

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Faculdade de Medicina de Botucatu

Contribuição ao entendimento dos mecanismos de rotura prematura de membranas pré-termo

Ana Carolina Pereira Martins

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

Botucatu

2013

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Faculdade de Medicina de Botucatu

Contribuição ao entendimento dos mecanismos de rotura prematura de membranas pré-termo

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

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

Botucatu

2013

Dedicatória

*A Deus, nosso criador
Agradeço o dom precioso da vida.
Não sei o que me reservas, pois só tive graças até hoje.
Em Ti confio e rogo que continues a me abençoar.*

*Aos meus pais Francisco e Rose
Por todo amor carinho e dedicação. Por não medir esforços para me ver
feliz.
Se cheguei até aqui é porque estive de mãos dadas com vocês. Eu amo
vocês!*

*Ao meu marido, Marco André
pelo amor, pela renúncia, pelo carinho e cumplicidade.
Quantos momentos importantes das nossas vidas postos de lado.
Quantas dificuldades, quantos obstáculos.
Aprendemos nesse tempo o quão é importante
o exercício diário de amar um ao outro.
Marco, minha metade, a você, o meu eterno amor.*

*Aos meus filhos, Anna Beatriz, Eduardo e Davi
Minha maior alegria é chegar em casa e ser recebida por vocês,
É acordar a cada manhã com vocês ao meu lado...
É ouvir seus sorrisos e embalar seus sonhos...
Olhar em seus olhos e enxergar o mais sincero amor...
Se tivesse que viver tudo novamente para tê-los ao meu lado, eu viveria.
Vocês são a razão da minha vida. Amo vocês!*

Agradecimentos

Agradecimentos especiais

Agradeço imensamente a minha orientadora Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva que, pela sua competência, conhecimento, disponibilidade e dedicação à pesquisa, possibilitou a realização desse projeto. Seu acolhimento, equilíbrio, amizade ao longo de todos estes anos foram fundamentais em todos os momentos. Obrigado por ter acreditado em mim e por esta oportunidade acadêmica.

As grandes amigas Laura e Natália,

durante nossa vida nós encontramos várias pessoas. No entanto, existem pessoas com as quais nós nos identificamos ao conhecê-las e que com elas nos sentimos seguros, seja apenas em um momento de silêncio, num abraço ou até mesmo em uma conversa boba. Essas pessoas nos trazem uma paz interna e passamos então há todos os dias querer conhecer cada vez mais o outro, pois a cada dia se revela algo novo e surpreendente que nos faz criar um sentimento intenso de amor e carinho. São essas pessoas que queremos ver todos os dias, são com elas que queremos viver os momentos mais impressionantes que temos e lamentamos quando elas não estão presentes onde mais gostaríamos que elas estivessem. Obrigado pelo carinho, pelo ombro amigo, pelos almoços e cafés, por dividirem os momentos de alegria, tristeza e angústia, por estarem ao meu lado nos momentos em que mais precisei, e acima de tudo por nossa amizade estar além dessas paredes. Vocês fazem parte da minha vida. Eu amo vocês!

Agradecimentos

A todos os meus colegas do laboratório de Imunopatologia da relação materno-fetal, Aline Bolpetti, Carolina Tafner, Eliane Vieira, Heloise Ranucci, Mariana Morena pela amizade e por todos esses anos de convivência. De uma forma especial ao Gabriel Pinto e Bruna Ramos pela ajuda e companherismo.

A nossa querida vizinha Amanda Della Coleta, por tudo, especialmente pela batalha no western blot, muito obrigado pelos géis feitos, membranas incubadas e especialmente pela companhia. Aos funcionários do Departamento em Patologia, pela disponibilidade em todos os momentos.

À secretária do Programa de pós-graduação em Patologia, Vânia Soler, pela eficiência, orientações e disponibilidade.

Ao departamento de Ginecologia e obstetrícia..

A Capes e à Fapesp, pelo apoio financeiro concedido.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

A todas as gestantes que participaram desta pesquisa, pela simpatia e confiança, cedendo momentos íntimos, preciosos e algumas vezes difíceis de suas vidas. A elas, meu sincero agradecimento.

Cada um sabe a dor e a delícia de ser aquilo que é.
Caetano Veloso

Sumário

Capítulo I

Revisão da Literatura.....	1
-----------------------------------	----------

Capítulo II

Artigo Científico I. “Expressão gênica e proteica de metaloproteinases (MMP-2 and MMP-9) e de seus inibidores (TIMP-1 and TIMP-2) e atividade proteolítica de MMP-2 e MMP-9 em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo”	48
--	----

Capítulo III

Artigo Científico II. Determinação do índice apoptótico membranas corioamnióticas de gestações complicadas por Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo.....	71
---	----

Anexos.....	88
--------------------	-----------

Capítulo I

Revisão da literatura

1. Introdução

Os mecanismos que controlam a duração da gestação na espécie humana e o início do trabalho de parto, têm sido objeto de diversos estudos. Durante a gestação o útero passa por importantes mudanças bioquímicas e fisiológicas ao se expandir para acomodar o feto em crescimento e permanecendo quiescente. Ao mesmo tempo, o colo do útero permanece rígido e fechado, para reter o feto em desenvolvimento no interior do útero. Durante a gestação, fatores favoráveis a manutenção da gestação, assim como a progesterona e prostaciclina são produzidos com a finalidade de inibir a contratilidade miometrial. O processo de parto envolve uma sincronização da atividade miometrial que se manifesta como contrações uterinas dolorosas, rotura das membranas fetais e mudanças na estrutura da cérvix, levando a dilatação e ao apagamento cervical. No final da gestação, fatores favoráveis ao parto são secretados para mediar o remodelamento do colo uterino, e o útero é estimulado a iniciar as contrações coordenadas¹. Tem sido sugerido, que o trabalho de parto é resultado da ativação de *cassette of contraction-associated proteins* (CAPs), que convertem o miométrio de um estado quiescente para um estado contrátil. As CAPs incluem proteínas da junção celular, ocitocina e receptores prostanoídes, enzimas para síntese de prostaglandinas e proteínas de sinalização celular. É provável que as CAPs possam também ativar a secreção de prostaglandina e citocinas pelas membranas fetais, bem como a remodelação e maturação cervical². Portanto, esses processos distintos e interdependentes que envolvem uma variedade de eventos anatômicos, fisiológicos, bioquímicos, imunológicos, endócrinos e neural³ que determinam o momento em que a gestação chega ao desfecho: o remodelamento cervical, a contratilidade uterina e o enfraquecimento e rotura das membranas fetais, que juntos permitem a expulsão do feto após a 37ª semana de gestação^{4,5}.

As membranas fetais envolvem o feto durante a gestação e formam uma estrutura de extrema importância para o desenvolvimento fetal, isolando e protegendo contra o estresse mecânico ao longo da gestação, manutenção do líquido amniótico e de proteção dos vasos do cordão umbilical contra compressão. Além de atuarem como barreira física separando o feto e

o líquido amniótico estéreis do ambiente externo protegendo contra infecções oriundas do trato genital inferior. As membranas corioamnióticas devem permanecer intactas durante toda a gestação e rompida, seja naturalmente ou artificialmente, somente no momento do parto⁶.

2. Estrutura das membranas fetais

A placenta é um órgão transitório de origem materno-fetal constituído de uma porção fetal originada a partir do saco coriônico e uma porção materna derivada do endométrio. O componente fetal é representado pelo córion viloso e o componente materno é formado pela decídua basal. A decídua, que corresponde ao endométrio gravídico, fornece um ambiente imunológico protetor para o desenvolvimento do embrião com a produção de substâncias imunossupressoras pelas células deciduais, para inibir a ativação das células T no estroma do endométrio, e a infiltração de leucócitos no estroma endometrial que secreta Interleucina-2 para prevenir a rejeição do embrião pelo tecido materno². É composta de uma justaposição de três camadas distintas de acordo com sua relação com o local de implantação: decídua basal, correspondente à zona de implantação, ricamente vascularizada a qual constitui a parte mais distante do feto; decídua capsular ou reflexa, que corresponde à porção superficial que recobre o embrião em desenvolvimento e o saco coriônico e a decídua parietal, que representa o restante da decídua que corresponde à camada não ocupada pelo embrião⁷⁻⁹.

Devido à expansão do saco coriônico durante o desenvolvimento embrionário ocorre a compressão das vilosidades coriônicas aproximando a decídua capsular da parietal. Essa redução no suprimento sanguíneo das vilosidades coriônicas leva à rápida degeneração das mesmas, formando uma região relativamente avascular denominada de córion liso. Posteriormente a formação do córion liso, as vilosidades associadas à

decídua basal tornam-se numerosas e ramificadas, constituindo o córion viloso, também conhecido como córion placentário ou frondoso⁸.

O saco amniótico cresce mais rapidamente que o coriônico⁸ e consequentemente, por volta da 16ª de gestação o âmnio e o córion liso se fundem, originando as membranas corioamnióticas, desaparecendo a cavidade coriônica¹⁰. As membranas corioamnióticas fundem-se à decídua capsular e após o desaparecimento da porção capsular da decídua, elas aderem à decídua parietal⁸.

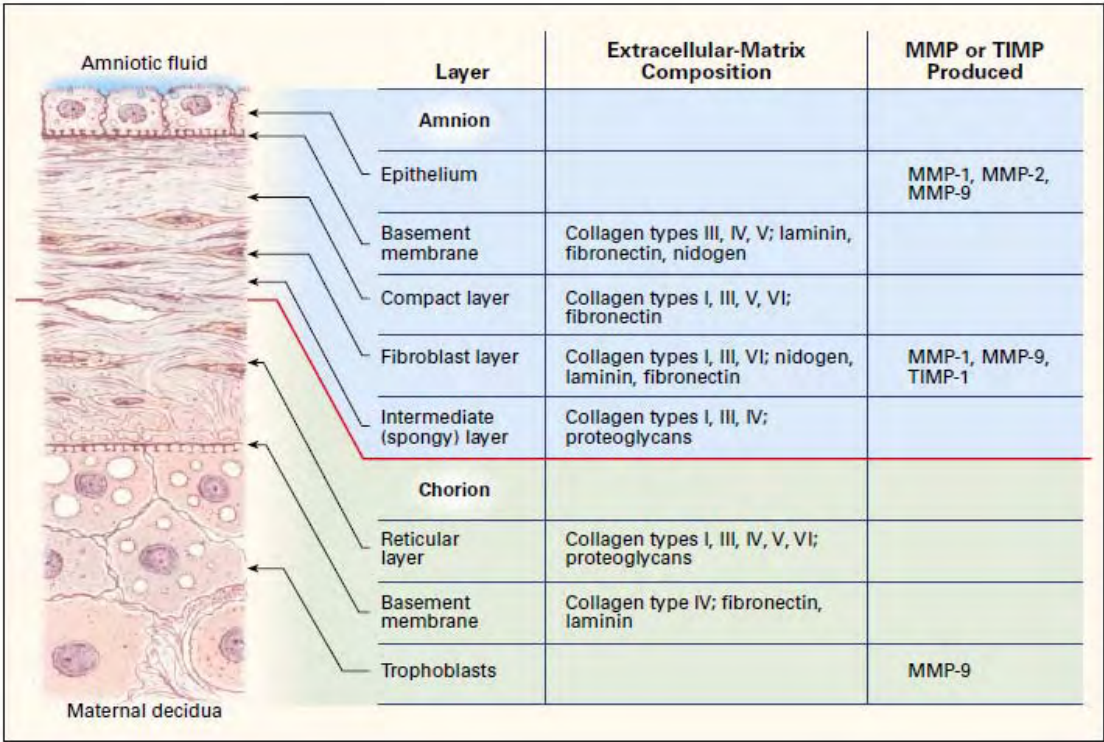


Figura 1. Representação esquemática da estrutura das membranas fetal, evidenciando as camadas que compõe o âmnio e cório, seus principais tipos de colágeno e produção local de metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores (TIMPs). (Fonte: Parry & Strauss, 1998).

As membranas que revestem a cavidade amniótica são compostas pelo âmnio e cório, os quais são conectados pela matriz extracelular (MEC)^{7,11}. A MEC, complexo de proteínas e glicoproteínas que envolvem as células dos mais diversos tecidos, composta principalmente por colágenos, disposta em complexa rede. É responsável pela resistência mecânica do tecido. Os colágenos compõem uma grande família de proteínas tripla hélice que interagem com outros componentes da matriz extracelular. Os

colágenos dos tipos I, III, IV, V e VI são os principais constituintes da MEC, juntamente com as fibronectinas, elastina, lamininas e proteoglicanas, nas quais as fibras de proteínas estão inseridas⁸. Os diversos tipos de colágenos da MEC são submetidos à rotatividade constante durante toda gestação com a finalidade de acomodar o volume e a tensão crescente do feto com o progresso gestacional⁹.

O epitélio amniótico é formado por monocamada de células epiteliais colunares¹² a camada mais superficial das membranas e em contato direto com o líquido amniótico⁹ e repousam sobre a decídua reflexa, constituindo o cório leve e, acima dos cotilédones, originando a membrana corial. O âmnio, que se localiza internamente e em contato com o feto, apresenta-se liso, translúcido e delgado, enquanto o córion é mais externo, está em proximidade com a cavidade uterina e apresenta-se irregular e opaco, sendo mais espesso na membrana corial e mais delgado no córion leve. Consiste em diversos tipos de células, incluindo epiteliais, mesenquimais e trofoblásticas embebidas em matriz colagenosa, que têm a função de reter o líquido amniótico, secretar substâncias nele em direção ao útero e proteger o feto contra infecções ascendentes⁹. Embora o âmnio seja mais delgado que o cório, com cerca de 50 µm de espessura possui maior elasticidade e resistência, devido à maior concentração de colágeno. O cório apresenta cerca de 200 µm de espessura, possui menor quantidade de colágeno, apresentando tecido conjuntivo menos organizado¹⁰.

O âmnio é formado por cinco camadas distintas, não possuem nervos e são avasculares, e seus nutrientes são supridos pelo líquido amniótico. O epitélio amniótico é a camada mais interna, próxima ao feto, secreta colágeno tipo III e IV e glicoproteínas não-colágenas (laminina, nidogina e fibronectina) que compõem a membrana basal, a próxima camada do âmnio. O principal esqueleto fibroso do âmnio adjacente à membrana basal, composto por uma camada compacta de tecido conjuntivo. Os

colágenos que compõem essa camada são intersticiais tipos I e III e filamentosos tipo V e VI. Os colágenos I e III desempenham um papel crítico na manutenção da integridade das membranas fetais e são os principais reguladores de sua resistência tênsil. A fonte celular na produção de colágeno na camada compacta do âmnio é incerto. Segundo Casey e MacDonald¹³, células mesenquimais expressaram níveis significativamente elevados de colágenos I e III quando comparado com células epiteliais. Em contrapartida, em outro estudo usando cultura de membranas corioamnióticas a produção de colágenos intersticiais foi verificada por ambas as células epiteliais e mesenquimais. A contribuição das células epiteliais para a síntese de colágeno é provavelmente dependente da idade gestacional, assim como a densidade das células mesenquimais no âmnio diminui durante o terceiro trimestre. Portanto, ambas as células epiteliais e mesenquimais parecem contribuir para o *pool* de colágenos intersticiais na camada compacta. O colágeno IV é uma proteína que compõem a membrana basal, é secretada pelas células epiteliais do âmnio e células na membrana pseudo-basal do cório¹³. Este colágeno fornece um suporte sobre o qual outros componentes da membrana basal, tais como a laminina, proteoglicanas e sulfato de heparina possam se anexar¹⁴. O colágeno IV é produzido pelas células epiteliais do âmnio e estabiliza as membranas fetais através da criação de fibrilas de ancoragem que ligam a lâmina basal do âmnio com os outros componentes da matriz extracelular^{15,16}. Já os outros colágenos da camada compacta, como os tipos V e VI, desempenham um menor papel na manutenção da resistência das membranas fetais^{17,18}. Devido à ausência de substância amorfa entre as fibrilas de colágeno no tecido conjuntivo amniótico a termo, o âmnio mantém toda a sua capacidade de estiramento durante o final da gestação normal. Dentre as camadas amnióticas, a camada fibroblástica é a mais espessa e consiste em células mesenquimais e macrófagos dentro da matriz extracelular (MEC). A camada

intermediária, também conhecida como zona esponjosa é rica em colágeno tipo III e se situa entre o âmnio e o cório. Sua aparência esponjosa nas preparações histológicas é devido ao seu abundante conteúdo de proteoglicanos hidratados e glicoproteínas. A zona esponjosa absorve o estresse físico, permitindo que o âmnio deslize sob o cório subjacente, que está firmemente aderido à decídua⁹.

O cório é formado por três camadas: uma reticular, estruturalmente semelhante ao mesênquima amniótico, predominantemente constituída por fibroblastos e macrófagos^{19,20} e rica em colágeno e proteoglicanos que se encontra em contato com a superfície profunda do âmnio, lâmina basal e as células trofoblásticas²¹. A lâmina basal separa a camada reticular da camada subjacente citotrofoblástica. As células citotrofoblásticas do cório, semelhantes a todos os outros trofoblastos encontrados fora do vilo placentário, são conhecidas como trofoblasto extraviloso, variam na aparência e são bem diferenciadas^{20,22}. Sua função está associada contra a rejeição imunológica ao feto²³ e é responsável pela inativação de hormônios, prostaglandinas, ocitocina e endotelina-1 localmente produzidas²⁴. Embora mais espesso desempenha um menor papel na resistência mecânica das membranas fetais^{6,20}.

A decídua corresponde ao endométrio não gravídico e é composta de células materna e matriz extracelular em abundância²¹. É formada a partir da reação das células do endométrio a invasão sinciotrofoblástica, fenômeno conhecido como decidualização. Reagindo a essa invasão, a parede uterina promove a proliferação dos vasos sanguíneos na região, dando origem a uma estrutura altamente vascularizada. Devido às enzimas secretadas pelas projeções do sinciotrofoblasto as paredes dos vasos sanguíneos ao seu redor são destruídos, formando na decídua lacunas de sangue, por onde passa a circular sangue materno, em contato íntimo com o tecido embrionário. A interface entre cório e decídua permite a difusão de nutrientes a partir do lado

materno para o lado fetal, além de funcionar como barreira imunológica fetal entre os dois compartimentos²⁵⁻³¹.

3. Parto Pré-termo e Rotura Prematura de Membranas

É um dos principais determinantes da mortalidade e morbidade neonatal e a longo prazo apresenta consequências adversas³²⁻³⁴. Crianças que nascem prematuramente têm maiores taxas de paralisia cerebral, deficiências sensoriais, dificuldades de aprendizagem e doenças respiratórias em relação às crianças nascidas a termo. Dentre todos os óbitos neonatais precoces, aqueles que ocorrem nos sete primeiros dias de vida, e que não estão relacionados com malformações congênitas, 28% são em decorrência ao parto prematuro³⁵.

A incidência do parto pré-termo é bastante variável, refletindo as diferentes classificações empregadas pelos órgãos oficiais. Nos países desenvolvidos variam entre 5 e 7%. Na América latina essa taxa varia de 1 a 43%, sendo no Brasil estimado 11%^{36,37}. Embora os eventos envolvidos no parto prematuro não sejam completamente compreendidos, acredita-se que sua etiologia seja multifatorial. Os fatores ligados ao parto prematuro estão associados às condições de saúde maternas e fetais, influências genéticas, fatores comportamentais e socioeconômicos, prematuridade iatrogênica e infecção ou inflamação³⁸.

Os precursores obstétricos que podem levar ao parto pré-termo incluem os de origem idiopática, responsável por cerca de 55% dos casos, podendo ser subdivididos em trabalho de parto prematuro com bolsa íntegra (TPP) e rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT), e os eletivos por indicação médica em decorrência à complicações maternas ou fetais³⁹.

A falência tecidual que ocorre na rotura das membranas fetais é um evento fisiológico normal e único se comparado ao mesmo evento em outros tecidos⁴⁰. Portanto, a rotura espontânea das membranas ovulares é um acontecimento normal durante o trabalho de parto, ocorrendo rotineiramente após o início do mesmo. Quando precede o início do trabalho de parto é intitulada de rotura prematura de membranas (RPM). Sua ocorrência em idade

gestacional inferior a 37 semanas recebe a denominação de rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT)^{41,42}.

A incidência de RPM ocorre em cerca de 9,0% das gestações⁴³ variando de 2%⁴⁴ a 4,6%⁴⁵ das gestações pré-termo.

A RPM-PT é uma das maiores causas de prematuridade e é a mais importante causa de morbidade e mortalidade neonatal, particularmente por estar associada ao período de latência entre a rotura das membranas fetais e o parto, infecção perinatal e compressão do cordão umbilical devido à redução do líquido amniótico. De acordo com Parry⁶ o trabalho de parto espontâneo ocorre dentro de 24 horas culminando com o parto em até 60% dos casos de RPM-PT. Os riscos fetais estão relacionados à idade gestacional em que o acidente ocorre e é inversamente proporcional à idade gestacional. A frequência e severidade das complicações neonatais após a RPM-PT variam conforme a idade gestacional em que ocorreu e estão aumentadas na presença de infecção perinatal⁴¹, elevando o índice de infecção neonatal de 1 a 3% para 8 a 30%, aumentando os índices de mortalidade neonatal, independente da idade gestacional⁴⁶. Dentre as complicações, a corioamnionite clínica é a segunda frequentemente associada a RPM-PT, ocorrendo em 13-60% dos casos⁴⁷. Além disso, 55% das gestantes com RPM-PT apresentam sinais histológicos de infecção no momento do parto^{48,49}. A síndrome do desconforto respiratório, seguida de enterocolite necrotizante, hemorragia intraventricular e sepse são as complicações mais graves e frequentemente associadas à prematuridade e raramente encontradas nas gestações a termo⁴¹.

É conhecido que o número de recém-nascidos sadios de mães com RPM-PT é maior que os infectados, no entanto entre os recém-nascidos infectados a frequência de RPM-PT é variável, chegando a 50% dos casos e está associada com aumento da morbidade materna e da morbimortalidade perinatal. O maior risco materno é a infecção puerperal e o aumento nas taxas de cesáreas^{42,50-52}.

Muitos estudos epidemiológicos e clínicos têm identificado fatores de risco associados a RPM-PT que incluem, mas não estão limitados a fatores socioeconômicos, stress psicossociais, tabagismo,⁵³⁻⁵⁵ raça⁵⁶, complicações obstétricas⁵⁷⁻⁵⁹ e infecções cérvico-vaginais como vaginose bacteriana^{42,60-65} e infecção clamidiana⁶⁶ assim como infecções causadas por *Mycoplasma hominis*⁶⁷, *Ureaplasma urealyticu*⁶⁷ e *Streptococcus agalactiae*⁶⁷. Fatores ambientais e predisposição genética⁶⁷, também devem ser considerados. Somado a esses fatores sinais bioquímicos de origem fetal e a ocorrência de apoptose nas membranas fetais também têm sido relacionados com a RPM-PT⁶⁸⁻⁷¹.

Estímulos endógenos ou exógenos desencadeiam uma resposta inflamatória no hospedeiro, mediada em grande parte pela ativação da cascata das citocinas. Estas, por sua vez, promovem a ativação de neutrófilos, a síntese e liberação de uterotônicos, como as prostaglandinas e metaloproteinases, determinando o início da contração uterina, o enfraquecimento das membranas e o remodelamento do colágeno cervical^{5,68}.

