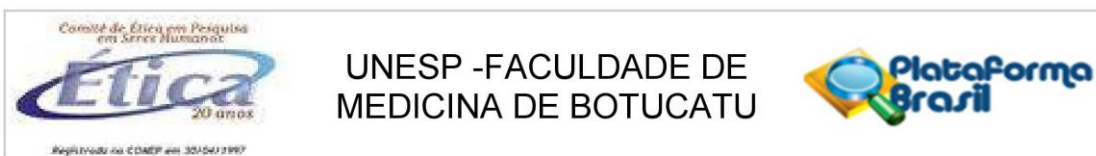
UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

CEP: 18.618-970

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.900.344

No entanto, informamos que ao final da execução da pesquisa, seja enviado o "Relatório Final de Atividades", na forma de "Notificação", via sistema Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1107463.pdf	06/09/2018 21:09:27		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorepositoriogiovanabento.pdf	06/09/2018 21:08:05	GIOVANA FERNANDA COSI BENTO	Aceito
Outros	oficiopendenciagiovanabento.pdf	06/09/2018 21:04:15	GIOVANA FERNANDA COSI BENTO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostogiovanabento.pdf	06/09/2018 20:58:36	GIOVANA FERNANDA COSI BENTO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetomestradiogiovanabento.pdf	06/09/2018 20:57:03	GIOVANA FERNANDA COSI BENTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclegiovana.pdf	06/09/2018 20:55:42	GIOVANA FERNANDA COSI BENTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	termodeanuenciainstitucional.pdf	24/07/2018 17:46:23	GIOVANA FERNANDA COSI BENTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuenciahcfmb.pdf	24/07/2018 17:43:27	GIOVANA FERNANDA COSI BENTO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	termodecienciagiovana.pdf	24/07/2018 17:42:02	GIOVANA FERNANDA COSI BENTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AceiteUnipex.pdf	24/07/2018 17:41:04	GIOVANA FERNANDA COSI BENTO	Aceito

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

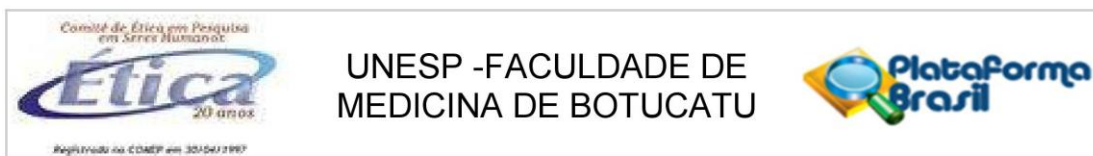
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.900.344

Cronograma	cronogramagiovanabento.pdf	24/07/2018 17:35:59	GIOVANA FERNANDA COSI BENTO	Aceito
Orçamento	orcamentoGiovanaBento.pdf	24/07/2018 16:59:52	GIOVANA FERNANDA COSI BENTO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 18 de Setembro de 2018

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br