Diversos mecanismos importantes têm sido relacionados à RPM-PT. O enfraquecimento das membranas corioamnióticas pela degradação do colágeno presente na matriz extracelular é um dos eventos chave que predis põem a rotura das membranas fetais. Fatores endógenos e exógenos são capazes de ativar a degradação de colágeno. Dentre os fatores endógenos estão à variação na espessura e a redução da quantidade de colágeno presente. Entre os fatores exógenos está incluído produto do metabolismo bacteriano e a resposta inflamatória materna ao hospedeiro. A ativação de enzimas específicas na degradação da matriz extracelular denominada metaloproteinases de matriz (MMPs) na presença de infecção têm sido recentemente associadas à rotura das membranas fetais. A hipótese de que a RPM-PT é uma ‘síndrome de resposta inflamatória ao hospedeiro’ é justificada pela presença de marcadores inflamatórios encontrado na interface materno-fetal independente de sua etiologia⁶⁹.

3.1. Vias moleculares distintas para a ocorrência de RPM-PT e TPP

A etiologia associada a RPM-PT e ao TPP é em, parte, similar, e a infecção está associada com cerca de 50% destes casos. Neste cenário, uma intrigante questão surge: porque algumas mulheres apresentam RPM-PT e outras o TPP, se os fatores etiológicos associados com ambas às complicações patológicas podem ser os mesmos⁷⁰?

Para Fortunato e Menon⁷⁰, alguns fatores moleculares presentes em gestantes com RPM-PT estão ausentes ou minimamente expressos em gestantes em TPP e bolsa íntegra. A ativação da via das citocinas, em maior ou menor grau dependendo do *status* da infecção, é uma característica essencial tanto na RPM-PT quanto no TPP. Na presença das principais citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α em ambas as condições, ficou evidente que o TNF- α desempenha um importante papel na RPM-PT através da indução da apoptose, ativação de metaloproteinases (MMPs) e caspases levando a degradação da MEC nas membranas fetais⁷¹. Já a IL-1 β tem menor participação nesse processo, enquanto a IL-6 tem participação mínima na indução das MMPs ou apoptose nas membranas fetais⁷².

Estudos têm mostrado que MMPs, seus inibidores e elementos apoptóticos, em ambas as formas ativa ou pró-ativa estão elevados, tanto na expressão gênica quanto na proteica, em membranas corioamnióticas e líquido amniótico de uma grande parcela de gestações complicadas por RPM-PT. Embora a expressão de proteínas pró-apoptóticas, como a p53, bax e caspase-8 tenham sido todas elevadas nos casos complicados por RPM-PT quando comparados com o TPP, foi observado também um aumento de Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica, no grupo TPP quando comparado com o grupo RPM-PT, exercendo um efeito protetor contra a apoptose no grupo TPP^{71,73,74}. Além disso, o aumento de fatores pró-apoptóticos foi também observado através do aumento da fragmentação do DNA em membranas corioamnióticas após a RPM-PT, evento não

observado nos casos de TPP^{70,76}. Somado a isso, a promoção da apoptose via p53, FAS e rTNF são funcionais na RPM-PT. Os genes relacionados com a via rTNF, incluindo a caspase-8, outras caspases efetoras e os receptores associados com o domínio da morte (TRADD), são expressos nas membranas fetais de gestantes com RPM-PT, mas não no grupo TPP^{71,73}.

Assim, sugere-se que a RPM-PT seja uma entidade clínica molecularmente distinta do TPP. Embora ambas as condições compartilhem os mesmos fatores etiológicos e em muitos casos se sobrepõem em um mesmo paciente, é observado que eventos moleculares distintos levam à RPM-PT, distinguindo-a do TPP. Apesar de compartilharem parte da ativação de citocinas pró-inflamatórias como via comum, no momento em que as vias apoptóticas e das MMPs são requisitadas fica evidente a divergência entre a RPM-PT e o TPP. Assim, os autores sugerem que uma ou mais citocinas podem atuar como interruptores entre as duas vias que levam à RPM-PT em algumas gestantes e ao TPP em outras^{71,73,76, 77}.

4. Mecanismos morfológicos e bioquímicos do enfraquecimento e degradação das membranas fetais

A degradação das membranas corioamnióticas é um fenômeno fisiológico observado durante toda a gestação, sendo essencial para o crescimento e remodelação tecidual. Um delicado equilíbrio entre síntese e degradação da matriz extracelular garante a integridade e resistência das membranas fetais⁶. Enquanto a síntese de colágeno parece estar aumentada no início da gestação, atingindo seu pico por volta da vigésima semana gestacional, a degradação do colágeno está aumentada após a metade do segundo trimestre de gestação⁶. Dessa forma sugere-se que uma série de eventos bioquímicos e morfológicos atue conjuntamente resultando no enfraquecimento das membranas fetais no final da gestação⁷⁸. Para El Khwad et al.⁷⁹, o enfraquecimento das

membranas fetais está associada com características bioquímicas e histológicas consistentes com a remodelação do colágeno e apoptose.

A quantidade de matriz extracelular diminui consideravelmente nas últimas semanas de gestação⁸⁰, no entanto a síntese de colágeno continua até o mesmo período embora a um nível inferior do que no início da gestação¹³. A produção constitutiva de relaxina⁸¹ e interleucina 8 (IL-8)⁸² pelas células decíduais são capazes de estimular a produção de enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular, conhecidas como MMPs⁸³⁻⁸⁵. Assim, a produção excessiva de relaxina e IL-8 pode levar a uma perda maior de matriz extracelular, enfraquecer o tecido e predispor a sua ruptura²⁰. Portanto, a rotura das membranas fetais é o resultado de um processo de remodelação e maturação análoga à observada na cérvix uterina. Tanto na cérvix como no âmnio, propõe-se que a degradação da matriz extracelular causa o enfraquecimento inicial, que é então seguido pela apoptose celular⁸⁶⁻⁸⁸.

4.1. *Zone of altered morphology (ZAM)*

Na tentativa de explicar o fenômeno da rotura das membranas fetais, muitos estudos têm sido propostos. Neste sentido, num estudo conduzido por Malak et al.⁸⁹, ao realizarem o mapeamento completo de seções congeladas de membranas corioamnióticas após a rotura espontânea a termo foi identificada uma área com características morfológicas únicas, encontrada apenas dentro de uma área restrita ao longo da linha de ruptura. Esta região restrita tem-se denominado de *zone of altered morphology (ZAM)*, cujas características descritas consistem com o seu potencial de enfraquecimento estrutural.

A ZAM trata-se de uma região que abrange uma área com cerca de 21 cm² caracterizada por marcada redução da camada trofoblástica, associada com a perda

celular, redução da decídua, e inchaço dos componentes do tecido conjuntivo com aumento do número total de células na camada reticular, particularmente dos miofibroblastos. Ocorre uma diminuição da quantidade de colágeno, principalmente dos tipos I, III, V, e um aumento na expressão de tenascina, a qual é caracteristicamente expressa durante o remodelamento tecidual de locais em cicatrização. Portanto, sua expressão nas membranas corioamnióticas sugere uma resposta de cicatrização à presença de uma lesão nas membranas fetais. Além disso, é observada uma redução dos elementos necessários para manter a integridade estrutural das células e a diminuição do contato entre as células, culminando com o enfraquecimento da região, o âmnio e o córion se separam as fibras de colágeno se desorganizam e são rompidas e sua densidade é reduzida. Além disso, tem sido demonstrado um aumento da apoptose nesta região de alteração⁹⁰. Tal sequência de eventos normalmente acontece sincronizado ao trabalho de parto, no entanto, a ativação precoce da perda arquitetônica e força mecânica das membranas, ou seja, em momento anterior ao início do trabalho de parto, caracterizam a RPMs⁹⁰.

Assim, devido às características estruturais da ZAM e sua restrita área de localização dentro da linha de ruptura, tem sido proposto que a ZAM pode representar o local inicial de ruptura da membrana fetal em resposta ao aumento da tensão com o avanço da gestação⁹¹.

4.2. Metaloproteinases e seus Inibidores Teciduais

As metaloproteinases (MMPs) são enzimas endógenas cálcio e zinco dependentes⁹², que possuem extensa homologia na sequência, mas diferem em termos de especificidade ao substrato e regulação transcricional, funcionam em pH neutro e coletivamente são capazes de degradar a maioria, se não todas as moléculas da matriz extracelular⁸³, desempenhando importante papel no processo de remodelamento e

acomodação das membranas fetais com o avanço da gestação¹². Aproximadamente 20 membros da família das MMPs foram identificadas⁸⁰, cada uma capaz de degradar múltiplos substratos, levando a significativa sobreposição de suas atividades⁸¹. As MMPs são secretadas por uma variedade de células, incluindo as células musculares lisas, fibroblastos e células inflamatórias⁹⁴, as quais são capazes de responder a fatores de crescimento e citocinas. Na presença desses mediadores essas células liberam as MMPs de grânulos específicos de armazenamento para o meio extracelular⁹⁵. Variados tipos celulares podem expressar diferentes grupos de MMPs e citocinas distintas geram diferentes efeitos transcricionais no mesmo tipo celular. No entanto, diferentes células não reagem da mesma forma em resposta à mesma citocina. Em função destas características e das várias interações sinérgicas e antagônicas que existem entre duas ou mais citocinas, sugere-se que diferentes infiltrados inflamatórios podem variar conforme seu potencial de destruição⁹⁵.

Apesar de degradarem múltiplos substratos as MMPs podem ser classificadas de acordo com a especificidade do substrato e a sua homologia interna: as collagenases, estromelinas, estromelinas “like”, gelatinases, matrilisinas, metaloproteinases transmembrana (MT-MMP) e outras metaloproteinases^{96,97}.

Todas as MMPs descritas derivam de um protótipo de três a cinco domínios. O domínio catalítico, que contém um íon zinco no sítio catalítico da proteína. E o pró-domínio ou domínio pró-peptídico, que contém um resíduo cisteína responsável pela manutenção da proteína sob sua forma latente, mantendo a proteína na forma de zimógeno até que seja removido por proteólise⁸⁵. As sequências adicionais contribuem para o funcionamento único de cada enzima. O domínio hemopexina, rico em cisteína, determina os substratos específicos de cada MMP e de seu inibidor. No entanto, os substratos e seus inibidores não são exclusivos para cada MMP⁹⁸⁻¹⁰⁰.

As MMPs pela hidrólise de componentes da matriz extracelular estão envolvidas em diversos processos como embriogênese¹⁰¹, implantação¹⁰², invasão trofoblástica¹⁰², placentação¹⁰² e involução uterina após o parto¹⁰². Assim, as metaloproteinases apresentam importante papel nos vários estágios da gestação^{94,95,101-104}. Em condições fisiológicas, há rigorosa regulação da secreção das MMPs, as quais são secretadas como pró-enzimas, ou seja, zimógenos⁸¹, que posteriormente são ativadas em um processo que requer a clivagem proteolítica dos domínios amino-terminal¹⁰⁵. Essa regulação ocorre apenas em momentos específicos, nos quais existem processos multifásicos de ativação dos zimógenos, além de haver vários inibidores sanguíneos e teciduais para monitorar a ação da proteinase. O controle da quantidade de enzima ativa é feito pelos inibidores teciduais da MMPs. O desequilíbrio entre MMP e seu inibidor pode resultar em várias intrecorrências¹⁰⁶.

A atividade das metaloproteinases no substrato da matriz extracelular é regulada por: regulação na transcrição gênica das MMPs, ativação de precursores, diferença de especificidade ao substrato e por inibidores de MMPs⁹³.

Os inibidores específicos de MMPs, também conhecidos como inibidores teciduais de MMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases – TIMPs) são pequenas glicoproteínas (21 – 34 kDa) e multifuncionais que regulam tanto o nível de sua ativação quanto a sua habilidade em hidrolisar um determinado substrato⁹³. São formados por cerca de 184-194 aminoácidos e são subdivididos em subdomínio N-terminal e C-terminal. Cada domínio contém três pontes de dissulfeto conservadas e o domínio N-terminal funciona como uma unidade separada e capaz de inibir a atividade das MMPs. Os TIMPs são proteínas secretadas, mas podem ser encontradas na superfície celular em associação com proteínas de membranas. Compreendem uma família de quatro membros estruturalmente relacionados, TIMP-1, -2, -3 e -4. Os TIMPs-1 e -2 são

secretados na forma solúvel, enquanto o TIMP-3 está associado à MEC¹⁰⁷⁻¹¹⁰. Os quatro TIMPs descritos possuem a capacidade de efetuar fortes ligações com membros da família das MMPs, com consequente formação de complexos inibitórios⁹³. São produzidos por diversos tecidos, apesar de nem todo o tecido expressar todos os tipos, mas de uma forma geral diversos tipos celulares incluindo a maioria das células mesenquimais, epidermais^{93,107,108} e as células secretoras de metaloproteinases são responsáveis pela sua produção¹⁰³. Também podem ser identificados na maioria dos fluidos corpóreos como saliva, soro e urina^{93,107,108}.

Os TIMPs inibem as MMPs de uma forma seletiva, mas reversível com estequiometria de 1:1. Normalmente todos os TIMPs são capazes de inibir todas as MMPs descritas tanto nas formas ativas e, em alguns casos, com os precursores latentes⁹³. No entanto, a eficácia da inibição da MMP varia de acordo com cada TIMP^{107,108,111,112}. Embora os TIMPs sejam considerados os principais inibidores das MMPs^{107,108,111,112} outros inibidores e mecanismos inibitórios têm sido identificados, dentre esses estão as macroglobulinas α_2 um potente inibidor das proteinases nos fluidos teciduais que são capazes de capturar as formas ativas de MMPs, desempenhando um importante papel na regulação de sua atividade^{93,107,111,113}, e a proteína RECK, o único inibidor de MMP transmembrana conhecido^{107,111,112}. As espécies reativas de oxigênio e a endocitose também são capazes de silenciar as MMPs *in vivo*^{113,114}. Enquanto as macroglobulinas funcionam como reguladoras das MMPs nos fluídos corpóreos, os TIMPs provavelmente atuam pericelularmente. No entanto, durante a inflamação as α_2 -macroglobulinas de alto peso molecular podem escapar da circulação e atuar na matriz extracelular⁹³.

A ação inibitória dos TIMPs sobre as MMPs é efetuada por meio da inibição da forma catalítica ativa da enzima e da prevenção ou atraso na conversão dos zimógenos

para a forma ativa¹¹⁵. Este mecanismo deve-se ao desenho em forma de cunha da molécula de TIMP, que a torna capaz de abrir uma fenda na ranhura do sítio da MMP, de forma similar aquela feita pelo substrato⁸¹.

Além dos inibidores endógeno, a atividade proteolítica das MMPs pode ser modificada por inibidores exógenos representados pelos quelantes de metais, como o ácido etil diamino tetracético (EDTA), APMA, e as tetraciclinas (TTC), refletindo importância dos íons cálcio para a atividade ótima das MMPs¹¹⁶.

Embora a inibição da atividade enzimática das MMPs tenha sido considerada a função primária dos TIMPs por muitos anos, o numero de funções atribuídas a esses inibidores têm crescido rapidamente. Além de atuarem como inibidores das MMPs, os TIMPs estão relacionados com a ativação das MMPs, a capacidade de estímulo antiapoptótico e mitogênico, ao controle indireto da pressão sanguínea por meio do seu efeito sobre as MMPs e as interações imunológicas que podem ser justificadas pelo fato de que muitas das citocinas produzidas pelo sistema imune estão envolvidas na sinalização celular e algumas são capazes de interagir com a transcrição de genes das MMPs e TIMPs ou alterar sua expressão, o que faz com que o efeito das citocinas sobre essas moléculas seja extremamente complexo. Portanto, dependendo do tipo celular, uma mesma citocina pode estimular ou inibir a expressão de MMP e dos TIMPs¹¹⁷.

A placenta expressa TIMPs-1, -2 e -3, sendo que atividade da MMP-9 é regulada pelo TIMP-1¹⁰⁹, enquanto a atividade da MMP-2 é inibida pelo TIMP-2¹¹⁴. Durante o parto, os níveis de TIMPs estão diminuídos no âmnio e cório, favorecendo a atividade das MMPs, permitindo a desagregação dos componentes da MEC, facilitando a rotura das membranas fetais¹¹⁸⁻¹²¹.

Segundo Vadillo-Ortega & Estrada-Gutiérrez¹²², a homeostase da MEC parece ser o evento chave na etiologia da RPM-PT. Ao contrário da rotura normal das

membranas fetais durante o trabalho de parto, na RPM-PT a expressão e secreção das metaloproteinases não ocorrem em sincronia com os mecanismos do trabalho de parto, resultando na degradação anormal da MEC. Embora não sejam conhecidos os fatores fisiológicos envolvidos na expressão das MMPs, os produtos bacterianos e/ou produção de citocinas pró-inflamatórias, assim como o $\text{TNF-}\alpha$ e a $\text{IL-1}\beta$, podem ativar essa cascata enzimática em gestações complicadas por infecção na cavidade amniótica, desencadeando a RPM-PT.

4.1.1. Metaloproteinases e a RPM-PT

Dentre as metaloproteinases, com possível envolvimento em complicações gestacionais, destacam-se as MMP-2 e MMP-9, conhecidas como gelatinases A e B, respectivamente, que são capazes de degradar a elastina, fibronectina⁸⁰ e o colágeno tipo IV, um dos principais componentes das membranas corioamnióticas^{123,103}.

As gelatinases possuem três domínios de fibronectina em sua estrutura, os quais são responsáveis pela ligação à gelatina, laminina, elastina e os colágenos tipos IV e VII¹²⁴. A ligação Cis-Zn^{2+} presentes no pró-domínio e domínio catalítico respectivamente mantêm as pro-MMPs na forma inativa, prevenindo que moléculas de água se liguem ao átomo de zinco, levando a sua ativação¹²⁴.

Embora essas duas gelatinases apresentarem estrutura e especificidade ao substrato similar, difere em sua origem celular. Enquanto a gelatinase B é secretada por fatores de crescimento e células pró-inflamatórias como os neutrófilos, macrófagos, células epiteliais e alveolares dos brônquios, fibroblastos e células malignas, a gelatinase A foi purificada inicialmente a partir de células tumorais de rato com metástase¹²⁴.

A MMP-9 é sintetizada na pró-forma latente de 92 kDa e processada para ser ativada nas formas de 68-82 kDa¹²⁵, pode ainda ser encontrada associada ao TIMP-1 e

TIMP-2 formando complexos de 92kDa ou ainda em um complexo de 120 kDa com NGAL (Gelatinase-associated lipocain)¹²⁶. É secretada por fatores de crescimento, células alveolares e epiteliais dos brônquios, fibroblastos, células endoteliais, células malignas, células pró-inflamatórias como os neutrófilos e macrófagos¹²⁷⁻¹²⁹.

Nos tecidos gestacionais é expressa no final da gestação pelo trofoblasto, âmnio e células decíduais e é a maior enzima expressa durante o trabalho de parto¹³⁰. A correlação entre expressão de MMP-9 e o declínio da resistência tênsil das membranas corioamnióticas tem sido descrita pela literatura¹⁰⁴. Dessa forma, a expressão seletiva e temporária da MMP-9 a torna possível candidata a marcador molecular do início do trabalho de parto^{112,122}. Subpopulações específicas de linfócitos T (CD3⁺) expressando MMP-9 são atraídos para a interface coriodecidual, e eles são capazes de estabelecer contato com outras populações celulares localizadas nas proximidades das membranas, e juntos colaboram na degradação da MEC¹²².

A literatura têm associado aumento da proteína MMP-9 e de sua atividade nas membranas fetais, placenta e líquido amniótico de gestações pré-termo^{121,131}, e de termo^{103,132,133}, sugerindo seu papel durante o parto^{174,132}. Porém têm sido encontrados níveis cinco vezes elevados na expressão de MMP-9, em gestações pré-termo, quando comparado com gestantes de termo¹³⁰. Segundo Fortunato et al.⁷⁴ houve produção de RNAm de MMP-9 nas membranas fetais em resposta à toxinas bacterianas. Nos casos de rotura prematura de membranas complicadas por infecção na cavidade amniótica, a concentração da forma ativa da MMP-9 esteve aumentada em relação aos casos de trabalho de parto pré-termo e bolsa íntegra. Esses dados sugerem o papel das gelatinases nos mecanismos responsáveis pela rotura das membranas corioamnióticas na presença de infecção¹³².

A secreção e liberação de MMP-9 podem ser induzidas pelo trabalho de parto ou pela presença de infecção⁸⁷ e níveis aumentados desta enzima leva ao início da cascata de degradação da MEC que está associada à rotura das membranas corioamnióticas. Athayde et al.¹²¹ relataram que gestantes com RPM-PT apresentaram concentrações mais elevadas de MMP-9 no líquido amniótico e propuseram que esse aumento no líquido amniótico estaria relacionado ao aumento da produção nas membranas fetais. Nesse sentido, Fortunato et al.¹⁰³ também relataram aumento na concentração de MMP-9 no líquido amniótico de gestantes com RPM-PT quando comparado com gestantes de termo.

Outros estudos também relataram a atividade MMP-9 aumenta nas membranas fetais durante o parto, tanto em gestações de termo quanto em gestações pré-termo^{74,134}. Alguns autores demonstram ainda uma expressão aumentada de MMP-9 em membranas corioamnióticas de gestações de termo com bolsa rota, quando comparadas com membranas de termo com bolsa íntegra, sugerindo que esses partos, em parte, possuem similar processo de rotura das membranas, na qual, o aumento de MMP-9 é um processo bioquímico importante¹³⁵⁻¹³⁷.

A MMP-2 é secretada por células endoteliais, fibroblatos, macrófagos e células malignas na forma latente de 72 kDa e, quando clivada, adquire a forma de 59-62 kDa. E seu principal substrato alvo é a elastina¹³⁸. É uma enzima constitutivamente expressa pelo âmnio durante a gestação^{65,53}, está acentuada durante o trabalho de parto⁶⁵. Seu padrão de expressão assemelha-se a de controle endógeno⁶⁵, e sua atividade biológica controlada é necessária para a remodelação tecidual, incluindo o crescimento da placenta ao longo da gestação⁶⁹.

A expressão aumentada de MMP-2 requer transativação específica, pois o gene promotor da MMP-2 não possui proteínas ativadoras para transcrição⁶⁹, exceto a AP-2,

que é necessária para a expressão constitutiva, e a proteína pró-apoptótica p53^{139,140}. Dessa forma, o aumento na expressão da p53 nas membranas fetais gera aumento na expressão da MMP-2. Para alguns autores a MMP-2 também está aumentada em gestações complicadas por RPM-PT⁶², porém seu papel ainda não está bem definido nessa intercorrência obstétrica.

As prostaglandinas assim como as contrações possuem a capacidade de induzir o aumento na produção de MMP-2 e MMP-9 e diminuição na produção de TIMP-1 nas células da decídua levando ao desequilíbrio na razão MMP/TIMP favorecendo a atividade proteolítica. Refletindo assim, o papel das prostaglandinas na rotura das membranas¹⁴¹. Segundo a literatura, após o início das contrações uterinas níveis diferencialmente aumentados de MMP-2 e MMP-9 foram encontrados. Enquanto a MMP-2 esteve aumentada na decídua, um aumento expressivo de MMP-9 no âmnio foi documentado. Já no cório a produção tanto de MMP-2 quanto de MMP-9 não sofreu influência do trabalho de parto¹⁴².

McLaren et al.¹³² colaboradores propuseram que as alterações que ocorrem nas membranas fetais próximo ao colo do útero, local onde eventualmente ocorre a rotura das membranas, diferem das demais regiões, pois níveis aumentados da pró-enzima MMP-9 foi significativamente superior na membrana amniótica próxima da cervix quando comparada com a mesma região a 10 cm de distância a partir da borda cervical. Já os níveis de MMP-2 não diferiram quando comparadas as duas regiões. Uma possível explicação para esses achados é que a preparação das fetais para a ocorrência da rotura durante o parto levou a um aumento de MMP-9 próximo ao local da rotura. No trabalho de parto, a produção de MMP-9 é maximizada independentemente da sua distância do colo do útero. Esta associação temporal entre a produção de MMP-9 inicialmente próximo da cervix e mais tarde em toda a extensão das membranas fetais reflete o fato

de inicialmente a MMP-9 enfraquecer as membranas para a ocorrência da rotura durante o parto e posteriormente sua produção torna-se necessária ao longo de toda a membrana para a ocorrência da separação das membranas fetais a partir da decídua e superfície uterina.

Tanto o TPP quanto a RPM-PT frequentemente estão associados com a infecção na cavidade amniótica, e à resposta inflamatória materna e fetal histologicamente denominada como corioamnionite. Esta resposta inflamatória envolve a produção de citocinas inflamatórias como a IL-1, IL-8 e TNF- α e a produção de prostaglandinas. Enquanto a resposta inflamatória é comum para ambos TPP ou RPM-PT é interessante notar em que ponto esses processos se diferem e que irão determinar a ocorrência do TPP ou da RPM-PT. Fica claro a participação da MMPs e dos seus inibidores da diferenciação destes dois caminhos, já que a expressão de MMP-2 e MMP-9 foram significativamente superiores nas membranas corioamnióticas de gestantes com RPM-PT quando comparadas com gestantes em TPP. Em contraste, os níveis de TIMP-2 não diferiram⁷⁰.

4.3. Apoptose

A apoptose é um importante processo de morte celular que envolve uma variedade de sistemas biológicos como a renovação celular, o desenvolvimento embrionário, involução mamária após a lactação, atrofia hormônio-dependente, neutrófilos e outros leucócitos após o término de reações inflamatórias, morte celular induzida por células T citotóxicas entre outros¹⁴³. Por outro lado a ocorrência indevida de apoptose está relacionada a diversos eventos patológicos que incluem as doenças neurodegenerativas, doenças autoimunes e diversos tipos de câncer¹⁴⁴. No cenário gestacional a apoptose poder ser associada à toxemia gravídica^{145,146}, crescimento intra-uterino restrito¹⁴⁶⁻¹⁴⁸, diabetes gestacional^{141,149} e a RPM-PT^{150,151}.

A apoptose é um , morfológicamente distinto e individual primeiramente descrito por Kerr et al. . O padrão de alterações morfológicas e bioquímicas celulares associadas com esse evento inclui a formação de vacúolos citoplasmáticos retração celular causando perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, despolarização da membrana mitocondrial, condensação da cromatina e concentração junto à membrana nuclear que permanece intacta, alterações na assimetria de fosfolipídeos da membrana plasmática e fragmentação internucleossomal do DNA. Os vacúolos citoplasmáticos formadas aumentam de tamanho e número e rompem, originando estruturas contendo conteúdo celular, os chamados corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são sinalizados através da translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana marcando as células que deverão ser fagocitadas, sendo então rapidamente retiradas por macrófagos sem causar uma resposta inflamatória¹⁵²⁻¹⁵⁶.

4.3.1. Características moleculares da apoptose

As alterações morfológicas observadas na apoptose são consequência de uma cascata de eventos bioquímicos e moleculares geneticamente regulados¹⁵⁷.

As caspases são enzimas pertencentes à família das cisteínas proteases que possuem a capacidade de reconhecer e clivar substratos que tenham em sua composição resíduos de aspartato. São sintetizadas como precursores inativos e após um sinal de morte celular, as caspases são ativadas por clivagem do sítio proteolítico. As caspases sinalizam e clivam esses substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, além de externalizar os fosfolipídeos de membrana que serão utilizados como sinalizadores para fagocitose pelos macrófagos. Das catorze caspases humana conhecidas, seis (caspase -3, -6, -7, -8, -9, -10) estão envolvidas com processo de apoptose¹⁵⁷.

As caspases podem ser classificadas de acordo com o papel exercido na apoptose. As caspases iniciadoras estão envolvidas na iniciação da cascata proteolítica e possuem pró-domínios longos, já as caspases efetoras são responsáveis pela clivagem de substratos e apresentam pró-domínios curtos ou inexistentes. São capazes de clivar diversos substratos entre os quais a mdm-2 (murine double minute), uma proteína que se liga à p53 e a mantém no citoplasma. Quando clivada essa proteína libera a p53 que se transloca para o núcleo e ativa a transcrição de genes pró-apoptóticos^{158,159}.

A família Bcl-2 são um conjunto de proteínas que participam ativamente tanto na indução como na inibição da apoptose¹⁶⁰. Os reguladores antiapoptóticos previnem a liberação de citocromo c, e, portanto inibem a apoptose dentre eles estão a proteína Bcl-2 e Bcl-XL. Já as proteínas Bax, Bid e Bcl-XL funcionam como pró-apoptóticas¹⁶¹. Quando expressa, a Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas de oxigênio e a acidificação intracelular, assim como estabilizar o potencial de membrana mitocondrial¹⁶².

A homeostasia celular é mantida através do controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. As proteínas Bcl-2 e Bax são capazes de formar heterodímeros e homodímeros, e o equilíbrio entre eles pode definir o balanço pró-apoptótico ou anti-apoptótico na célula. A proteína Bax é capaz de promover a apoptose através de sua interação com a mitocôndria independente da interação com proteínas apoptóticas. A Bcl-2 após receber um sinal de morte, inibe a permeabilização da membrana mitocondrial externa através do sequestro de Bax, ou por competição dos sítios que seriam ocupados pela Bax na membrana mitocondrial¹⁶³.

As proteínas inibidoras da apoptose (IAP) são moléculas que exercem seu papel antiapoptótico através da capacidade de modular a transcrição do fator NF- κ B, além de inibir atividade enzimática das caspases -3, -7 e -9^{164,165}.

Na ocorrência da apoptose as IAPs são removidas pela Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP-Binding Protein with Low pI), uma proteína liberada pela mitocôndria do espaço intermembrana para o citoplasma juntamente com o citocromo c após o dano mitocondrial^{166,167}. No citoplasma, o citocromo c ativa a caspase-9 através da ligação com a APAF-1 e a Smac/DIABLO remove as IAP de sua ligação inibitória com as caspases¹⁶⁸⁻¹⁷⁰.

A proteína c-Myc é uma fosfoproteína nuclear que tem sua expressão regulada pela fosforilação e interação com outras proteínas celulares. É um gene que responde diretamente ao sinais mitogênicos estimulando a passagem das células da fase G1 do ciclo celular. Além disso, pela transcrição de genes importantes no controle do ciclo celular tais como as ciclinas, quinases e outros, exerce efeito na progressão do ciclo celular. Além do seu papel no ciclo celular, essa proteína apresenta um importante papel na regulação da apoptose, onde a superexpressão como a diminuição da expressão de c-Myc pode levar a morte celular^{171,172}.

Os receptores do fator de necrose tumoral (rTNF) constituem uma superfamília de receptores cuja a principal característica inclui um domínio uma região C-terminal¹⁷³ de aproximadamente 80 aminoácidos em comum denominado de domínio de morte¹⁷⁴. Oito membros dessa família já foram identificados e alguns deles como: Fas, TNF-R1, TRAIL-R1 e TRAIL-R2 foram mais bem estudados. Vários desses receptores encontram-se na membrana celular sem atividade biológica, embora estejam prontos para atuar, provavelmente para proteger a célula em determinadas condições, da apoptose induzida por receptores da morte¹⁷⁵.

A interação entre molécula ligante e seu receptor de morte presente na membrana celular, levará a ativação de processos associados aquele receptor com a finalidade de

promover a apoptose¹⁷⁶. Os receptores de morte do TNF possuem três regiões intracelulares que são responsáveis pelas interações proteína-proteína com outras proteínas relacionadas a apoptose, dentre esses estão o domínio de morte associado à TNF-R e o domínio de morte associado à Fas (Fas-associated death domain – FADD/MORT 1)¹⁷⁷. Após a ligação do FADD à extremidade citoplasmática do receptor da morte, a pró-caspase -8 e -10 e outras proteínas são recrutadas via domínio efetor de morte (death-effector domain – DED) para formar o DISC¹⁷⁸. Assim que expresso o DISC, as caspases-8 e -10 tornam-se ativas¹⁷⁹.

Uma grande variedade de fatores são capazes de desencadear a apoptose, dentre esses fatores estão a radiação ionizante, danos no DNA, ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, privação de fatores de crescimento, choque térmico, níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio e baixa quantidade de nutrientes. Assim a ativação da apoptose pode ocorrer através duas vias: a extrínseca (citoplasmática) ou intrínseca (mitocondrial)¹⁶¹.

Quando ocorre a ligação de ligantes específicos aos receptores de membrana da superfamília rTNF, a via extrínseca é ativada e a cascata das caspases é iniciada. A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática destes receptores, os chamados “domínios de morte”¹⁸⁰. Ao reconhecer um ligante específico seus domínios de morte interagem com moléculas que possuem a capacidade de recrutar a caspase-8, conhecidas como FADD/MORT-1, que irá ativar a caspase-3 e assim executar a apoptose¹⁸¹.

Já a via intrínseca é ativada na ocorrência de estresse extra ou intracelular, como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou a ativação de oncogenes. Esses estímulos convergem principalmente para a mitocôndria que atuam como o

principal mediador deste tipo de morte, induzindo a permeabilização mitocondrial com consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas presentes no seu interior¹⁸². Ao alcançar a mitocôndria, os sinais de morte levam a um colapso do potencial de membrana mitocondrial interna e ao mesmo tempo a água presente no espaço entre as membranas passa para a matriz mitocondrial, culminando com a ruptura da organela e liberação de proteínas apoptóticas para o citoplasma^{183,184}, além disso ocorre a perda da homeostasia celular e como consequência há a interrupção na síntese de ATP aumentando as espécies reativas de oxigênio que além de induzir a ativação das caspases -3 e -9^{185,186}, induz a oxidação lipídica, proteica e dos ácidos nucleicos aumentando o colapso do potencial de membrana mitocondrial interna¹⁸⁷.

Durante a apoptose ocorre a formação de um megaporo que abrange ambas as membranas (interna e externa) mitocondrial¹⁸⁸, e através desse poro ocorre a liberação do citocromo c para o citoplasma. No citosol o citocromo c forma um complexo com a APAF-1 e a caspase-9, denominado apoptossomo que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa, que por sua vez vai liberar a caspase-3 levando a ocorrência da apoptose^{158,163}.

4.3.2. Apoptose e a RPM-PT

A proliferação celular e a apoptose, desempenham um importante papel na função da placenta, sendo inversamente proporcional com o avanço da idade gestacional¹⁸⁹.

Durante a evolução da gestação, o trofoblasto, camada epitelial de origem fetal que separa o tecido materno do fetal, sofre modificações em suas camadas celulares com o objetivo de diminuir a espessura do trofoblasto e facilitar a nutrição e a oxigenação fetal. Observa-se nesse tecido a ocorrência de apoptose durante toda a

gestação, com expressivo aumento no terceiro trimestre, sugerindo ser este um processo normal da senescência placentária¹⁹⁰.

Embora a apoptose faça parte da programação normal de envelhecimento da placenta, situações adversas como a presença de inflamação e ou infecção possuem a capacidade de antecipar e acelerar esse processo, fazendo deste um evento patológico essencial¹⁹⁰.

Alguns mediadores inflamatórios produzidos por células do sistema imune^{191,192} e tecidos gestacionais^{184,185,193,194} caracterizados por sua ação pró-inflamatória, podem estar relacionado com a capacidade de induzir a apoptose nas membranas fetais nas gestações complicadas por RPM. Neste cenário estão as citocinas IL-1 e o TNF- α . Para Fortunato e Menon⁷² após a estimulação das membranas fetais com IL-1 recombinante ocorreu uma indução na atividade das caspases nesses tecidos. Sendo a ativação da cascata das caspases um mecanismo inicial no processo de apoptose nas células das membranas corioamnióticas. A estimulação desse tecido gestacional com TNF- α levou a 80% de apoptose nesses tecidos¹⁹⁵. No mesmo contexto, Daher et al.¹⁹⁶ demonstraram que o TNF- α prejudica o crescimento e função de células trofoblásticas *in vitro*.

Outro mediador inflamatório associado com o mecanismo de apoptose é a IL-18, uma citocina pró-inflamatória com características pró-apoptóticas. Possui a capacidade de induzir a apoptose devido ao aumento da expressão de Fas em células *natural killer* e células T. Quando Fas liga-se ao FasL, a via das caspases é ativada e a apoptose é desencadeada^{197,198}. Dessa forma, foi sugerido que o mesmo pudesse ocorrer nas membranas fetais, no entanto tal mecanismo foi encontrado ser incompleto nesses tecidos¹⁹⁷.

Muitas evidências sugerem que a ativação das metaloproteinases e degradação das membranas são desencadeadas por sinais apoptóticos¹⁹⁹⁻²⁰¹. Fortunato et al⁷⁵.

sugerem que a apoptose pode predispor a indução e ativação do gene MMP-2 conduzindo à RPM.

Estudos têm sugerido associação entre a apoptose e a RPM-PT^{75,79,200}, com pouco conhecimento nos casos complicados por corioamnionite^{150,151,202,203}. Nesse cenário inflamatório, George et al.¹⁵¹, empregando a técnica de TUNEL, avaliaram 30 gestações complicadas por RPM-PT e concluíram que a apoptose está acelerada nas células coriônicas de membranas com corioamnionite. Em outros estudos conduzidos por Kataoka et al.²⁰² e por Murtha et al.²⁰³, avaliando gestações com RPM e corioamnionite, concluíram que há aumento dos índices apoptóticos nas membranas fetais de gestações complicadas por RPM e corioamnionite. Entretanto Tanir et al.¹⁵⁰ empregando a mesma técnica, avaliaram gestações complicadas por RPM e gestações com bolsa íntegra e concluíram que nas gestações complicadas por RPM há aumento dos núcleos apoptóticos nas membranas corioamnióticas, porém não encontraram relação entre corioamnionite e aumento dos índices apoptóticos. Assim, o mecanismo de morte celular programada parece ser acelerado pela infecção e inflamação, levando a aceleração da degradação das membranas fetais normais^{75,151,203,204}. Alguns relatos da literatura têm mostrado que na presença de corioamnionite histológica, infiltração das membranas fetais por leucócitos polimorfonucleares, ocorre uma duplicação no grau de apoptose das células do córion, sugerindo que a presença de infecção e ou inflamação podem alterar o equilíbrio entre sobrevivência e morte celular nas gestações complicadas por RPM-PT²⁰⁵.

As células amnióticas submetidas ao processo de morte celular programada estão associadas com a degradação orquestrada da MEC antes do início do trabalho de parto⁸⁷, sugerindo que a RPM é provavelmente o resultado de mudanças bioquímicas, assim como a presença de força física⁶⁹.

Entretanto, a apoptose ocorre nas membranas fetais sob circunstâncias normais em associação com o trabalho de parto²⁰⁶. Para [Runic²⁰⁷](#) a apoptose ocorre como parte da senescência programada das células coriônicas e deciduais e não são desencadeadas em associação com o trabalho de parto. Em gestações complicadas por infecção intra-uterina, ocorre aumento da apoptose nas membranas fetais¹⁹⁶ e observa-se elevadas concentrações da proteína nucleossomal, um marcador de células apoptóticas, no líquido amniótico²⁰⁸.

5. Infecção da cavidade amniótica, coriamnionite e prematuridade

A ascensão microbiana do trato genital inferior para a cavidade amniótica tem sido considerada o principal mecanismo de infecção e inflamação nos tecidos gestacionais²⁰⁹, associados com o parto prematuro^{46,210,211}. A importância da infecção como um fator etiológico é mais pronunciado numa idade gestacional menor, ou seja, a infecção intrauterina e a inflamação são inversamente proporcional com a idade gestacional²¹². Infecções maternas sistêmicas, como a pneumonia, pielonefrite, malária entre outras^{213,214,215}, e infecções do trato genital são conhecidas por predispor ao parto pré-termo, podendo essas infecções ter início antes mesmo da concepção^{216,217}.

A amniocentese é o método padrão ouro para o diagnóstico de infecção e inflamação intra-amniótica, no entanto, por se tratar de uma técnica invasiva e cercada de riscos para o feto, é pouco utilizada para este fim^{3,218}. O líquido amniótico é estéril para bactérias em 99% dos casos, portanto o isolamento de qualquer micro-organismo através de técnicas microbiológicas de cultivo ou moleculares constitui evidência de invasão da cavidade amniótica³, esta condição muitas vezes existe na ausência de sinais clínicos e sintomas de infecção. Dessa forma os micro-organismos e seus produtos desencadeiam uma resposta inflamatória com subsequente recrutamento e ativação de leucócitos para as membranas fetais²¹⁸, resultando em amplificação da resposta

inflamatória e corioamnionite histológica, considerada importante indicador de infecção da cavidade amniótica²¹⁹. Por outro lado, para alguns autores através da técnica de hibridização *in situ* utilizando uma sonda específica de DNA para as regiões conservadas do DNA bacteriano, foi detectado DNA bacteriano em 70% das membranas corioamnióticas de gestantes submetidas à cesárea eletiva a termo. Esses achados sugerem que a presença de bactérias por si só não é suficiente para causar parto pré-termo e que a colonização microbiana nas membranas corioamnióticas nem sempre estimulam uma resposta inflamatória²²⁰.

A invasão microbiana da cavidade intra-amniótica está presente em 12,8%^{221,222} dos casos de gestantes em trabalho de parto prematuro com bolsa íntegra, e em 32% dos casos complicados por RPM-PT²²¹⁻²²⁴. Gestantes com invasão microbiana da cavidade amniótica estão mais propensas a desencadear o parto prematuro, a sofrerem rotura espontânea das membranas fetais e a desenvolver corioamnionite clínica²²⁵. Os micro-organismos mais comumente encontrados no líquido amniótico são os micoplasmas genitais^{226,227}, *Streptococcus* do grupo B, *Streptococcus viridans*, *Gardnerella vaginalis*, entre outros. E em cerca de 30 a 50% dos pacientes o cultivo é polimicrobiano²²⁸.

Corioamnionite é o termo utilizado como referência às condições clínica, sub-clínica e histológica, sendo a corioamnionite clínica freqüentemente denominada de infecção intra-amniótica ou amnionite²²⁹. Clinicamente, a corioamnionite é definida pela temperatura materna acima de 38°C e pelo menos dois dos seguintes achados: leucocitose materna (acima de 15 mil células/ cm³), taquicardia materna (acima de 100 bpm), taquicardia fetal (acima de 160 bpm) e odor fétido do líquido amniótico²¹⁰. Já a corioamnionite histológica é definida pela presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear nas membranas corioamnióticas, conseqüente de infecção bacteriana do líquido amniótico, das membranas fetais, da placenta e do útero^{19230,231}. A maioria

dos casos de corioamnionite histológica ocorre na ausência de sinais clínicos e de sintomas de infecção²³¹ e este diagnóstico pode ser feito em mais de 20% das gestações de termo e em mais de 50% dos partos pré-termo^{42,51229}.

A principal complicação materna associada à infecção intra-amniótica é a bacteremia, no entanto, na presença de corioamnionite clínica somente 5% a 10% das gestantes apresentam tal complicação^{232,233}. Dentre outras complicações estão o aumento nas taxas de cesáreas, hemorragia puerperal, anormalidades do trabalho de parto incluindo contratilidade uterina anormal, levando a uma maior necessidade de administração de ocitocina e endometrite²²⁹.

A morbidade e mortalidade neonatal relacionada com a corioamnionite são inversamente proporcional com a idade gestacional do parto²³⁴. Em gestações de termo complicadas por corioamnionite, a morbidade é baixa, os índices de pneumonia é inferior a 2% e o índice de sepse (diagnosticado por hemocultura) varia entre 2% a 8%^{235,236}. Tratando-se de gestações pré-termo, a infecção intra-amniótica leva a um aumento de complicações infecciosas como a meningite (3%), enterocolite necrosante (4,5%), pneumonia (10% a 21%) e sepse (7% a 28%), dentre as complicações não infecciosas estão a hemorragia intra-craniana (22% a 24%), síndrome do desconforto respiratório (62% a 63%) e mortalidade neonatal, com taxas superiores a 25%²³⁴.

A infecção ascendente do trato genital inferior para a cavidade amniótica é a via mais comum, no entanto outras vias são descritas, como a infecção hematogênica, retrógrada (a partir da cavidade peritoneal através das trompas uterinas) e acidentalmente através de um procedimento invasivo como a amniocentese²²⁸.

Para Galask et al²³⁷, os micro-organismos da flora vaginal possuem a capacidade de atingir as membranas fetais e infectar a cavidade amniótica, no entanto, não estava claro

se a propagação microbiana pelas membranas fetais precedia a invasão da cavidade amniótica.

Baseado nesta questão, em trabalho recente foi proposto um novo modelo de invasão microbiana da cavidade amniótica (Figura 1), no qual o estágio inicial é caracterizado pela adesão microbiana em limitada região das membranas corioamnióticas, seguida de proliferação microbiana intra-amniótica e invasão das membranas por extensão da proliferação no líquido amniótico²³⁸.



Figura 1. Etapas da invasão microbiana da cavidade amniótica. Modelo proposto por Kim et al.,2009.

Nos tecidos gestacionais os micro-organismos são reconhecidos pelos receptores Toll- Like (TLRs) , que são capazes de ativar o sistema imune inato, induzindo a uma cascata pró-inflamatória orquestrada, entre outros elementos, pelo fator de transcrição NF-k β culminando numa elaborada cascata de moléculas efetoras tais como as citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6,IL-8 e o TNF- α)^{224,239}, proteases, prostaglandinas entre outras enzimas²⁴⁰para produzir uma resposta coordenada incluindo contrações uterinas, infiltração de células inflamatória nos tecidos gestacionais e uma série de alterações bioquímicas e estruturais no colo do útero, denominado de ‘amadurecimento cervical’ e enfraquecimento das membranas fetais²⁴⁰.

A inflamação e seus mediadores, como as quimiocinas (IL-8), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α), prostaglandinas entre outros desempenham papel central na ocorrência do parto pré-termo induzidos pela infecção. A IL-1 foi a primeira citocina associada a este evento²⁴¹, é produzida pela decídua em resposta a produtos bacterianos e a IL-1 β e IL-1 α são capazes de estimular a produção de prostaglandinas pelo âmnio e decídua. Concentrações elevadas dessas citocinas são encontradas no líquido amniótico de gestantes em trabalho de parto pré-termo na presença de infecção²⁴². Estudos experimentais têm mostrado que a administração intravenosa de IL-1 β em animais prenhas estimula a contração intra-uterina e induz ao trabalho de parto pré-termo^{243,244}, no entanto este efeito pode ser bloqueado através da administração do seu antagonista natural, o receptor antagonista IL-1 (IL-1ra)²⁴⁵.

O TNF- α , outro mediador envolvido no mecanismo de trabalho de parto pré-termo na presença de infecção, possui a capacidade de estimular a produção de prostaglandinas pelo âmnio, miométrio e decídua²⁴⁶, apresentando esta última a capacidade de produzir prostaglandinas em resposta a produtos bacterianos^{247,248}. Na presença de infecção níveis aumentados dessa citocina são encontrados no líquido amniótico de gestantes em trabalho de parto pré-termo com bolsa íntegra e na RPM-PT²⁴⁹. Além disso, o TNF- α possui a capacidade de estimular a produção de MMPs, sendo assim associados com a rotura de membranas^{121,133,250}. É conhecido que o TNF- α e a IL-1 β possuem a capacidade de aumentar a expressão de IL-8 pelas células da decídua, por sua vez, a IL-8 é altamente expressa na presença de corioamnionite²⁵¹.

Considerando que o parto prematuro representa hoje um dos maiores desafios da Perinatologia, sendo responsável por grande parte da morbimortalidade nas unidades de terapia intensiva do mundo inteiro, torna-se imperioso o estudo da fisiopatologia das

complicações associadas ao parto prematuro. O entendimento desses mecanismos poderá contribuir para o desenvolvimento dessas gestações.

6. Referências bibliográficas*

1. Terzidou V. Biochemical and endocrinological preparation for parturition. *Best Pract Res Cl OB* 2007; 21: 729-56.
2. Lye S. The initiation and inhibition of labour – toward a molecular understanding. *Sem Reprod Endocrinol* 1994; 12: 284-94.
3. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, ChaiworapongsabT Mazor M. The preterm parturition syndrome *BJOG* 2006; 113 (3):17-42.
4. Peltier MR. Immunology of term and preterm labor. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 122-33.
5. Orsi NM, Tribe RM. Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *J Neuroendocrinol* 2008; 20 (4): 462-9.
6. Parry S, Strauss JF. Mechanisms of diseases: premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998; 338:663-70.
7. Kierszenbaum AL. *Histologia e Biologia celular: uma introdução à patologia*. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.
8. More KL, Persaud TVN. *Embriologia clínica*. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.
9. Montenegro CAB, Rezende Filho J. *Obstetrícia fundamental*. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
10. Chua WK, Oyen ML. Do we know the strength of the chorioamnion? A critical review and analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 144S1:S128-33.
11. Hay ED. Extracellular matrix. *J Cell Biol* 1981; 9:205s – 23s.
12. French JI, McGregor JA. The pathobiology of premature rupture of membranes. *Semin Perinato* 1996; 20:344-68.
13. Casey ML, MacDonald PC. Interstitial collagen synthesis and processing in human amnion: a property of the mesenchymal cells. *Biol Reprod* 1996; 55(6):1253-60.
14. Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, et al. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta* 1993; 14: 385-406.
15. Keene DR, Sakai LY, Lunstrum GP, et al. Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J Cell Biol* 1987; 104:611.
16. Rousselle P, Keene DR, Ruggiero F, et al. Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. *J Cell Biol* 1997; 138:719.
17. Burgeson RE, El Adli FA, Kaitila II, Hollister DW. Fetal membrane

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

collagens: identification of two new collagen alpha chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73:2579.

18. Kanayama N, Terao T, Kawashima Y, et al. Collagen types in normal and prematurely ruptured amniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 153:899.
19. Bryant-Greenwood GD. The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta* 1998; 19:1.
20. Bourne GL. The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *Am J Obstet Gynecol* 1960; 79:1070.
21. Bryant-Greenwood GD, Millar KM. Human fetal membranes: their preterm premature rupture. *Biol Reprod* 2000; 63: 1575-9.
22. Benirschke, K, Kaufmann, P. *Pathology of the Human Placenta*. Springer-Verlag, New York 1995. p. 268.
23. McMaster M, Librach C, Zhou Y, Lim K, Janartour M, De Mars R, et al. Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblast. *J Immunol* 1995;154:3771-3778.
24. Germain A, Smith J, MacDonald P, Casey M. Human fetal membrane contribution to the prevention of parturition: Uterotonin degradation. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:463-470
25. Fukamatsu Y., K. Tomita, T. Fukuta. Further evidence of prolactin production from human decidua and its transport across fetal membrane. *Gynecol Obstet Invest.* 1984; 17(6):309-16.
26. Woollett LA. The origins and roles of cholesterol and fatty acids in the fetus. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12(3):305-12.
27. Edelbauer M, Loibichler C, Nentwich I, Gerstmayr M, Urbanek R, Szepefalusi Z. Maternally delivered nutritive allergens in cord blood and in placental tissue of term and preterm neonates. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 189-93.
28. Loibichler C, Pichler J, Gerstmayr M, Bohle B, Kiss H, Urbanek R, et al. Materno-fetal passage of nutritive and inhalant allergens across placentas of term and pre-term deliveries perfused in vitro. *Exp Clin Allergy* 2002; 32: 1546-51.
29. Fuchs R, Ellinger I. Endocytic and transcytotic processes in villous syncytiotrophoblast: role in nutrient transport to the human fetus. *Traffic* 2004, 5: 725-38.
30. Zusman I, Gurevich P, Ben-Hur H. Two secretory immune systems (mucosal and barrier) in human intrauterine development, normal and pathological (Review). *Int J Mol Med* 2005; 16: 127-33.
31. Schmidt W. The amniotic fluid compartment: the fetal habitat. *Adv Anat celular embriol Biol* 1992; 127: 1-100.
32. International classification of diseases and related health problems. 10th revision. Geneva: World Health Organization; 1992.
33. Huddy CL, Johnson A, Hope PL. Educational and behavioral problems in babies of 32–35 weeks gestation. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2001; 85: 23F-8.
34. Wang ML, Dorer DJ, Fleming MP, Catlin EA. Clinical outcomes of near- term infants. *Pediatrics* 2004; 114:372-6.
35. Lawn JE, Wilczynska-Ketende K, Cousens SN. Estimating the causes of 4 million neonatal deaths in the year 2000. *Int J Epidemiol* 2006; 35:706-18

36. Bertini AM, Taborda W, Vianna ML, Porto AGM. Prematuridade. In Benzecry, Roberto. Tratado de Obstetrícia. Fegrasco. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.
37. Lawn JE, Cousens SN, Darmstadt GL, Bhutta ZA, Martines J, Paul V, et al. 1 year after The Lancet Neonatal Survival Series — was the call for action heard? *Lancet* 2006;367:1541-7.
38. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008;371:75-84.
39. Morken NH, Vogel I, Kallen K, Skjaerven R, Langhoff-Roos J, Kesmodel US, and Jacobsson Reference population for international comparisons and time trend surveillance of preterm delivery proportions in three countries. *BMC Womens Health* 8:16, 2008.
40. Joyce EM, Moore JJ, Sacks MS. Biomechanics of the fetal membrane prior to mechanical failure: Review and implications. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 144:121-7.
41. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 178-93.
42. Silva MG, Peraçoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Peraçoli MTS. Cervical *Lactobacillus* and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynecol Obstet* 2003; 81: 175-83.
43. Tanir HM, Sener T, Tekin N, Aksit A, Ardic N. Preterm premature rupture of membranes and neonatal outcome prior to 34 weeks of gestation. *Int J Gynecol Obstet* 2003; 82: 167-72.
44. Poletti J, Peraçoli JC, Candeias JM, Araújo Junior JP, Silva MG. Inflammatory cytokine mRNA detection by real time PCR in chorioamniotic membranes from pregnant women with preterm premature rupture of membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 144:27-34.
45. Aagaard-Tillery KM, Nuthalapaty FS, Ramsey PS, Ramin KD. Preterm premature rupture of membranes: perspectives surrounding controversies in management. *Am J Perinatol* 2005; 22: 287-97.
46. Goldenberg RL. The management of preterm labor. *Obstet Gynecol* 2002; 100:1020-37.
47. Gómez R, Romero R, Nien JK, Medina L, Carstens M, Kim YM, Chaiworapongsa T, Espinoza J, González R. Idiopathic vaginal bleeding during pregnancy as the only clinical manifestation of intrauterine infection. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005; 18(1):31-7.
48. Romero R, Erez O, Espinoza J. Intrauterine infection, preterm labor, and cytokines. *J Soc Gynecol Invest* 2005; 12(7): 463-5.
49. Romero R, Wu YK, Mazor M, Hobbins JC, Mitchell MD. Amniotic fluid prostaglandin E2 in preterm labor. *Prostag Leukotr Ess* 1988; 34(3):141-5.
50. Baud O, Fontaine RH, Olivier P, Maury L, EL Moussawi F, Bauvin I, et al. Premature rupture of membranes: pathophysiology of neurological impact. *Arch Pediatr* 2007; 1: 549-53.
51. Pristaux G, Bauer M, Mauer-Fellbaum U, Rotky-Fast C, Bader AA, Hass J, et al. Neonatal outcome and two-year follow-up after expectant management of second trimester rupture of membranes. *Int J Gynecol Obstet* 2008; 101: 264-8.
52. Karat C, Madhivanan P, Krupp K, Poornima S, Jayanthi NV, Suguna JS, et al. The clinical and microbiological correlates of premature rupture of membranes. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24: 283-5.

53. Miller HC, Jekel JF. Epidemiology of spontaneous premature rupture of membranes: factors in preterm births. *Yale J Biol Med* 1989; 62: 241-51.
54. Harger JH, Hsing AW, Tuomala RE, Gibbs RS, Mead PB, Eschenbach DA, et al. Risk factors for preterm premature rupture of fetal membranes: a multicenter case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 130-7.
55. Meyer MB, Tonascia JA. Maternal smoking, pregnancy complications, and perinatal mortality. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 128: 494-502.
56. Shen TT, DeFranco EA, Stamilio DM, Chang JJ, Muglia LJ. A population-based study of race-specific risk for preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199: 373 e1-7.
57. Silverman RK, Wojtowycz M. Risk factors in premature rupture of membranes. *Prim Care Update Ob Gyns* 1998; 5: 181.
58. Simhan HN, Caritis SN, Krohn MA, Hillier SL. The vaginal inflammatory milieu and the risk of early premature preterm rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 213-8.
59. Yang J, Hartmann KE, Savitz DA, Herring AH, Dole N, Olshan AF, et al. Vaginal bleeding during pregnancy and preterm birth. *Am J Epidemiol* 2004; 160: 118-25.
60. Camargo RP, Simoes JA, Cecatti JG, Alves VM, Faro S. Impact of treatment for bacterial vaginosis on prematurity among Brazilian pregnant women: a retrospective cohort study. *Sao Paulo Med J* 2005; 123: 108-12.
61. Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002; 8: 3-13.
62. Svare JA, Schmidt H, Hansen BB, Lose G. Bacterial vaginosis in a cohort of Danish pregnant women: prevalence and relationship with preterm delivery, low birthweight and perinatal infections. *BJOG*. 2006; 113(12):1419-25.
63. Sakai M, Ishiyama A, Tabata M, Sasaki Y, Yoneda S, Shiozaki A, et al. Relationship between cervical mucus interleukin-8 concentrations and vaginal bacteria in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52(2):106-12.
64. 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(12 Pt 2):S194-202.
65. McGregor JA, French JI, Seo K. Premature rupture of membranes and bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 463-6.
66. Garite TJ. Premature rupture of the membranes: the enigma of the obstetrician. *Am J Obstet Gynecol* 151; 1985; 1001-5.
67. Sompolinsky D, Solomon S, Elkina L, Weinraub Z, Bukovsky I, Caspi E. Infections with *Mycoplasma* and bacteria in induced midtrimester abortion and fetal loss. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 121: 610-6.
68. Haddad R, Tromp G, Kuivaniemi H, Chaiworapongsa T, Kim YM, Mazor M, Romero R. Human spontaneous labor without histologic chorioamnionitis is characterized by an acute inflammation gene expression signature. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195(2):394.e1-24.
69. Menon R, Fortunato SJ. Infection and the role of inflammation in preterm premature rupture of membranes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol* 2007; 21: 467-78.
70. Fortunato SJ, Menon R. Distinct molecular events suggest different pathways for preterm labor and premature rupture. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 1399-1405.

71. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Role of tumor necrosis factor- α in premature rupture of membranes and PROM. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187:1159-1162.
72. Fortunato SJ, Menon R. IL-1 β is a better inducer of apoptosis in human fetal membranes than IL-6. *Placenta* 2003; 24:922–8.
73. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Support for an infection-induced apoptotic pathway in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:1392-7.
74. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Amniochorion gelatinase-gelatinase inhibitor imbalance in vitro: a possible infectious pathway to rupture. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 240-4.
75. Fortunato SJ, Menon R, Bryant C, Lombardi SJ. Programmed cell death (apoptosis) as a possible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrane degradation in premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182:1468-76.
76. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74:609-19.
77. Fortunato SJ, Menon R. Screening of novel matrix metalloproteinases (MMPs) in human fetal membranes. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19:483-6.
78. Moore RM, Mansour JM, Redline RW, Mercer BM, Moore JJ. The physiology of fetal membrane rupture: insight gained from the determination of physical properties. *Placenta* 2006; 27:1037-51.
79. El Khwad M, Stetzer B, Moore RM, et al. Term human fetal membranes have a weak zone overlying the lower uterine pole and cervix before onset of labor. *Biol Reprod* 2005; 72:720-6.
80. Skinner SJM, Campos GA, Liggins GC. Collagen content of human amniotic membranes: effect of gestation length and premature rupture. *Obstet Gynecol* 1981; 57:487–489.
81. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92:827-39.
82. Woessner JF Jr. The matrix metalloproteinase family. In: Mechan RP, Parks WC, editors. *Matrix metalloproteinase*. New York: Academic;1998, 1-14.
83. El Maradny E, Kanayama N, Halim A, Maehara K, Terao T. Stretching of fetal membranes increases the concentrations of interleukin-8 and collagenase activity. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174:843–849.
84. Qin X, Garibay-Tupas J, Chua PK, Cachola L, Bryant-Greenwood GD. An autocrine/paracrine role of human decidua relaxin. I. Interstitial collagenase (MMP-1) and tissue plasminogen activator. *Biol Reprod* 1997; 56:800–811.
85. Qin X, Chua PK, Ohira RH, Bryant-Greenwood GD. An autocrine/paracrine role of human decidua relaxin. II. Stromelysin-1 (MMP-3) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1). *Biol Reprod* 1997; 56:812–820.
86. Lei H, Vadillo-Ortega F, Paavola LG, Strauss JF. 92-kDa gelatinase (matrix metalloproteinase-9) is induced in rat amnion immediately prior to parturition. *Biol Reprod* 1995; 53(2):339-44.

87. Lei H, Furth EE, Kalluri R, Chiou T, Tilly KI, Tilly JL, et al. A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor. *J Clin Invest* 1996; 98(9): 1971–8.
88. Lei H, Kalluri R, Furth EE, Baker AH, Strauss JF . Rat amnion type IV collagen composition and metabolism: implications for membrane breakdown. *Biol Reprod* 1999; 60(1):176-82.
89. Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *BJOG* 1994; 101(5):375-86.
90. McParland PC, Bell SC, Prinsle JH. Regional and cellular localization of osteonectin/SPARC expression in connective tissue and cytotrophoblastic layers of human fetal membranes at term. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:463-74.
91. Millar LK, Stollberg J, DeBuque L, Bryant-Greenwood G. Fetal membrane distention: determination of the intrauterine surface area and distention of the fetal membranes preterm and at term. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 182(1 Pt 1):128-34.
92. Yonemoto H, Young CB, Ross JT, Guilbert LL, Fairclough RJ, Olson DM. Changes in matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the fetal amnion and chorion during gestation and at term and preterm labor. *Placenta* 2005; 27: 669-77.
93. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol.* 1993; 64:474-84.
94. Watari M, Watari H, DiSanto ME, Chacko S, Shi GP, Strauss JF. Pro-inflammatory cytokines induce expression of matrix-metabolizing enzymes in human cervical smooth muscle cells. *Am J Pathol* 1999; 154:1755-62.
95. Xu P, Alfaidy N, Challis JR. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1353-61.
96. Kraiem Z, Korem S, Matrix metalloproteinases and thyroid. *Thyroid* 2000; 10:1061-9.
97. Vihinen P, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* 2002; 99:157-66.
98. Raza SL, Cornelius LA. Matrix metalloproteinases: pro-and anti-angiogenic activities. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000; 5:47-54.
99. Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett* 2003; 194:1-11.
100. Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int* 2002; 54:255-64.
101. Schulz CG, Sawicki G, Lemke RP, Roeten BM, Schulz R, Cheung PY. MMP-2 and MMP-9 and their tissue inhibitors in the plasma of preterm and term neonates. *Pediatr Res* 2004; 55:794-801.
102. Demir-Weusten AY, Seval Y, Kaufmann P, Demir R, Yucel G, Huppertz B. Matrix metalloproteinases-2 -3 and -9 in human term placenta. *Acta Histochem* 2007; 109: 403-12.
103. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. MMP/TIMP imbalance in amniotic fluid during PROM: an indirect support for endogenous pathway to membrane rupture. *J Perinat Med* 1999; 27:362-8.

104. Athayde N, Romero R, Gomez R, Maymon E, Pacora P, Mazor M, et al. Matrix metalloproteinases-9 in preterm and term human parturition. *J Matern Fetal Med* 1999; 8:213-9.
105. Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Furth EE, Lei H, Muschel RJ, Stetler-Stevenson WG, et al. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 1995; 146: 148-56.
106. Snoek-van Beurden PAM, Von de Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* 2005; 38: 73-83.
107. Ruck P, Marzusch K, Horny HP, Dietl J, Kaiserling E. The distribution of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in the human placenta. *Placenta* 1996; 17:263-6.
108. Lagente V, Manoury, Nénan S, Le Quément C, Martin-Chouly, Boichot E. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 1521-30.
109. Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 2001; 107: 789–800.
110. Kassim SY, Fu X, Liles WC, Shapiro SD, Parks WC, Heinecke JW. NADPH oxidase restrains the matrix metalloproteinase activity of macrophages. *J Biol Chem* 2005; 280: 30201–5.
111. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002; 115: 3719–27.
112. Brew K, Dinakarpanthian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477:267–83.
113. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:161–74.
114. Kassim SY, Fu X, Liles WC, Shapiro SD, Parks WC, Heinecke JW. NADPH oxidase restrains the matrix metalloproteinase activity of macrophages. *J Biol Chem* 2005; 280: 30201–5.
115. Bodden MK, Harber GJ, Birkedal-Hansen B, Windsor LJ, Caterina NC, Engler JA, Birkedal-Hansen H. Functional domains of human TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases). *J Biol Chem* 1994; 269(29):18943-52.
116. Lauer-Fields JL, Juska D, Fields GB. Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. *Biopolymers* 2002; 66(1):19-32.
117. Verstappen J, Von den Hoff JW. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res* 2006; 85(12):1074-84.
118. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Expression of a progelatinase activator (MT1-MMP) in human fetal membranes. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39: 316-22.
119. Riley SC, Leask R, Denison FC, Wisely K, Calder AA, Howe DC. Secretion of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by human fetal membranes, deciduas and placenta at parturition. *J Endocrinol* 1999; 162: 351-9.

120. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1803(1):55-71.
121. Athayde N, Edwin SS, Romero R, Gomez R, Maymon E, Pacora P, et al. A role for matrix metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179:1248-53.
122. Vadillo-Ortega F, Estrada-Gutiérrez G. Role of matrix metalloproteinases in preterm labour. *BJOG* 2005; 112: 19-22.
123. Miao X, Yu C, Tan W, Xiong P, Liang G, Lu W, et al. A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter (-1306C/T) is associated with risk of development but not metastasis of gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res* 2003; 63:3987-90.
124. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69(3):562-73.
125. Sorsa T, Uitto VJ, Suomalainen K. Characteristics of human salivary collagenase and its relationship to periodontal diseases. *Matrix* (Stuttgart, Germany) 1992; 1:406-7.
126. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengeløv H, Borregaard N. 23. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 1993; 268(14):10425-32.
127. Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28(1):12-24.
128. Bjorklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochem Biophys Acta* 2005; 1755(1):37-69.
129. Mäkelä M, Salo T, Uitto VJ, Larjava H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res* 1994; 73(8):1397-406.
130. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ, LaFleur B. Interleukin-10 inhibition of gelatinases in fetal membranes: therapeutic implications in preterm premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 2001; 98:284-8.
131. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Collagenolytic enzymes (gelatinases) and their inhibitors in human amniochorionic membrane. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177:731-41.
132. McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased concentration of pro-matrix metalloproteinase 9 in term fetal membranes overlying the cervix before labor: implications for membrane remodeling and rupture. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182:409-16.
133. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Gomez R, Edwin SS, et al. Evidence *in vivo* differential bioavailability of the active forms of metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:887-94.
134. Gomez R, Ghezzi F, Romero R, Muñoz H, Tolosa JE, Rojas I. Premature labor and intra-amniotic infection. Clinical aspects and role of the cytokines in diagnosis and pathophysiology. *Clin Perinatol* 1995; 22:281-342.
135. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Gomez R, Edwin SS, et al. Evidence *in vivo* differential bioavailability of the active forms of metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:887-94.

136. Vadillo-Ortega F, Hernandez A, Gonzalez-Avila G, Bermejo L, Kazushi I, Strauss JF. Increased MMP activity and decreased tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in amniotic fluid from pregnancies complicated by premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: F90-6.
137. Lu D, Wang ZX, Wang XL, Gu XW, Wang YX, Fu D. Clinical significance of metalloproteinase-9/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase1 imbalance in maternal serum, amniotic fluid, umbilical cord serum in patients with premature rupture of the membranes. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2006; 41(1):20-4.
138. Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res* 2005; 31(6):599-621.
139. Garite TJ. Premature rupture of the membranes: the enigma of the obstetrician. *Am J Obstet Gynecol* 151; 1985; 1001-5.
140. Sompolinsky D, Solomon S, Elkina L, Weinraub Z, Bukovsky I, Caspi E. Infections with *Mycoplasma* and bacteria in induced midtrimester abortion and fetal loss. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 121: 610-6.
141. Ulug U, Goldman S, Ben-Shlomo I, Shalev E. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and (MMP)-9 and their inhibitor, TIMP-1, in human term deciduas and fetal membranes: the effect of prostaglandin F_{2α} and indomethacin. *Mol Human Reprod* 2001; 7:1187-93.
142. Goldman S, Wiss A, Eyali V, Shalev E. Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and deciduas, associated with labour. *Mol Hum Reprod* 2003; 9:367-73.
143. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; 267(5203):1456-62.
144. Nicholson DW. ICE/CED3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis. *Nat Biotechnol* 1996; 14(3):297-301.
145. Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 271-6.
146. Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 158-66.
147. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1997b; 177: 1395-401.
148. Levy R, Smith SD, Yusuf K, et al. Trophoblast apoptosis from pregnancies complicated by fetal growth restriction is associated with enhanced p53 expression. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186:1056-61.
149. Sgarbosa F, Barbisan LF, Basil MAM, et al. Changes in apoptosis and Bcl-2 expression in human hyperglycemic, term placental trophoblast. *Diab Resear ClinPract* 2006; 73: 143-9.
150. Tanir MH, Sener T, Kaytaz SAB, Ozen FSMME. Programmed cell death (apoptosis) in placentas from normal pregnancy and pregnancy complicated by term (t) and preterm (p) premature rupture of membranes (PROM). *Arch Gynecol Obstet* 2005; 273: 98-103.
151. George RB, Kalich J, Yonish B, Murtha AP. Apoptosis in the chorion of fetal membranes in preterm premature rupture of membranes. *Am J Perinatol* 2008; 25:29-32.

152. Kerr JFR, Wyllie AH, Durrie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
153. Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991; 32:223-54.
154. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 2004; 19:124-8.
155. WYLLIE, A. H. The biology of cell death in tumors. *Anticancer Res* 1985; 5:131-42.
156. Compton MM. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11:105-19.
157. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000; 45:528-37.
158. Rupnarain C, Dlamini Z, Naicker S, Bhoola K. Colon cancer: genetics and apoptotic events. *Biol Chem* 2004; 385:449-64.
159. Schuler M, Maurer U, Goldstein JC. p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. *Cell Death Differ* 2003; 10:451-60.
160. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 2003; 39:615-47.
161. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407:770-76.
162. Vander Heiden MG, Thompson CB. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol* 1999; 1:E209-16.
163. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644:83-94.
164. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins- suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:239-52.
165. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002; 9:459-70.
166. Verhagen AM, Ekret PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; 102:43-53.
167. Du C, Fang M, Li Y, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation during apoptosis. *Cell* 2000; 102:33-42.
168. Chai J, Du C, Wu JW, Kyrin S, Wang X, Shi Y. Structural and Biochemical basis of apoptotic activation by smac/DIABLO. *Nature* 2000; 406:855-62.
169. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif* 2003; 36:165-75.
170. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis – the p53 network. *J Cell Sci* 2003; 116:4077-85.
171. Thompson EB. The many roles of c-Myc apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60:575-600.
172. Conzen SD, Gottlob K, Kandel ES, Khanduri P, Wagner AJ, O'Leary M, Hay N. Induction of cell cycle progression and acceleration of apoptosis are two separable functions of c-Myc transrepression correlates with acceleration of apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 6008-18.
173. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:420-30.

174. Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 1993; 268: 10932-7.
175. Cheng J, Zhou T, Liu C, et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994; 263:1759-62.
176. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 2000; 288: 2351-4.
177. Chinnaian AM, Tepper CG, Seldin MF, et al. FADD/ MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996; 271: 4961-5.
178. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; 14: 5579-88.
179. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, et al. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 1997; 16: 2794-804.
180. Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci.* 1998; 23:4-79.
181. Daniel PT, Wider T, Sturm I, Schulze-Osthoff K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia.* 2001; 15:1022-32.
182. Desagher S, Martinou JC. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 2000; 10:369-76.
183. Loeffler M, Kremer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cellular Res* 2000; 256:19-26.
184. Gupta S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Int J Oncol* 2003; 22:15-20.
185. Gottlieb E, Vander Heiden MG, Thompson CB. Bcl-XL prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; 20:5680-689.
186. Gottlieb RA. Mitochondrial and apoptosis. *Biol Signals Recept* 2001; 10:147-61.
187. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004; 305:626-9.
188. Wetzel EB, Green DR. Apoptosis: chekpoint at the mitochondria frontier. *Mut Res* 1999; 434:243-51.
189. Boos A, Janssen V, Mülling C. Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. *Reproduction* 2003; 126:469-80.
190. Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblast as sentinel cells: synthesis of chemokines and regulation oh inflammation. *Am J Pathol* 1997; 151(2):317-22.
191. Hill JA. Cytokines considered critical in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1992;28:123-6.
192. Shimoya K, Moriyama A, Matsuzaki N, Ogata I, Koyama M, Azuma C, et al. Human placental cells show enhanced production of interleukin IL-8 in response to lipopolysaccharide (LPS), IL-1 and tumor necrosis factor (TNF-alpha), but not to IL-6. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:885-91.

193. Hsu CD, Meaddough E, Aversa K, Copel JA. The role of amniotic fluid L-selectin, GRO-alpha, and interleukin-8 in the pathogenesis of intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178:428-32.
194. Menon R, Swan KF, Lyden TW, Rote NS, Fortunato S. Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1b and interleukin-6) in amniochorionic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:493-500.
195. Dinarello CA. Interleukin 18. *Methods* 1999; 19:121-32.
196. Daher S, Denardi KAG, Blotta MHSL, Mamoni RL, Reck APM, Camano L, et al. Cytokines in recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2004; 62:151-7.
197. Menon R, Lombardi SJ, Fortunato SJ. IL-18, a product of choriodecidual cells, increases during premature rupture of membranes but fails to turn on the Fas-FasLmediates apoptosis pathway. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18:276-84.
198. Dao T, Ohashi K, Kayano T, Kurimoto M, Okamura H. Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. *Cell Immunol* 1996; 173: 230-5.
199. Sağol S, Sağol O, Ozkal S, Asena U. Role of apoptosis, bcl-2 and bax protein expression in premature rupture of fetal membranes. *J Reprod Med* 2002; 47:809-15.
200. Vadillo Ortega F, Arechevaleta F, Beltrán Montoya J. Apoptosis and extracellular matrix degradation in chorio-amnion during labor and premature membrane rupture. *Ginecol Obstet Mex* 1998; 66:202-7.
201. Balkundi DR, Ziegler JA, Watchko JF, Craven C, Trucco M. Regulation of FasL/Fas in human trophoblasts: possible implications for chorioamnionitis. *Biol Reprod* 2003; 69:718-24.
202. Kataoka S, Furuta I, Yamada H, Kato EH, Ebina Y, Kishida T, et al. Increased apoptosis of human fetal membranes in rupture of the membranes and chorioamnionitis. *Placenta* 2002; 23:224-31.
203. Murtha AP, Auten R, Herbert WNP. Apoptosis in the chorion leave of term patients with histologic chorioamnionitis. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2002; 10:93-6.
204. Menon R, Fortunato SJ. The role of matrix degrading enzymes and apoptosis in rupture of membranes. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11:427-37.
205. Parmeley TH. Spontaneous cell death in the chorion leave. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162:1576-81.
206. Lonergan M, Aponso D, Marvin KW, Helliwell RJA, Sato TA, Mitchell MD, et al. Tumor Necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TRAIL receptors, and the soluble receptor osteoprotegerin in human gestacional membranes and amniotic fluid during pregnancy and labor at term and preterm. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:3835-44.
207. Runić R, Lockwood CJ, LaChapelle L, Dipasquale B, Demopoulos RI, Kumar A, et al. Apoptosis and Fas expression in human fetal membranes. *J Clinical Metab* 1998; 83:660-6.
208. Lu LC, Hsu CD. Elevated amniotic fluid nucleosome levels in women with intra-
209. Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006; 11: 317-26.

210. Gibbs RS, Duff P. Progress in pathogenesis and management of clinical intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:1317-26.
211. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000; 342(20):1500-7.
212. Yoon BH, Romero R, Jun JK, Park KH, Park JD, Ghezzi F, et al. Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:19-26.
213. Gilles HM, Lawson JB, Sibelas M, Voller A, Allan N. Malaria, anaemia and pregnancy. *Ann Trop Med Parasitol*. 1969 Jun;63(2):245-63.
214. Gilles HM, Lawson JB, Sibellias M, Voller A, Allan N. Malaria and pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1969;63(1):1.
215. Le J, Briggs GG, McKeown A, Bustillo G. Urinary tract infections during pregnancy. *Ann Pharmacother*. 2004 Oct;38(10):1692-701.
216. Andrews WW, Hauth JC, Goldenberg RL. Infection and preterm birth. *Am J Perinatol*. 2000;17(7):357-65.
217. Andrews WW, Goldenberg RL, Mercer B, Iams J, Meis P, Moawad A, et al. The Preterm Prediction Study: association of second-trimester genitourinary chlamydia infection with subsequent spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2000 Sep;183(3):662-8.
218. Ramos JGL, Martins-Costa SH, Valério EG, Müller ALL. Infecção Intra-Amniótica. In: Ramos JGL, Martins-Costa SH, Barros R, Machado A, editors, *Antimicrobianos em Ginecologia e Obsetríci*. Porto Alegre: Artmed, 2006; 159-66.
219. 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.
220. Steel JH, Malatos S, Kennea N, Edwards AD, Miles L, Duggan P, et al. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatr Res* 2005;57:404–11.
221. Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R: Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8:3-13, 2002.
222. Romero R, Salafi a CM, Athanassiadis AP, et al: The relationship between acute inflammatory lesions of the preterm placenta and amniotic fluid microbiology. *Am J Obstet Gynecol* 166:1382-1388, 1992.
223. Mays JK, Figueroa R, Shah J, et al: Amniocentesis for selection before rescue cerclage. *Obstet Gynecol* 95:652-655, 2000.
224. Romero R, Gonzalez R, Sepulveda W, et al: Infection and labor: VIII. Microbial invasion of the amniotic cavity in patients with suspected cervical incompetence: Prevalence and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol* 167:1086-1091, 1992.
225. Romero R, Espinoza J, Chaiworapongsa T, et al: Infection and prematurity and the role of preventive strategies. *Semin Neonatol* 7:259-274, 2002.
226. Romero R, Sirtori M, Oyarzun E, et al: Infection and labor: V. Prevalence, microbiology, and clinical significance of intraamniotic infection in women with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 161:817-824, 1989.
227. Romero R, Mazor M, Morrotti R, et al: Infection and labor: VII. Microbial invasion of the amniotic cavity in spontaneous rupture of membranes at term. *Am J Obstet Gynecol* 166:129-133, 1992.

228. Gómez R, Romero R. Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. *Infectious disease. Clin North Am* 1997; 11(1): 135-76.
229. Edwards RK. Chorioamnionitis and labor. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2005;32:287-96.
230. Fahey JO. Clinical management of intra-amniotic infection and chorioamnionitis: a review of the literature. *J Midwifery Womens Health* 2008; 53:227-35.
231. van Hoeven KH, Anyaegbunam A, Hochster H, Whitty JE, Distant J, Crawford C, et al. Clinical significance of increasing histologic severity of acute inflammation in the fetal membranes and umbilical cord. *Pediatr Pathol Lab Med* 1996; 16:731-44.
232. Rouse D, Landon M, Leveno K, Leindecker S, Varner M, Caritis S, et al. The maternal-fetal medicine units cesarean registry: Chorioamnionitis at term and its duration - relationship to outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:211-6.
233. Newton ER. Chorioamnionitis and intra-amniotic infection. *Clin Obstet Gynecol* 1993; 36:795-808.
234. Aziz N, Cheng YW, Caughey AB. Neonatal outcomes in the setting of preterm premature rupture of membranes complicated by chorioamnionitis. *J Maternal Neonatal Med* 2009; 22:780e4.
235. Sperling RS, Newton E, Gibbs RS. Intraamniotic infection in low-birth-weight infants. *J Infect Dis* 1988; 157:113e7.
236. Alexander JM, McIntire DM, Leveno KJ. Chorioamnionitis and the prognosis for term infants. *Obstet Gynecol* 1999; 94:274e8. 24.
237. Yoder PR, Gibbs RS, Blanco JD, Castaneda YS, St Clair PJ. A prospective, controlled study of maternal and perinatal outcome after intra-amniotic infection at term. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 145:695e701.23,24.
238. Galask RP, Varner MW, Petzold CR, Wilbur SL. Bacterial attachment to the chorioamniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148:915-28.
239. Kim MJ, Romero R, Gervasi MT, Kim JS, Yoo W, Lee DC, 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.
240. Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med*. 2007; 25:21–39.
241. Phillippe M, Elovitz M, Saunders T. Thrombin-stimulated uterine contractions in the pregnant and nonpregnant rat. *J Soc Gynecol Invest*. 2001; 8:260–5.34.
242. Romero R, Roslansky P, Oyarzun E, et al: Labor and infection: II. Bacterial endotoxin in amniotic fluid and its relationship to the onset of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158:1044-1049.
243. Romero R, Brody DT, Oyarzun E, et al: Infection and labor: III. Interleukin-1: A signal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160:1117-1123.
244. Sadowsky DW, Novy MJ, Witkin SS, Gravett MG. Dexamethasone or interleukin- 10 blocks interleukin-1beta-induced uterine contractions in pregnant rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188:252-263.

245. Romero R, Mazor M, Tartakovsky B: Systemic administration of interleukin- 1 induces preterm parturition in mice. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:969- 971.
246. Romero R, Tartakovsky B: The natural interleukin-1 receptor antagonist prevents interleukin-1-induced preterm delivery in mice. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 167:1041-5.
247. Romero R, Mazor M, Wu YK, et al: Infection in the pathogenesis of preterm labor. *Semin Perinatol* 1988; 12:262-279.
248. Casey ML, Cox SM, Beutler B, et al: Cachectin/tumor necrosis factor- α formation in human decidua: Potential role of cytokines in infection-induced preterm labor. *J Clin Invest* 1989; 83:430-6.
249. Romero R, Mazor M, Manogue K, et al: Human decidua: A source of cachectin-tumor necrosis factor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991; 41:123-27.
250. 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.
251. Romero R, Chaiworapongsa T, Espinoza J, et al: Fetal plasma MMP-9 concentrations are elevated in preterm premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187:1125-30.

Capítulo II
Artigo científico I

Expressão gênica e proteica de metaloproteinases (MMP-2 and MMP-9) e de seus inibidores (TIMP-1 and TIMP-2) e atividade proteolítica de MMP-2 e MMP-9 em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo

Ana Carolina Pereira¹, Natália Prearo Moço¹, Laura Fernandes Martins¹, José Carlos Peraçoli², Bruna Ribeiro de Andrade Ramos¹, Márcia Guimarães da Silva^{1*}

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

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

1. Resumo

Introdução: A participação das metaloproteinases (MMPs) na fisiopatologia da Rotura Prematura de Membranas (RPM) tem sido discutida na literatura mundial e a degradação anormal da matriz extracelular (MEC) parece ser um dos principais eventos na etiologia da Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo (RPM-PT) associada à infecção na cavidade amniótica. **Objetivo:** Avaliar a expressão das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) e de seus inibidores (TIMP-1 e TIMP-2) e a atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por RPM-PT e corioamnionite histológica. **Pacientes e Métodos:** Foram incluídas no estudo 40 gestantes que apresentaram RPM-PT na presença ou não de corioamnionite histológica. Como grupo controle, foram incluídas no estudo 37 gestantes que apresentaram Trabalho de Parto Prematuro com bolsa das águas íntegras (TPP) na presença ou não de corioamnionite histológica. Todas as pacientes envolvidas no estudo foram atendidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. As membranas corioamnióticas foram coletadas imediatamente após a dequitação da placenta e em seguida transportadas ao Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, UNESP. Fragmentos das membranas corioamnióticas foram encaminhados à análise histopatológica. Outros fragmentos foram submetidos à extração de RNA total. Amostras com concentração entre 0,02 e 0,2 µg/ µL de RNA foram submetidas à obtenção de cDNA e utilizadas na quantificação da expressão dos genes das MMPs e TIMPs pela técnica da PCR em tempo real. Os fragmentos restantes das membranas corioamnióticas foram submetidos à extração de proteínas e utilizados na quantificação proteica por *western blot* das MMPs e TIMPs e quantificação da atividade proteolítica das MMPs pela técnica de zimografia. Os dados sócio-demográficos e gestacionais foram submetidos ao Teste Exato de Fisher e os dados de expressão gênica e proteica das MMPs e de seus inibidores além da atividade proteolítica das MMPs nos grupos estudados foram submetidos aos testes de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis de acordo com a comparação entre dois ou mais grupos. O nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5%. **Resultados:** As variáveis idade materna, estado civil, etnia, tabagismo, tipo de parto, paridade, idade gestacional no momento do parto e intercorrências gestacionais anteriores não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos estudados ($p > 0,05$). A expressão gênica de MMP-9 foi estatisticamente superior no grupo RPM-PT [1,782 (0,0232-1673,903)] quando comparado ao grupo TPP [0,486(0,000237-5,934)], $p = 0,009$. A expressão proteica de MMP-9 foi estatisticamente superior no grupo RPM-PT [2,606 (1,017-5,185)] quando comparado ao grupo TPP [1,683(0,250-2,865)], $p = 0,001$. Da mesma forma, a atividade proteolítica de MMP-9 foi estatisticamente superior no grupo RPM-PT [1,224 (0,0623-7,579)] quando comparado ao grupo TPP [0,503(0,0513-12,737)], $p = 0,001$. Considerando o *status* de corioamnionite histológica, a expressão gênica, proteica e atividade proteolítica de MMP-9 foi estatisticamente superior na presença de corioamnionite no grupo RPM-PT ($p < 0,05$). No grupo TPP, a expressão gênica e a atividade proteolítica de MMP-9 foi estatisticamente superior na presença de corioamnionite histológica ($p < 0,05$). A expressão gênica, proteica e atividade proteolítica de MMP-2 não diferiu entre os grupos estudados, independente do *status* de corioamnionite histológica. Da mesma forma, não houve diferença significativa na expressão gênica e proteica de TIMP-1 e TIMP-2 nos grupos avaliados. A relação MMP-9/TIMP-1 em favor a atividade de MMP-9 foi maior nos grupos RPM-PT (2,367) e TPP (1,617) na presença corioamnionite. **Conclusão:** O desequilíbrio da razão MMP-9/TIMP-1 é um mecanismo importante na fisiopatogênese da RPM-PT associado à corioamnionite histológica.

2. Abstract

Participation of metalloproteinases (MMP) in premature rupture of membranes (PROM) has been extensively discussed in the literature and abnormal degradation of extracellular matrix seems to play a key role in preterm PROM (pPROM) associated with intra-amniotic infection. **Aim:** To evaluate the expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and its inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) as well

as the enzymatic activity of MMP-2 and MMP-9 in chorioamniotic membranes from pregnancies complicated by pPROM and histologic chorioamnionitis (CAM). **Patients and Methods:** We included in the study 40 pregnant women that presented with pPROM in the presence or absence of CAM. The control group comprised 37 patients that presented with preterm labor (PL) and intact membranes in the presence or absence of CAM. All patients included were seen at the Obstetrical Unit Care of Botucatu Medical School, UNESP between January 2010 and December 2012. Fragments of amniotic membranes were collected immediately after labor and transported to the laboratory for histological analysis and extraction of total RNA. Samples with a RNA concentration of 0.02 – 0.2µg/µL were submitted to cDNA production followed by quantification of the expression of MMPs and TIMPs by real-time PCR. Fragments of amniotic membranes were also submitted to protein extraction for quantification of the same markers by western blot and quantification of proteolytic activity of MMPs by zymography. Socio demographic and gestational data were submitted to Fisher's exact test. Data on gene and protein expression were submitted to Mann-Whitney for comparison between two groups and Kruskal-Wallis for comparison among three or more groups. A p-value < 0.05 was considered significant. **Results:** Maternal age, marital status, ethnicity, smoking habits, mode of delivery, parity, gestational age at delivery and previous history of pregnancy complications showed no difference between the groups (p>0.05). Patients with pPROM showed higher gene and protein expression of MMP-9 [Gene expression: 1.782 (0.0232-1673.903), Protein expression: 2.606 (1.017-5.185)] than patients in the PL group [Gene expression: 0.486 (0.000237-5.934), Protein expression: 1.683 (0.250-2.865)], p=0.009 and p=0.001. Similarly, pPROM samples showed higher MMP-9 proteolytic activity [1.224 (0.0623-7.579)] when compared to samples from PL group [0.503 (0.0513-12.737)], p=0.001. Regarding chorioamnionitis status, gene expression and proteolytic activity of MMP-9 was higher in the presence of CAM for both pPROM and PL groups compared to the absence of CAM (p <0.05). Protein expression was also higher in the presence of hCAM for the pPROM group (p <0.05). Gene expression, protein expression and proteolytic activity of MMP-2 did not differ between groups, regardless the status of CAM. Likewise, there were no differences in gene and protein expression of TIMP-1 and TIMP-2 between the groups. Overall MMP-9/TIMP-1 ratio was higher in the presence of CAM compared to its absence [pPROM (2.367) and PL (1.617)], revealing higher MMP-9 activity in the CAM setting. **Conclusion:** Loss of balance between MMP-9/TIMP-1 is an important mechanism for the pathogenesis of pPROM associated to histologic chorioamnionitis.

3. Introdução

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

(RPM-PT)¹. A incidência de RPM ocorre em cerca de 9% das gestações² variando de 2%³ a 4,6%² das gestações pré-termo

Embora a etiologia da RPM-PT seja de origem multifatorial, a infecção da cavidade amniótica parece ser o evento chave na sua patogênese⁵⁻¹⁷. Segundo a literatura, a infecção e/ou inflamação intra-amniótica está presente em pelo menos metade das gestações complicadas por RPM-PT e em aproximadamente um terço das gestantes em trabalho de parto prematuro e bolsa íntegra (TPP)^{18,19}.

As membranas que revestem a cavidade amniótica são compostas pelo âmnio e cório, os quais são conectados pela matriz extracelular (MEC)^{20,21}. A MEC, complexo de proteínas e glicoproteínas que envolvem as células dos mais diversos tecidos, composta principalmente por colágenos disposta em complexa rede, é responsável pela resistência mecânica do tecido. Muitos dos componentes da MEC são degradados pelas metaloproteinases (MMPs), um grupo de enzimas estruturalmente relacionadas, endógenas zinco dependentes²² que desempenham importante papel no processo de remodelamento e acomodação das membranas fetais com o avanço da gestação²³. Neste cenário, destacam-se as MMP-2 e MMP-9, conhecidas como gelatinases A e B, as quais desempenham papel central na degradação da MEC nas membranas fetais em condições fisiológicas e patológicas²⁴⁻²⁷. O principal substrato dessas enzimas é o colágeno tipo IV, o maior constituinte do âmnio e cório e está localizado tanto na membrana basal quanto no interstício^{26,28}.

A atividade das MMPs é regulada pelos seus inibidores teciduais (*tissue inhibitors of metalloproteinases* – TIMPs), os quais também são produzidos por células secretoras de MMPs^{29,30}. A literatura tem relacionado a participação das MMPs na fisiopatologia da RPM¹⁴. Segundo Vadillo-Ortega & Estrada-Gutiérrez²⁶, o rompimento da homeostase da MEC parece ser o evento chave na etiologia da RPM-PT. Assim, ao contrário da rotura normal das membranas fetais durante o trabalho de parto,

na RPM-PT a expressão e secreção das MMPs não ocorrem em sincronia com os mecanismos do trabalho de parto, resultando na degradação anormal e precoce da MEC.

Embora não sejam conhecidos os fatores fisiológicos envolvidos na expressão das MMPs, os produtos bacterianos e/ou produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e Interleucina (IL)-1 β , podem ativar essa cascata enzimática em gestações complicadas por infecção na cavidade amniótica, desencadeando a RPM-PT²⁶. Entretanto, os estudos avaliando o desequilíbrio de MMPs e seus inibidores na presença de corioamnionite histológica, achado presente nas membranas corioamnióticas de expressiva parcela das gestações complicadas por RPM-PT, são escassos.

O objetivo desse estudo é avaliar a expressão das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) e de seus inibidores (TIMP-1 e TIMP-2) e a atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por RPM-PT na presença de corioamnionite histológica.

4. Pacientes e Métodos

4.1. Desenho do estudo e constituição dos grupos

Trata-se de um estudo prospectivo e transversal. Todas as pacientes incluídas no estudo foram atendidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, entre o período de Janeiro de 2010 a Dezembro de 2012. A estimativa do tamanho amostral foi baseada na menor diferença de quantificação relativa da expressão de MMP-9 entre os grupos de estudo e assumindo $\alpha=0.05$ e $\beta=0.20$, estimou-se tamanho amostral mínimo de 20 gestantes em cada um dos grupos de interesse.

A amostra foi constituída por 40 gestantes que apresentaram RPM-PT na presença (n=20) ou ausência (n=20) de corioamnionite histológica. Como grupo

controle, foram incluídas no estudo 37 gestantes que apresentaram Trabalho de Parto Prematuro com bolsa das águas íntegras (TPP) na presença (n=20) e na ausência de corioamnionite (n=17). Todas as pacientes incluídas no estudo evoluíram para parto prematuro como desfecho gestacional em período máximo de 7 dias do diagnóstico inicial.

As membranas corioamnióticas de gestantes que apresentaram diabetes, hipertensão, anomalias fetais congênitas comprovadas, gemelaridade, placenta prévia e infecção urinária ou outras infecções foram excluídas do estudo. A idade gestacional foi avaliada a partir da data da última menstruação e/ou exame ultra-sonográfico precoce (até 20 semanas).

Todas as gestantes envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa, concordaram em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (Protocolo CEP 3438-2010).

4.2. Colheita de membranas corioamnióticas e análise histopatológica

No momento da resolução da gestação, logo após a dequitação, foram colhidas membranas corioamnióticas de todas as pacientes incluídas no estudo. Foram retirados fragmentos de 1 cm² da borda das membranas, que foram armazenados em RNA later® (*RNA Stabilization Reagent*- Ambion) a 10µl/mg de tecido em tubos *eppendorf* de 1,5mL. Os demais fragmentos foram acondicionados em criotubos e posteriormente armazenados a -80°C no Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, UNESP.

O restante da placenta e seus anexos foram pesados, fixados e acondicionados em recipiente apropriado contendo formalina a 10% por 24 horas para fixação.

Fragmentos das membranas corioamnióticas foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol e a seguir incluídos em blocos de parafina. Os blocos obtidos foram seccionados em micrótomo comum, obtendo-se cortes de 5 µm de espessura para montagem em lâminas de vidro. As lâminas foram coradas pelo método clássico de Hematoxilina-Eosina (HE) para a análise histopatológica das membranas segundo os critérios de Yoon et al³⁴.

4.3. PCR em tempo real

Os fragmentos de membranas corioamnióticas coletados conforme descrito no item 4.2. foram submetidos à extração de RNA total utilizando o *Illustra RNAspin Mini Isolation Kit* (GE Healthcare). Para impedir a contaminação do DNA genômico, todas as amostras de RNA foram tratadas com DNase I isenta de RNase (New England Biolabs ®), antes da amplificação. A qualidade e concentração de RNA total extraídos foram medidos com Epoch Spectrophotometer (Biotek®). Amostras de RNA (0.1µg/µL) foram submetidas à transcrição reversa usando a High-Capacity cDNA Archive Kit, seguindo as instruções do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

A partir do cDNA obtido foi efetuada a amplificação dos genes das MMP-2 (Hs01548727_m1), MMP-9 (Hs00234579_m1), TIMP-1 (Hs00171558_m1) e TIMP-2 (Hs00234278_s1) de acordo com o protocolo da *Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays*, em aparelho *Line Gene K* (Bioer®), com uma unidade óptica, que permite a monitorização em tempo real do aumento da concentração do produto da PCR. O número de ciclos limite (CT) é o número de ciclos da PCR, em que a liberação de fluorescência atinge um nível limiar, e foi utilizado para determinar a expressão do RNAm relativa dos genes de interesse utilizando o método $\Delta\Delta CT$. A média dos CT de gestações em TPP na ausência de corioamnionite foi utilizada como calibrador. As

condições da reação foram de 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos compostos por 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os sinais de fluorescência adquiridos nos passos de anelamento e extensão do ciclo de amplificação (60 °C por 1 minuto). Em todos os ensaios, as amostras foram processadas em duplicata e paralelamente, foi realizada a amplificação do gene TBP (*TATA box binding protein*) (Hs9999910_m1) como gene endógeno.

4.4. Western blot

A extração de proteínas totais foi realizada a partir da homogeneização das membranas corioamnióticas em tampão de lise [PBS, 1% (v/v), Nonidet P-40 a 0,5% (w/v), dodecil sulfato sódico (SDS) e inibidor de protease (10µl/mL, Amersham®)]. O sobrenadante foi removido por centrifugação a 1500g por 20 minutos a 4 °C.

A determinação da concentração de proteína total em cada amostra foi realizada utilizando o *BCA Protein Assay kit* (Bio-Rad) e albumina de soro bovino (BSA) como curva padrão. Quantidades idênticas de proteínas (50 µg) foram desnaturadas em água fervente por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 10%, sob voltagem constante de 200V e em condições redutoras.

O gel foi colocado em contato direto com *Hybond-P membrane* (Amerham Biosciences, GE Healthcare LTD, Chalfont ST. Giles, Bukes, UK) em aparelho apropriado (Bio-Rad Laboratories®) e submetido à *eletroblotting* para transferência das bandas para a membrana. Após a transferência, foi realizado o bloqueio dos sítios livres da membrana com solução de PBS-T contendo leite desnatado na concentração de 5%, durante 40 minutos, à temperatura ambiente e agitação constante. Após três lavagens da membrana com PBS-T por 5 minutos, foi realizada incubação com o anticorpo primário anti-MMP-2, anti-MMP-9, anti-TIMP-1, anti-TIMP-2 e anti-β-actina (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), na diluição 1:1000, a 4°C, com agitação constante, *overnight*.

As membranas foram então lavadas com PBS-T e incubadas com o anticorpo secundário IgG anti-mouse conjugado à peroxidase (diluição 1/5000) (SAB Signalway Antibody) por duas horas a temperatura ambiente em agitação constante. A revelação foi realizada com reagente quimioluminescente ECL (Amersham) segundo instruções do fabricante. O sinal foi capturado utilizando-se aparelho *Alpha Innotech FluorChem® FC2 Imager* e analisados através da densidade óptica pelo programa Image J.

4.5. Zimografia

Alíquotas de 50µg de proteínas obtidas conforme descrito no item 4.4. foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% copolimerizado com 0,1% de gelatina na presença de SDS sob condições não redutoras. Depois da eletroforese, os géis foram lavados duas vezes por 15 minutos em uma solução de 2,5% de Triton X-100 para remover o SDS. Posteriormente, os géis foram incubados por 18 horas em solução tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,4, contendo 10mM CaCl₂ e 1µM de ZnCl₂ a 37°C. Ao final, os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* por 30 minutos e descorados por 10 minutos com solução descorante (metanol 30%, ácido acético 10%). As áreas de proteólise foram visualizadas como bandas claras contra um fundo escuro. A atividade gelatinolítica das bandas da MMP-2 e MMP-9 foram analisadas através da densidade óptica pelo programa Image J.

4.6. Análise Estatística

Os dados sócio-demográficos e gestacionais das pacientes incluídas no estudo foram submetidos ao Teste Exato de Fisher. Os dados de concentração relativa de RNA mensageiro, a expressão proteica e atividade proteolítica das metaloproteinases e de seus inibidores foram submetidos aos testes de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis de acordo com a comparação entre dois ou mais grupos. O nível de significância adotado

5.2. MMP-9

A quantificação relativa da expressão gênica de MMP-9 está representada na Tabela 2 e na Figura 1. Todas as membranas corioamnióticas incluídas no estudo expressaram MMP-9 e no grupo RPM-PT a quantificação relativa de MMP-9 se apresentou significativamente aumentada em relação ao grupo TPP (Tabela 2, $p < 0.009$). Considerando o *status* de corioamnionite, no grupo RPM-PT na presença de corioamnionite, a expressão de MMP-9 foi estatisticamente superior comparado ao grupo RPM-PT livre do infiltrado inflamatório. Da mesma forma, a expressão relativa de MMP-9 foi estatisticamente superior no grupo TPP na presença de corioamnionite quando comparado à ausência de corioamnionite (Figura 1A).

A quantificação proteica de MMP-9 está representada na Tabela 2 e Figura 1. A expressão proteica de MMP-9 foi verificada em todas as amostras de membranas corioamnióticas incluídas no estudo e no grupo RPM-PT se apresentou significativamente aumentada em relação ao grupo TPP (Tabela 1, $p = 0.001$). Considerando o *status* de corioamnionite, no grupo RPM-PT na presença de corioamnionite a expressão proteica foi estatisticamente superior quando comparado com o grupo RPM-PT na ausência de corioamnionite. Ainda na presença de corioamnionite, a expressão proteica dessa MMP esteve significativamente aumentada no grupo RPM-PT em relação ao grupo TPP. No grupo TPP não houve diferença na expressão proteica de MMP-9 em relação ao *status* de corioamnionite (Figura 1B).

A atividade proteolítica de MMP-9 está representada na Tabela 2 e na Figura 1. De forma similar à expressão gênica e proteica, a atividade enzimática de MMP-9 foi observada em todas as membranas corioamnióticas incluídas no estudo. A atividade proteolítica de MMP-9 no grupo RPM-PT esteve significativamente aumentada em relação do grupo TPP (Tabela 1, $p = 0,001$). Nas membranas corioamnióticas dos grupos RPM-PT e TPP, na presença de corioamnionite, a atividade enzimática de MMP-9 foi

estatisticamente superior quando comparado com membranas na ausência do infiltrado inflamatório. Ainda na presença de corioamnionite, a atividade enzimática de MMP-9 esteve significativamente aumentada no grupo RPM-PT em relação ao grupo TPP (Figura 1C).

Tabela 2. . Expressão gênica, proteica de MMP-9 e de TIMP-1 e atividade proteolítica da MMP-9 membranas corioamnióticas de gestações complicadas por RPM-PT e TPP.

	RPM-PT	TPP	p	RPM-PT	TPP	p
Expressão gênica	1,782 (0,0232 – 1673,903)	0,486 (0,000237 – 5,934)	0.009	0,595 (0,145 – 2,454)	0,697 (0,00152 – 18,441)	0,296
Expressão proteica	2,606 (1,017 – 5,185)	1,683 (0,250 – 2,865)	0.001	0,689 (0,0473 – 1,914)	0,872 (0,112 – 2,987)	0,340
Atividade proteolítica	1,224 (0,0623 – 7,579)	0,503 (0,0513 – 12,737)	0.001	-	-	-

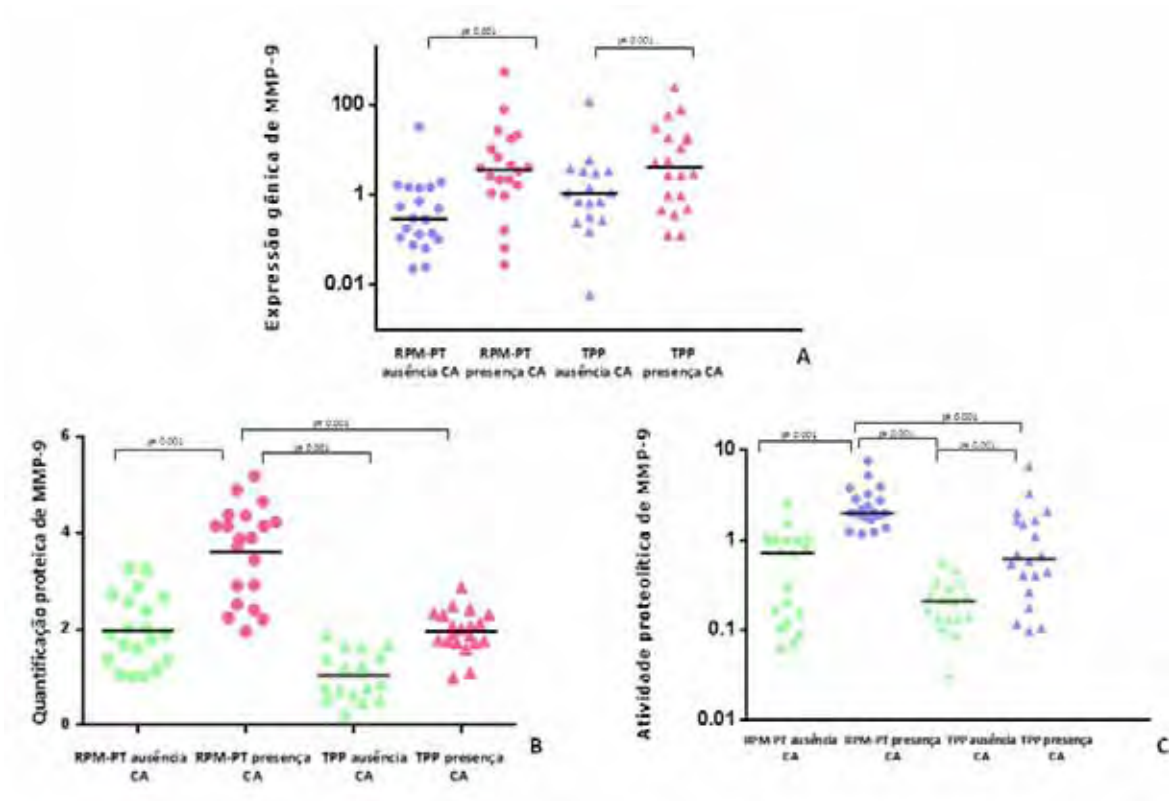


Figura 1. A: Quantificação relativa da expressão gênica de metaloproteinase 9 (MMP-9) nas membranas corioamnióticas. Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. B: Quantificação proteica de MMP-9 nas membranas corioamnióticas. Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. C: Atividade proteolítica de MMP-9 nas membranas corioamnióticas. Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. RPM-PT: Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo; TPP: Trabalho de Parto Prematuro; CA: Corioamnionite histológica.

5.3. TIMP-1

A quantificação relativa da expressão gênica e da proteica de TIMP-1 está representada na Tabela 2 e na Figura 2. Todas as membranas corioamnióticas expressaram TIMP-1 e não houve diferença estatisticamente significativa na expressão gênica e proteica entre os grupos estudados, independente do *status* de corioamnionite histológica.

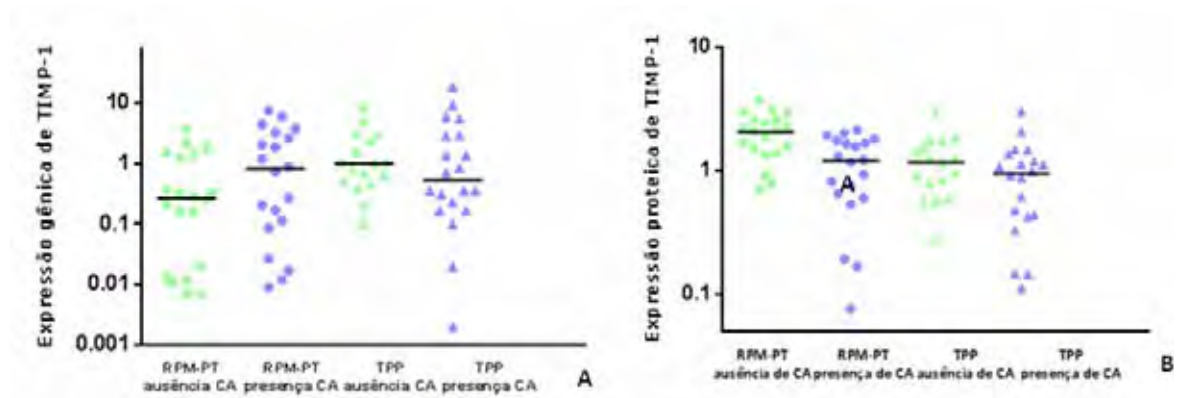


Figura 2. **A:** Quantificação relativa da expressão gênica de TIMP-1 nas membranas corioamnióticas. **B:** Quantificação proteica de TIMP-1 nas membranas corioamnióticas. RPM-PT: Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo; TPP: Trabalho de Parto Prematuro; CA: Corioamnionite histológica.

5.4. Relação MMP-9/TIMP-1

A relação entre a atividade proteica MMP-9/TIMP-1 nas membranas corioamnióticas está representada na Figura 3. A relação nos grupos RPM-PT, RPM-PT e corioamnionite, TPP e TPP e corioamnionite foi de 0,711, 2,367, 0,234, 1,617 respectivamente. Podemos observar que a relação MMP-9/TIMP-1 em favor a atividade de MMP-9 foi maior nos grupos RPM-PT e TPP na presença corioamnionite histológica.

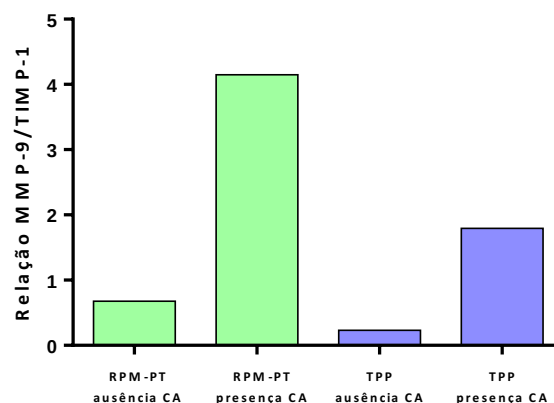


Figura 3. Relação entre a atividade proteica MMP-9/TIMP-1. RPM-PT em membranas corioamnióticas: Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo; TPP: Trabalho de Parto Prematuro; CA: corioamnionite histológica.

5.5. MMP-2

A quantificação relativa de expressão gênica, proteica e atividade proteolítica de MMP-2 estão representadas na Tabela 3 e na Figura 4. Todas as membranas corioamnióticas apresentaram expressão gênica e proteica de MMP-2 além de atividade proteolítica, porém não houve diferença estatisticamente significativa nas expressões e na atividade de MMP-2 entre os grupos estudados, independente do *status* de corioamnionite histológica.

Tabela 3. . Expressão gênica, proteica de MMP-2 e de TIMP2 e atividade proteolítica da MMP-2 membranas corioamnióticas de gestações complicadas por RPM-PT e TPP.

	RPM-PT	TPP	P	RPM-PT	TPP	P
Expressão gênica	1,391 (0,0598 – 21,506)	1,229 (0,105 – 7,765)	0,585	1,086 (0,126 – 3,793)	1,040 (0,0316 – 9,795)	0,282
Expressão proteica	1,319 (0,546 – 2,200)	1,559 (0,433 – 3,806)	0,108	1,065 (0,0871 – 3,532)	0,734 (0,155 – 4,967)	0,310
Atividade proteolítica	0,294 (0,0431 – 1,930)	0,503 (0,0431 – 1,930)	0,395	-	-	-

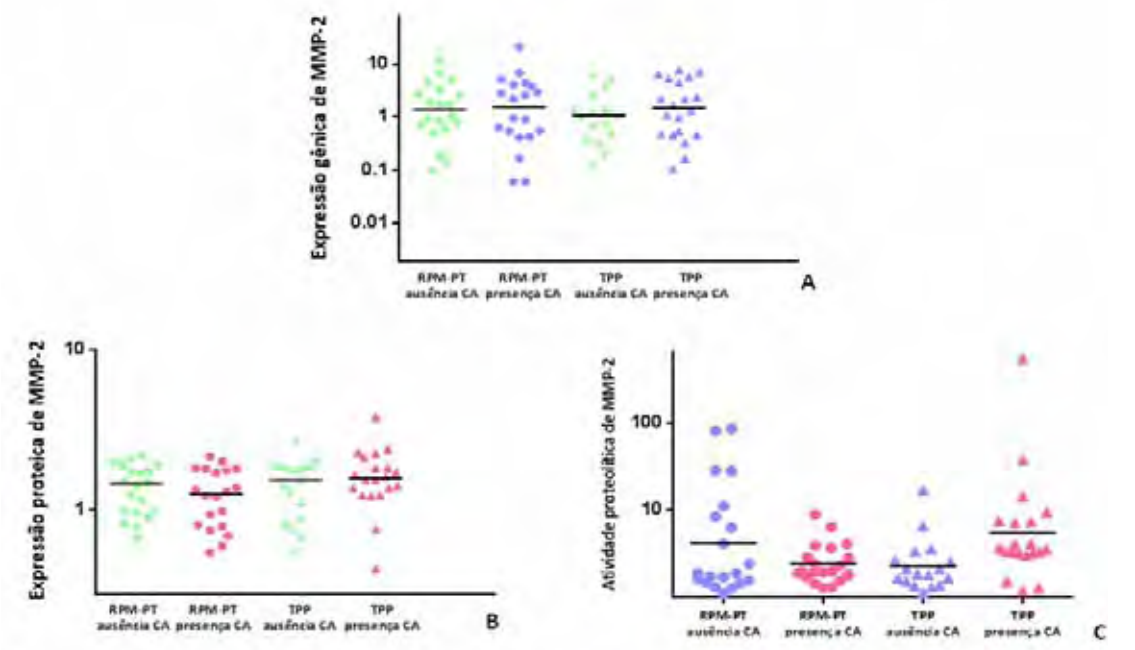


Figura 4. A: Quantificação relativa de expressão gênica de metaloproteinase 2 (MMP-2) nas membranas corioamnióticas. B: Quantificação proteica de MMP-2 nas membranas corioamnióticas. C: Atividade proteolítica de MMP-2 nas membranas

corioamnióticas. RPM-PT: Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo; TPP: Trabalho de Parto Prematuro; CA: Corioamnionite histológica.

5.6. TIMP-2

A quantificação relativa da expressão gênica e proteica de TIMP-2 estão representadas na Tabela 3 e Figura 5. Todas as membranas corioamnióticas apresentaram expressão gênica e proteica de TIMP-2 e não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, independente do *status* de corioamnionite histológica.

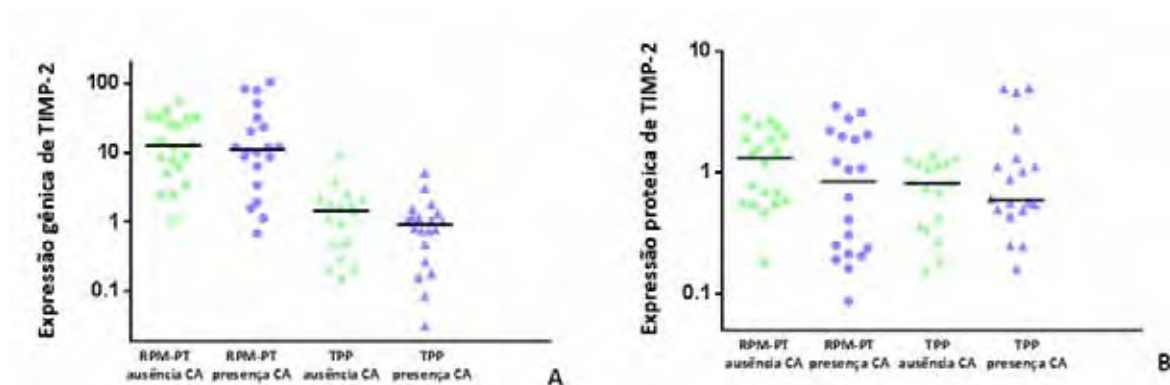


Figura 5. A: Quantificação relativa da expressão gênica de TIMP-2 nas membranas corioamnióticas. B: Quantificação proteica de TIMP-2 nas membranas corioamnióticas. RPM-PT: Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo; TPP: Trabalho de Parto Prematuro; CA: Corioamnionite histológica.

5.7. Relação MMP-2/TIMP-2

A relação entre a expressão proteica MMP-2/TIMP-2 nas membranas corioamnióticas está representada na Figura 6. A relação nos grupos RPM-PT, RPM-PT e corioamnionite, TPP e TPP e corioamnionite foi de 2,622, 3,049, 2,902, 2,555 respectivamente. A relação MMP-2/TIMP-2 mostrou-se semelhante ao de controle endógeno com padrão de expressão constitutiva.

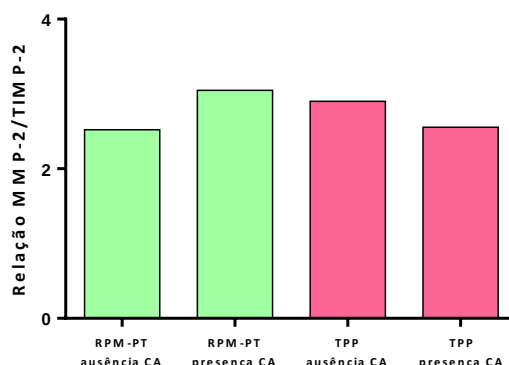


Figura 6. Relação entre a atividade proteica MMP-2/TIMP-2. RPM-PT: Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo; TPP: Trabalho de Parto Prematuro; CA: corioamnionite histológica.

5.8. Discussão

Durante a gestação, o feto é provido por regulações imunológicas e endócrinas garantidas pelas membranas corioamnióticas, que pelo mecanismo de regulação da MEC garante seu funcionamento ao longo da gestação. As membranas corioamnióticas devem permanecer intactas durante toda a gestação e rompida, seja naturalmente ou artificialmente, somente no momento do parto³⁵.

A rotura das membranas fetais em gestações pré-termo é comumente identificada como principal causa da ocorrência do parto prematuro⁸. Muitas evidências sugerem associação entre invasão microbiana da cavidade amniótica e a ocorrência desta intercorrência gestacional^{7,37,38}. Membranas corioamnióticas são ricas em colágeno, o qual fornece arquitetura estrutural adequada para suportar a pressão da cavidade amniótica durante a evolução da gestação. A atividade colagenolítica com diminuição no conteúdo de colágeno tem sido documentada durante as últimas semanas de gestação³⁹. Similarmente, a redução no conteúdo de colágeno da MEC e o enfraquecimento das membranas têm sido considerados como uma das causas de RPM-PT. A degradação enzimática da matriz, decorrente de infecção ascendente do trato

genital inferior é um dos fatores que contribuem para a RPM-PT associada à inflamação²⁸. Além disso, respostas imunológicas mediadas por células maternas e fetais e liberação de enzimas que degradam a MEC das membranas fetais e outras células placentárias podem ser responsáveis pela RPM-PT associada à infecção⁴⁰.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a expressão gênica de MMP-9 está significativamente elevada em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por corioamnionite histológica quando comparadas às membranas livres de infiltrado inflamatório, independente do desfecho gestacional, seja na RPM-PT ou no TPP.

À expressão proteica, observou-se aumento estatisticamente significativo de MMP-9 no grupo RPM-PT na presença de corioamnionite quando comparado com os grupos RPM-PT na ausência do infiltrado inflamatório e TPP independente do *status* da corioamnionite. Em relação à atividade proteolítica, nas membranas corioamnióticas dos grupos RPM-PT e TPP, na presença de corioamnionite, a atividade enzimática de MMP-9 foi estatisticamente superior quando comparado com membranas na ausência do infiltrado inflamatório. Ainda na presença de corioamnionite, a atividade enzimática esteve de MMP-9 esteve significativamente aumentada no grupo RPM-PT em relação ao grupo TPP.

É conhecido que a MMP-9 não é normalmente detectada no líquido amniótico durante estágios iniciais da gestação embora sua produção e liberação possam ser induzidas pelo trabalho de parto ou pela presença de infecção⁴¹. Athayde et al.⁴² relataram que gestantes com RPM-PT apresentaram concentrações mais elevadas de MMP-9 no líquido amniótico e propuseram que esse aumento no líquido amniótico estaria relacionado ao aumento da produção nas membranas fetais. Nesse sentido,

Fortunato et al.⁴³ também relataram aumento na concentração de MMP-9 no líquido amniótico de gestantes com RPM-PT quando comparado com gestantes de termo.

Estudos prévios demonstraram também que a atividade MMP-9 em membranas fetais está marcadamente aumentada no momento do parto, tanto em gestações de termo quanto em gestações pré-termo^{44,45}. Outros estudos demonstraram expressão aumentada de MMP-9 em membranas corioamnióticas de gestações de termo com bolsa rota, quando comparadas com membranas de termo com bolsa íntegra^{46,27,47,48}, sugerindo que esses partos, em parte, possuem similar processo de rotura das membranas, na qual, o aumento de MMP-9 é um processo bioquímico importante^{46,27,47,48}.

Diferentes evidências têm sugerido que a infecção intrauterina causada pela infecção ascendente leva ao desequilíbrio da relação MMPs/TIMPs, resultando em aumento da atividade enzimática da MMP-9, favorecendo a degradação dos diferentes elementos das membranas fetais^{45,43}. A expressão de MMP-9 tem sido observada em membranas corioamnióticas de gestantes com infecção bacteriana confirmada, sugerindo possível papel desta enzima na infecção da cavidade amniótica e na rotura prematura das membranas fetais.

Experimentos *in vitro* têm demonstrado que lipopolissacarídeo pode estimular a expressão e liberação de MMP-9 em membranas fetais de gestantes em trabalho de parto. Similarmente Draper et al⁴⁹. observaram aumento na atividade enzimática de MMP-9 em gestantes com RPM.

Assim, os resultados obtidos no presente estudo corroboram os achados da literatura em relação à atividade de MMP-9, com expressão significativamente elevada na presença de corioamnionite, independentemente do desfecho gestacional.

Em relação à MMP-2, enzima constitutivamente expressa pelo âmnio durante a gestação^{22,50}, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos

estudados, na ausência ou na presença de corioamnionite, tanto na análise de expressão gênica quanto na avaliação da expressão proteica e atividade enzimática. A análise da relação MMP-2/TIMP-2 demonstrou padrão de expressão que se assemelha a de um controle endógeno.

Segundo Maymon et al.⁴⁶ as membranas corioamnióticas são fontes naturais de MMP-2 e embora seja constitutivamente expressa²⁶ e com participação na remodelação tecidual programada durante a gestação controlada pelo equilíbrio na relação MMP/TIMP²², têm sido atribuída a esta MMP a função de mediadora essencial na degradação da matriz extracelular das membranas fetais em condições normais no final da gestação, e no cenário que precede o início do trabalho de parto, atuando sincronicamente com o amadurecimento cervical e a atividade aumentada do miométrio, permitindo a ocorrência do parto^{26,50}.

Quanto aos TIMPs, não observamos diferença estatística significativa na expressão de ambos os genes entre os grupos estudados, independente da presença de corioamnionite histológica. Com relação ao TIMP-2, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão proteica desse inibidor. Do mesmo modo não observamos diferença estatística significativa tanto na expressão gênica quanto na expressão proteica de TIMP-1. Ambos os resultados são discordantes com os encontrados na literatura^{42,43}. Segundo Fortunato et al.⁴³ os níveis de TIMP-1 encontravam-se elevados no líquido amniótico de gestantes portadoras de RPM-PT quando comparadas a gestantes de termo ou em TPP, enquanto níveis de TIMP-2 estiveram diminuídos em mulheres com RPM-PT. Nesse sentido Athayde et al.⁴² descreveram que a concentração de TIMP-1 foi mais elevada nas gestantes com infecção da cavidade amniótica associada com TPP quando comparada à RPM-PT.

Em relação a esses resultados temos que considerar que os estudos realizados por Fortunato et al.⁴³ e Athayde et al.⁴² avaliaram concentrações de TIMPs no líquido amniótico e utilizando a técnica de ELISA. No presente estudo, a expressão gênica dos TIMPs foi avaliada nas membranas corioamnióticas e o alvo foi o RNAm. Uma possível interpretação para esses resultados é que existe uma diferença temporal entre a síntese de RNAm e a expressão de proteína, sendo que esta possui uma meia-vida maior que o seu RNAm.

Com relação ao desequilíbrio entre MMP-9/TIMP-1, observamos que esteve a favor à atividade da MMP-9 nos grupos RPM-PT na presença de corioamnionite histológica, estando de acordo com os achados descritos na literatura que demonstram que o aumento da proteína e atividade de MMP-9 nas membranas fetais, placenta e líquido amniótico está associado com a rotura das membranas no parto pré-termo e termo e descolamento da placenta do tecido materno, sugerindo assim o papel da MMP-9 associada ao trabalho de parto^{25,26,5152}. No mesmo sentido Fortunato⁵³ afirma que a expressão de MMP-9 é induzida pelo trabalho de parto ativo, infecção ou RPM. Para Vadillo-Ortega & Gutiérrez⁵⁰, a perda da homeostase da MEC parece ser o evento chave na etiologia da RPM-PT. Nesse mesmo sentido, Fortunato et al.⁴³ descrevem que o desequilíbrio entre MMP/TIMP pode degradar as membranas corioamnióticas e outros componentes da MEC resultando na RPM-PT. Para Zaga-Clavellina et al.⁵⁴, a infecção das membranas corioamnióticas com *Escherichia coli* induz aumento na secreção de formas ativas de MMP-2 e MMP-9 sem mudanças na expressão de seus inibidores, explicando as significantes alterações na continuidade estrutural das membranas.

Considerando os resultados obtidos no presente estudo podemos confirmar o papel do desequilíbrio da razão MMP-9/TIMP-1 como mecanismo importante na fisiopatogênese da RPM-PT associado à corioamnionite histológica.

Referências*

1. Lee T, Silver H. Etiology and epidemiology of preterm premature rupture of the membranes. *Clin Perinatol* 2001;28:721-34.
2. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 178-93.
3. Tanir HM, Sener T, Tekin N, Aksit A, Ardic N. Preterm premature rupture of membranes and neonatal outcome prior to 34 weeks of gestation. *Int J Gynecol Obstet* 2003; 82: 167-72.
4. Poletti J, Peraçoli JC, Candeias JMG, Araújo Júnior JP, Silva MG. Inflammatory cytokine mRNA detection by real time PCR in chorioamniotic membranes from pregnant women with preterm premature rupture of membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 144:27-31.
5. Mercer BM, Goldenberg RL, Meis PJ, Moawad AH, Shellhaas C, Das A, et al. The Preterm Prediction Study: prediction of preterm premature rupture of membranes through clinical findings and ancillary testing. The National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:738-45.
6. Shubert PJ, Diss E, Iams JD. Etiology of preterm premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1992; 19:251-63.
7. Naeye RL, Peters EC. Causes and consequences of premature rupture of membranes. *Lancet* 1980; 1:192-4.
8. Romero M, Mazor M. Infection and preterm labor. *Clin Obstet Gynecol* 1988; 31:553-84.
9. Asrat T. Intra-amniotic infection in patients with preterm prelabor rupture of membranes. Pathophysiology, detection, and management. *Clin Perinatol* 2001; 28:735-51.
10. Naeye RL, Ross SM. Amniotic fluid infection syndrome. *Clin Obstet Gynaecol* 1982; 9:593-607.
11. Minkoff H. Prematurity: infection as an etiologic factor. *Obstet Gynecol* 1983; 62:137-44.
12. Romero R, Mazor M, Wu YK, Sirtori M, Oyarzun E, Mitchell MD, Hobbins JC. Infection in the pathogenesis of preterm labor. *Semin Perinatol* 1988; 12:262-79.
13. Ledger WJ. Infection and premature labor. *Am J Perinatol* 1989; 6:234-6.
14. Gibbs RS, Romero R, Hillier SL, Eschenbach DA, Sweet RL. A review of premature birth and subclinical infection. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166:1515-28.
15. Brocklehurst P. Infection and preterm delivery. *BMJ* 1999; 318:548-9.
16. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000; 342: 1500-7.
17. Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002; 8:3-13.
18. Hirsch E, Wang H. The molecular pathophysiology of bacterially induced preterm labor: insights from the murine model. *J Soc Gynecol Investig* 2005; 12:145-55.

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

19. Yoon BH, Romero R, Moon JB, Shim SS, Kim M, Kim G, Jun JK. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185:1130–6.
20. Kim KW, Romero R, Park HS, Park CW, Shim SS, Jun JK, Yoon BH. A rapid matrix metalloproteinase-8 bedside test for the detection of intraamniotic inflammation in women with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197:292–5.
21. Kierszenbaum AL. *Histologia e Biologia celular: uma introdução à patologia*. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.
22. Hay ED. Extracellular matrix. *J Cell Biol* 1981; 9:205s – 23s.
23. Yonemoto H, Young CB, Ross JT, Guilbert LL, Fairclough RJ, Olson DM. Changes in matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the fetal amnion and chorion during gestation and at term and preterm labor. *Placenta* 2005; 27: 669-77.
24. French JL, McGregor JA. The pathobiology of premature rupture of membranes. *Semin Perinato* 1996; 20:344-68.
25. Bryant-Greenwood GD, Yamamoto SY. Control of peripartal collagenolysis in the human chorion-decidua. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159: 99-106.
26. Lei H, Vadillo-Ortega F, Paavola LG, Strauss JF. 92-kDa gelatinase (matrix metalloproteinase-9) is induced in rat amnion immediately prior to parturition. *Biol Reprod* 1995; 53:339-44.
27. Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Furth EE, Lei H, Muschel RJ, Stetler-Stevenson WG, Strauss. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 1995; 146:148-56.
28. Vadillo-Ortega F, Hernandez A, Gonzalez-Avila G, Bermejo L, Iwata K, Strauss JF. Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 1996; 174:1371-6.
29. Halaburt JT, Uldbjerg N, Helming R, Ohlsson K. The concentration of collagen and collagenolytic activity in the amnion and the chorion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1989; 31:75-82.
30. Snoek-van Beurden PAM, Von de Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* 2005; 38:73-83.
31. Waterhouse P, Denhardt DT, Khokha R. Temporal expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in mouse reproductive tissues during gestation. *Mol Reprod Dev* 1993; 35:219-26.
32. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Expression of a progelatinase activator (MT1-MMP) in human fetal membranes. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39: 316-22.
33. Riley SC, Leask R, Denison FC, Wisely K, Calder AA, Howe DC. Secretion of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by human fetal membranes, deciduas and placenta at parturition. *J Endocrinol* 1999; 162: 351-9.
34. Locksmith GJ, Clark P, Duff P, Schutz GS. Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 levels in women with preterm labor and suspected intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol* 1999; 94: 1-6.

35. Yoon BH, Romero R, Kim CJ, Jun JK, Gomez R, Choi JH, et al. Amniotic fluid interleukin-6: a sensitive test for antenatal diagnosis of acute inflammatory lesions of preterm placenta and prediction of perinatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:960-70.
36. Parry S, Strauss JF. Mechanisms of diseases: premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998; 338:663-70.
37. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92:827-39.
38. Romero R, Gomez R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Edwin SS, et al. A fetal systemic inflammatory response is followed by the spontaneous onset of preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179:186-93.
39. Gomez R, Romero R, Chezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 194-202.
40. Bou-Resli MN, Al-Zaid NS, Ibrahim ME. Full-term and prematurely ruptured fetal membranes: an ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 1981; 220:758-70.
41. Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101:375-86.
42. Lei H, Furth EE, Kalluri E. A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in amnion before the onset of labor. *J Clin Invest* 1996; 98:1971-8.
43. Athayde N, Romero R, Gomez R, Maymon E, Pacora P, Mazor M, et al. Matrix metalloproteinases-9 in preterm and term human parturition. *J Matern Fetal Med* 1999; 8:213-9.
44. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. MMP/TIMP imbalance in amniotic fluid during PROM: an indirect support for endogenous pathway to membrane rupture. *J Perinat Med* 1999; 27:362-8.
45. Gomez R, Ghezzi F, Romero R, Muñoz H, Tolosa JE, Rojas I. Premature labor and intra-amniotic infection. Clinical aspects and role of the cytokines in diagnosis and pathophysiology. *Clin Perinatol* 1995; 22:281-342.
46. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Amniochorion gelatinase-gelatinase inhibitor imbalance in vitro: a possible infectious pathway to rupture. *Obstet Gynecol* 2000; 95:240-4.
47. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Gomez R, Edwin SS, et al. Evidence *in vivo* differential bioavailability of the active forms of metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:887-94.
48. Choi S, Jung K, Oh S, Kim J, Roh C. Cervicovaginal matrix metalloproteinase-9 and cervical ripening in human term parturition. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 142:43-7.
49. Lu D, Wang ZX, Wang XL, Gu XW, Wang YX, Fu D. Clinical significance of metalloproteinase-9/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase1 imbalance in

maternal serum, amniotic fluid, umbilical cord serum in patients with premature rupture of the membranes. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2006; 41:20-4.

50. Draper D, McGregor J, Hall J, Jones W, Beutz M, Heine RP, et al. Elevated protease activities in human amnion and chorion correlate with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173:1506-12.
51. Vadillo-Ortega F, Estrada-Gutiérrez G. Role of matrix metalloproteinases in preterm labour. *BJOG* 2005; 112: 19-22.
52. Xu P, Alfaidy N, Challis JR. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1353-61.
53. McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased concentration of pro-matrix metalloproteinase 9 in term fetal membranes overlying the cervix before labor: implications for membrane remodeling and rupture. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182:409-16.
54. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Collagenolytic enzymes (gelatinases) and their inhibitors in human amniochorionic membrane. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177:731-41.
55. Zaga-Clavelina V, Garcia-Lopez, Flores-Pliego A, Merchant-Larios, Vadillo-Ortega F. In vitro secretion and activity profiles of matrix metalloproteinases, MMP-2 and MMP-9, in human term extra-placental membranes after exposure to *Escherichia coli*. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9:13.

Capítulo III
Artigo científico II

Determinação do índice apoptótico membranas corioamnióticas de gestações complicadas por Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo

Ana Carolina Pereira¹, Laura Fernandes Martin¹, Natália Prearo Moço¹, Bruna Ribeiro de Andrade Ramos¹, José Carlos Peraçoli², Márcia Guimarães da Silva^{1*}

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

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

1. Resumo

Introdução: Estudos têm sugerido associação entre a apoptose e a rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT), com resultados conflitantes nos casos complicados por corioamnionite histológica. **Objetivo:** Avaliar o índice apoptótico em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por RPM-PT na presença de corioamnionite histológica. **Pacientes e Métodos:** Foram incluídas no estudo 20 gestantes que apresentaram RPM-PT na presença ou não de corioamnionite histológica. Como grupo controle, foram incluídas no estudo 20 gestantes que apresentaram Trabalho de Parto Prematuro com bolsa das águas íntegras (TPP) na presença ou não de corioamnionite histológica. Todas as pacientes envolvidas no estudo foram atendidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, no período de Janeiro de 2010 a Dezembro de 2012. As membranas corioamnióticas foram coletadas imediatamente após a dequitação da placenta e em seguida transportadas ao Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, UNESP. Fragmentos das membranas corioamnióticas foram encaminhados à análise histopatológica. Cortes parafinizados foram submetidos à técnica de TUNEL para a quantificação do índice apoptótico em todas as membranas fetais. Os dados sócio-demográficos e gestacionais das pacientes incluídas no estudo foram submetidos ao Teste Exato de Fisher e os dados do índice apoptótico nas membranas corioamnióticas foram submetidos ao teste de χ^2 . O nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5%. **Resultados:** As variáveis estado civil, etnia, tabagismo, tipo de parto, paridade, idade gestacional no momento do parto e intercorrências gestacionais anteriores não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos estudados ($p>0,05$), apenas a variável idade materna foi estatisticamente maior no grupo RPM-PT na presença de corioamnionite quando comparado com o grupo em TPP na presença de corioamnionite histológica. Núcleos apoptóticos foram observados em todas as amostras incluídas no estudo, incluindo células amnióticas, coriônicas e decíduais, com expressiva marcação no epitélio amniótico. O índice apoptótico nos grupos RPM-PT na ausência de corioamnionite, RPM-PT na presença de corioamnionite, TPP na ausência de corioamnionite e TPP na presença de corioamnionite foi de: 81,9%, 88,4%, 27,2% e 48,7% respectivamente. O índice apoptótico se apresentou significativamente aumentado no grupo RPM-PT em relação ao grupo TPP ($p<0,001$). Considerando o *status* de corioamnionite, o índice apoptótico foi significativamente superior no grupo RPM-PT na presença de corioamnionite quando comparado com os grupos em TPP independente da presença ou não de corioamnionite. **Conclusão:** A apoptose é um processo associado à RPM-PT na presença de corioamnionite histológica.

2. Abstract

Background: Several studies point out to the association between apoptosis and preterm premature rupture of membranes (pPROM) but cases complicated by histologic chorioamnionitis reveal conflicting results. **Aim:** To evaluate the apoptotic index in chorioamniotic membranes from pPROM pregnancies in the presence of histologic chorioamnionitis (CAM). **Patients and Methods:** We included in the study 20 pregnant women

that presented with pPROM in the presence or absence of CAM. The control group comprised 20 patients that presented with preterm labor (PL) and intact membranes in the presence or absence of CAM. All patients included were seen at the Obstetrical Unit Care of Botucatu Medical School, UNESP between January 2010 and December 2012. Fragments of amniotic membranes were collected immediately after labor and transported to the laboratory for histological analysis. Paraffined tissue slices were submitted to TUNEL to measurement of the apoptotic index. Socio demographic and gestational data were submitted to Fisher's exact test. Apoptotic index data were submitted to χ^2 test. A p-value < 0.05 was considered significant. **Results:** Marital status, ethnicity, smoking habits, mode of delivery, parity, gestational age at delivery and previous history of pregnancy complications showed no difference between the groups ($p>0.05$). Maternal age was higher in pPROM group compared to PL group, both in the presence of CAM. Apoptotic nuclei were observed among every sample in chorionic cells, decidual cells and especially amniotic cells. Apoptotic index for pPROM in the absence of CAM, pPROM in the presence of CAM, PL in the absence of CAM and PL in the presence of CAM was 81.9%, 88.4%, 27.2% and 48.7% respectively. Apoptotic index was higher in pPROM group compared to PL group ($p<0.001$). Regarding the chorioamniotic status, apoptotic index was higher in pPROM in the presence of CAM group compared to PL group regardless the presence or absence of CAM. **Conclusion:** Apoptosis is an event associated to pPROM in the presence of histologic chorioamnionitis.

3. Introdução

Fisiologicamente o final da gestação é marcado pela início das contrações uterinas e a rotura espontânea das membranas é um acontecimento normal durante o trabalho de parto. A rotura das membranas quando precede o início do trabalho de parto é denominada de rotura prematura de membranas (RPM). Sua ocorrência em idade gestacional inferior a 37 semanas caracteriza a rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT)^{1,2}.

A incidência de RPM ocorre em cerca de 9,0% das gestações³ variando de 2%¹ a 4,6%⁴ das gestações pré-termo, e está associada com aumento da morbidade materna e da morbimortalidade perinatal⁴⁻⁸.

A etiologia da RPM é multifatorial, e incluem fatores sócio-econômicos⁹⁻¹¹, *stress* psico-social^{9,11-14}, comportamentos de risco^{9,11,13,14}, infecção materna^{12,15}, raça^{9,10,13,16,17} e fatores genéticos^{17,18}. No entanto, ascensão bacteriana, do trato genital inferior para as membranas corioamnióticas e decídua, está associada com mais de 50% dos casos de RPM-PT¹⁵.

A RPM pode resultar de vários mecanismos, incluindo enfraquecimento fisiológico associado a apoptose nos períodos próximos ao parto¹⁹ e a produção de proteases bacterianas e humanas e degradação da matriz extracelular (MEC)²⁰. A ascensão transcervical de micro-organismos para as membranas corioamnióticas, seguida da ativação da resposta inflamatória e do desencadeamento da cascata de produção de citocinas e indução de apoptose²⁰ é um dos mecanismos chave que predispõe à RPM.

A apoptose, processo de morte celular programada, tem demonstrado desempenhar importante papel na RPM-PT²¹. As células submetidas a apoptose exibem condensação da cromatina, fragmentação do núcleo e formação de corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por outras células sem desencadear reação inflamatória²².

A apoptose é um processo ativo, pelo qual células anormais ou não necessárias são eliminadas para a manutenção da homeostase²³ e pode atingir todos os tipos de células da placenta²⁴. A apoptose pode estar envolvida na regulação de diversos tecidos reprodutivos incluindo útero²⁵, ovário²⁶, placenta²⁴ e membranas fetais²⁷. Dependendo do estímulo, a apoptose pode ser iniciada por dois caminhos conhecidos, intrinsecamente, ou seja, pela via mitocondrial, ou extrinsecamente mediado pelos receptores da morte, tais como Fas, também chamado de CD95 ou Apo-1, TNF-R1 (CD120), receptor de morte 3 (APO-3/WSL-1/TRAMP/LARD), TRAIL-R1 (receptor de morte 4), TRAIL-2 (receptor de morte 5/TRICK2) receptor de morte 6, EDAR e NGFR ou em resposta a estímulos exógenos assim como as citocinas²⁸. Numerosos sinais incluindo a retirada de fatores de crescimento, radicais livres, perturbações

metabólicas e do ciclo celular, radiação e ativação de receptores, resultam em morte celular²⁸. A apoptose é induzida por uma cascata de eventos moleculares que podem ser iniciados de modos distintos, culminando na ativação das caspases²⁹. As caspases são as executoras centrais no processo de apoptose^{30,31} e pertencem à família de cisteínas proteases que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato. São sintetizadas como precursores inativos, zimogênios³¹, que após sinal de morte celular, são ativadas por clivagem proteolítica³². Diversos marcadores têm sido utilizados, para identificar a apoptose, incluindo a viabilidade celular, aparecimento de núcleos apoptóticos, citocromo c, liberação de proteínas nuclear, ativação de caspase-3, clivagem da ribose polimerase e fragmentação do DNA³³.

Muitas evidências sugerem que a ativação das metaloproteinases e degradação das membranas são desencadeadas por sinais apoptóticos³⁴⁻³⁶. Fortunato et al³⁷. sugerem que a apoptose pode predispor a indução e ativação do gene MMP-2 conduzindo à RPM.

Estudos têm sugerido associação entre a apoptose e a RPM-PT³⁵⁻³⁸, com pouco conhecimento nos casos complicados por corioamnionite³⁹⁻⁴². Nesse cenário inflamatório, George et al.³⁹, empregando a técnica de TUNEL, avaliaram 30 gestações complicadas por RPM-PT e concluíram que a apoptose está acelerada nas células coriônicas de membranas com corioamnionite. Em outros estudos conduzidos por Kataoka et al.⁴⁰ e por Murtha et al⁴¹, avaliando gestações com RPM e corioamnionite, concluíram que há aumento dos índices apoptóticos nas membranas fetais. Entretanto Tanir et al.⁴² empregando a mesma técnica, avaliaram gestações complicadas por RPM e gestações com bolsa íntegra e concluíram que nas gestações complicadas por RPM há aumento dos núcleos apoptóticos nas membranas corioamnióticas, porém não encontraram relação entre corioamnionite . Assim, o mecanismo de morte celular

programada parece ser acelerado pela infecção e inflamação, levando a aceleração da degradação das membranas fetais normais^{37,39,41,43}. Alguns relatos da literatura têm mostrado que na presença de corioamnionite histológica, infiltração das membranas fetais por leucócitos polimorfonucleares, ocorre uma duplicação no grau de apoptose das células do cório, sugerindo que a presença de infecção e ou inflamação podem alterar o equilíbrio entre sobrevivência e morte celular nas gestações complicadas por RPM-PT⁴⁴.

As células amnióticas submetidas ao processo de morte celular programada estão associadas com a degradação orquestrada da MEC antes do início do trabalho de parto¹⁹, sugerindo que a RPM é provavelmente o resultado de mudanças bioquímicas, assim como a presença de força física²⁰.

A apoptose ocorre nas membranas fetais sob circunstâncias normais em associação com o trabalho de parto⁴⁵. Para [Runić²⁷](#) a apoptose ocorre como parte da senescência programada das células coriônicas e deciduais e não são desencadeadas em associação com o trabalho de parto. Em gestações complicadas por infecção intra-uterina, ocorre aumento da apoptose nas membranas fetais⁴¹ e observa-se elevadas concentrações da proteína nucleossomal, um marcador de células apoptóticas, no líquido amniótico⁴⁶.

Considerando os resultados controversos e escassos da literatura acerca dos índices apoptóticos nas membranas fetais e o importante papel deste mecanismo na fisiopatologia da RPM-PT, o estudo do índice apoptótico nas membranas corioamnióticas poderá contribuir para o entendimento da participação da corioamnionite na fisiopatologia da RPM-PT.

4. Material e Métodos

4.1. Desenho do estudo e constituição dos grupos

Trata-se de um estudo prospectivo e transversal. Todas as pacientes incluídas no estudo foram atendidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, entre o período de Janeiro de 2010 a Dezembro de 2012. Foram incluídas no estudo 40 mulheres com gestação única cujo desfecho gestacional incluiu gestações pré-termo que apresentaram RPM-PT entre a 26 e 36 semanas de gestação na presença (n= 10) ou não de corioamnionite (n= 10) ou em trabalho de parto com bolsa das águas íntegras, na presença (n= 10) ou não de corioamnionite (n= 10). As membranas corioamnióticas de gestações complicadas por diabetes, hipertensão, anomalias fetais congênitas comprovadas, gemelaridade, placenta prévia e infecção urinária ou outras infecções foram excluídas do estudo.

Todas as gestantes envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa, concordaram em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (Protocolo CEP 3438-2010).

4.2. Colheita das membranas corioamnióticas

No momento da resolução da gestação, logo após a dequitação, foram colhidas membranas corioamnióticas de todas as gestantes incluídas no estudo. Fragmentos das membranas corioamnióticas foram fixados e acondicionados em recipiente apropriado, contendo formalina a 10%, por 24 horas para fixação, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e a seguir incluídos em blocos de parafina. Os blocos obtidos foram seccionados em micrótomo comum, obtendo-se cortes de 5 µm de espessura para montagem em lâminas de vidro. As lâminas foram coradas pelo método clássico de Hematoxilina-Eosina (HE) para a análise histopatológica das membranas segundo os critérios de Yoon et al⁴⁷.

4.3. Reação de TUNEL

A ocorrência de apoptose foi confirmada através da evidência da fragmentação do DNA genômico via Reação de TUNEL⁴⁸. Foi utilizado um kit comercial para a detecção *in situ* da fragmentação do genoma (ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon-Millipore) seguindo as instruções do fabricante.

Fragmentos de membranas corioamnióticas de 5 µm montados em lâminas de vidro foram tratados com proteinase K (20 µg/mL) por 15 minutos a temperatura ambiente e lavada com água destilada. Em seguida os cortes foram incubados em solução com H₂O₂ a 30% por 5 minutos a temperatura ambiente para bloquear a atividade da peroxidase endógena. As lâminas foram lavadas em tampão PBS e incubadas com tampão de equilíbrio por 10 minutos seguido da aplicação do *Working Strength TdT Enzyme* por 1 hora a 37°C. Posteriormente as amostras foram incubadas com *Working strength Stop/Wash Buffer* por 10 segundos em agitação. As lâminas foram então lavadas três vezes com tampão PBS e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente com *Anti-Digoxigenin Conjugate*. Em seguida, as lâminas foram lavadas com tampão PBS e incubadas com diaminobenzidina (Sigma –Aldrich) por 3 minutos a temperatura ambiente e contra-coradas com verde de metila (Sigma –Aldrich).

Nas amostras utilizadas como controle negativo foram realizados os mesmos procedimentos sendo omitido a deoxinucleotidil transferase da reação. Como controle positivo foi utilizado lâmina com corte de glândula mamária de rata fornecida pelo kit e processada conforme as instruções do fabricante. Os núcleos das células em apoptose foram marcados positivamente quando apresentaram coloração acastanhada escura, resultado da reação da peroxidase com o substrato diaminobenzidina. As imagens foram visualizadas com um microscópio Olympus BX41 e fotomicrografias no aumento

de 1000 × utilizando um sistema de aquisição de imagem digital. A contagem das células foi realizada manualmente, utilizando-se um programa de processamento e análise de imagens (ImageJ). Para cada lâmina foram avaliados dez campos consecutivos e o índice apoptótico foi expresso em percentual conforme a seguinte fórmula⁴⁹: Índice apoptótico= nº células apoptóticas x100/ nº total de células.

4.4. Análise Estatística

Os dados referentes à idade materna, idade gestacional no momento do parto dos grupos estudados foram submetidos ao teste análise de variância (ANOVA). As variáveis estado civil, raça, hábito de fumar, via de parto, paridade e frequência de intercorrências gestacionais anteriores foram submetidas ao Teste Exato de Fisher. E o índice apoptótico foi submetido ao teste de teste de χ^2 . O nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5%. O software utilizado para as análises foi o SigmaStat 9.0 (Jandel Corporation).

5. Resultados

5.1. Características sócio-demográficas e obstétricas das gestantes incluídas no estudo

As variáveis sócio-demográficas e obstétricas das pacientes incluídas no estudo estão apresentadas na Tabela 1. A mediana da idade materna foi significativamente maior no grupo RPM-PT na presença de corioamnionite quando comparado com o grupo em TPP na presença de corioamnionite histológica.

Em relação às variáveis sócio-demográficas, as porcentagens de mulheres que referiram união estável, cor branca e hábito tabagista foram similares entre os grupos estudados. Em relação às variáveis obstétricas, tais como idade gestacional, no momento do parto, via de parto, paridade, intercorrências em gestações anteriores não houve diferença entre os grupos.

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

Tabela 1. Variáveis sócio-demográficas e obstétricas das gestantes incluídas no estudo.

Variáveis		RPM-PT ausência de CA (n=10)	RPM-PT presença de CA (n=10)	TPP ausência CA (n=10)	TPP presença CA (n=10)
Idade materna ⁺		21,5 (17 – 32) ^{abc}	29,5 (19 – 44) ^{ab}	25 (16 – 34) ^{abc}	17(14 -29) ^{ac}
Estado civil [#]	Solteira	1 (10%) ^a	3 (30%) ^a	1 (10%) ^a	5 (50%) ^a
	União estável	9 (90%) ^a	7 (70%) ^a	9 (90%) ^a	5(50%) ^a
Etnia [#]	Branco	9 (90%) ^a	9 (90%) ^a	8 (80%) ^a	7 (70%) ^a
	Não Branco	1 (10%) ^a	1 (10%) ^a	2 (20%) ^a	3 (30%) ^a
Tabagista [#]	sim	3 (30%) ^a	6 (60%) ^a	4 (40%) ^a	6 (60%) ^a
	não	7 (70%) ^a	4 (40%) ^a	6 (60%) ^a	4 (40%) ^a
Tipo de Parto [#]	Vaginal	7 (70%) ^a	5 (50%) ^a	8 (80%) ^a	6 (60%) ^a
	Cesárea	3 (30%) ^a	5 (50%) ^a	2 (20%) ^a	4 (40%) ^a
Idade gestacional no momento do parto (dias) [#]		244 (221 -255) ^a	243,5 (186-258) ^a	224,5 (177-257) ^a	225 (182-252) ^a
Paridade [#]	Primigesta	2 (20%) ^a	4 (40%) ^a	3 (30%) ^a	4 (40%) ^a
	Multigesta	8 (80%) ^a	6 (60%) ^a	7 (70%) ^a	6 (60%) ^a
Intercorrências gestacionais anteriores [#]					
	Sim	3 (30%) ^a	3 (30%) ^a	4 (40%) ^a	6 (60%) ^a
	Não	6 (60%) ^a	4 (40%) ^a	3 (30%) ^a	1 (10%) ^a
	NA	1 (10%)	3 (30%)	3 (30%)	3 (30%)

⁺ valores expressos em mediana (máximo-mínimo); Análise estatística: Teste de Kruskal Wallis.

[#] valores expressos em porcentagens (n/total); Análise estatística: Teste exato de Fischer

RPM-PT ausência de CA: rotura prematura de membranas na ausência de corioamnionite, RPM-PT presença de CA: rotura prematura de membranas na presença de corioamnionite, TPP ausência de CA: trabalho de parto prematuro na ausência de CA, TPP ausência de CA: trabalho de parto prematuro na presença de CA.

5.2. Quantificação do índice apoptótico

A visualização da fragmentação do DNA genômico *in situ*, empregada a reação de TUNEL, foi observada em todas as amostras incluídas no estudo. Observamos ainda, a presença de núcleos apoptóticos em todos os tipos celulares constituintes das membranas corioamnióticas, ou seja, na célula amniótica, coriônica e decidual, com expressiva marcação para apoptose no epitélio amniótico. A porcentagem média do índice apoptótico nos grupos RPM-PT na ausência de corioamnionite, RPM-PT na presença de corioamnionite, TPP na ausência de corioamnionite e TPP na presença de corioamnionite foi de: 81,9%, 88,4%, 27,2% e 48,7% respectivamente. O índice apoptótico se apresentou significativamente aumentado no grupo RPM-PT em relação ao

grupo TPP e não mostrou diferença significativa associado ao *status* de corioamnionite histológica (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem média do índice apoptótico nos grupos estudados

Índice# Apoptótico	RPM- PT	TPP	p	RPM-PT ausência de CA	RPM-PT presença de CA	TPP ausência de CA	TPP presença de CA	p
% de células apoptóticas	85,12%	37,92%	<0,0001	81,9%	88,4%	27,2%	48,7%	<0,0001
% de células não apoptóticas	14,88%	62,08%		18,1	11,6%	72,8%	53,1%	

Teste Chisquare

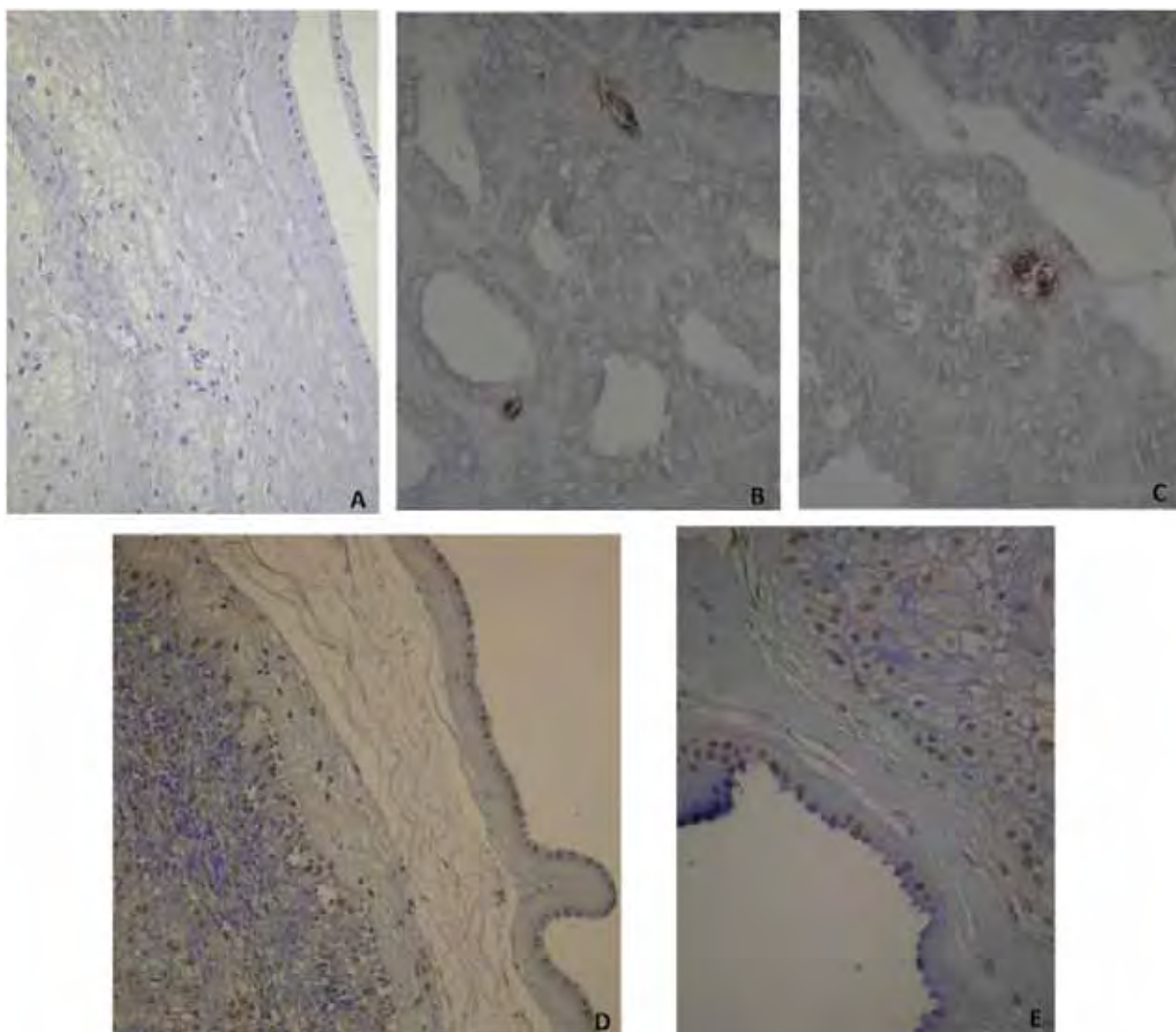


Figura 2. Fotomicrografia das membranas corioamnióticas evidenciando corpos apoptóticos marcados em marrom pela técnica de TUNEL **A.** Controle negativo (x200), **B.** controle positivo (x200), **C.** Controle positivo (x400) **D.** Amostra de membranas corioamnióticas de paciente com RPM-PT (x200) e **D.** Amostra de membranas corioamnióticas de paciente com RPM-PT (x400) (Methyl Green).

6. Discussão

Durante a gestação grandes mudanças são observadas na microanatomia das membranas fetais, como a diminuição na espessura e resistência à ruptura das membranas, mudanças na atividade enzimática de metaloproteinases e prostaglandinas, alterações no padrão de produção e a indução de receptores de citocinas pelas células coriodecduais e a apoptose de células do âmnio e cório^{27,35,36,39}.

A função do tecido normal, tipicamente depende da estrutura e função das células individuais que compõem esse tecido. Esta homeostase é mantida por uma via de sinalização molecular geneticamente controlada que resulta em morte celular programada, sem produzir uma resposta inflamatória destrutiva. Alterações no balanço entre morte celular podem ocorrer quando estas vias são modificadas por diversos mecanismos. A apoptose é um processo que requer energia ativa que ocorre em determinadas células e é regulada por complexas vias de sinalização molecular. Em condições patológicas estas mesmas vias de sinalização podem ser induzidas, resultando na aceleração do processo de morte celular programada³⁶.

Segundo Murtha et al⁴¹ a apoptose foi mais prevalente no corio das membranas fetais de gestações a termo complicadas por corioamnionite histológica quando comparado com membranas fetais livres do infiltrado inflamatório. No mesmo sentido, para Balkundi et al³⁶ a apoptose está aumentada nas membranas corioamnióticas de gestações complicadas por corioamnionite. No entanto, Tanir et al não encontraram associação entre a presença de corioamnionite histológica e marcadores apoptóticos em gestantes com RPM⁴²

A observação da ocorrência de uma expressiva marcação para a fragmentação do DNA genômico em todo o epitélio amniótico é apoiado pela literatura onde Kataoka et al⁴⁰ analisando gestações complicadas por RPM e corioamnionite histológica observaram uma maior proporção de apoptose no epitélio amniótico. Similarmente para outros autores, foi encontrado um aumento significativo de núcleos apoptóticos nas células coriônicas de gestações complicadas por corioamnionite quando comparadas com membranas corioamnióticas na ausência desta complicação⁴⁹. Portanto, os presentes dados sugerem que a presença da infecção ou inflamação pode alterar o balanço entre sobrevivência e morte celular nas membranas fetais de gestações complicadas

por RPM-PT. E por as membranas fetais desempenharem um importante papel na proteção e quiescência uterina esse desequilíbrio entre morte celular e sobrevivência pode resultar numa função diminuída. Assim, na presença de infecção ou inflamação seu papel protetor é perturbado e seu efeito protetor perdido⁴¹. Além disso, o aumento da apoptose no âmnio pode estar relacionado com a fisiopatologia da RPM e não como efeito da RPM, já que o âmnio é rico em colágeno e é de 6-9 vezes mais resistente que o cório que contribui com apenas 10-15% da resistência total das membranas intactas^{ref}, sugerindo assim que, o aumento da apoptose no âmnio desempenha um importante papel no enfraquecimento das membranas fetais predispondo a RPM⁴⁰.

Segundo Fortunato et al³⁷ o principal fator relacionado com os casos de RPM foi o lipopolissacarídeo (LPS) resultado de infecções bacterianas gram negativas. Por sua vez, o LPS estimula a secreção do fator de necrose tumoral α que induz a produção de caspases culminando com a apoptose, dessa forma sustentando a hipótese de que a infecção ou a inflamação acelera o processo de morte celular programada e que a apoptose desempenha um importante papel na fisiopatologia da rotura das membranas fetais⁴⁰.

No presente estudo notamos que quando comparados os grupos independente da presença do infiltrado inflamatório, os grupos com desfecho gestacionais complicados por RPM-PT apresentaram uma diferença significativa na quantificação do índice apoptótico quando comparados com os grupos em TPP. Esses dados corroboram os achados da literatura em que descrevem que mecanismos moleculares distintos possam levar aos diferentes desfechos gestacionais, ou seja, TPP e RPM-PT⁵¹. Assim, numa tentativa para delinear as vias que levam ao TPP e RPM-PT os três maiores elementos a serem considerados como fatores determinantes aos diferentes desfechos gestacionais são: citocinas inflamatórias, aumento na atividade das metaloproteinases e apoptose⁵¹. A

atividade das metaloproteinases e a apoptose são fortemente associadas a RPM-PT enquanto que as citocinas estão aumentadas em ambas as situações. Os mesmos autores sugerem ainda que uma ou mais dessas citocinas possam atuar como interruptores levando aos diferentes desfechos gestacionais. Já que o TNF é capaz de induzir tanto a atividade enzimática das metaloproteinases e a apoptose em cultura de células de membranas fetais humanas num grau maior que a interleucina-1 β (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6) sugerindo que a IL-6 exerce um efeito mínimo na ativação da apoptose nas membranas fetais^{52,53}. Entretanto, a IL-1 β tem sido associada com a ativação da apoptose nas membranas corioamnióticas⁵⁴.

Em conjunto os dados da literatura apontam que na presença de corioamnionite histológica o processo de morte celular programada está exarcebado. E que a apoptose está envolvida na fisiopatologia dos mecanismos de RPM-PT.

7. Referências Bibliográficas*

1. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 178-93.
2. Silva MG, Peraçoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Peraçoli MTS. Cervical *Lactobacillus* and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynecol Obstet* 2003; 81: 175-83.
3. Tanir HM, Sener T, Tekin N, Aksit A, Ardic N. Preterm premature rupture of membranes and neonatal outcome prior to 34 weeks of gestation. *Int J Gynecol Obstet* 2003; 82: 167-72.
4. Polettini J, Peraçoli JC, Candeias JM, Araújo Junior JP, Silva MG. Inflammatory cytokine mRNA detection by real time PCR in chorioamniotic membranes from pregnant women with preterm premature rupture of membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 144:27-34.
5. Aagaard-Tillery KM, Nuthalapaty FS, Ramsey PS, Ramin KD. Preterm premature rupture of membranes: perspectives surrounding controversies in management. *Am J Perinatol* 2005; 22: 287-97.
6. Baud O, Fontaine RH, Olivier P, Maury L, EL MoussawiF, Bauvin I, et al. Premature rupture of membranes: pathophysiology of neurological impact. *Arch Pediatr* 2007; 1: 549-53.
7. Pristauz G, Bauer M, Mauer-Fellbaum U, Rotky-Fast C, Bader AA, Hass J, et al. Neonatal outcome and two-year follow-up after expectant management of second trimester rupture of membranes. *Gynecol Obstet* 2008; 101:264-8.

8. Karat C, Madhivanan P, Krupp K, Poornima S, Jayanthi NV, Suguna JS, et al. The clinical and microbiological correlates of premature rupture of membranes. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24: 283-5.
9. Paul K, Boutain D, Agnew K, Thomas J, Hitti J. The relationship between racial identify, income, stress and C-reactive protein among parous women: implications for preterm birth disparity research. *J Natl Med Assoc* 2008; 100:540-6.
10. Whitehead NS, Callaghan W, Johnson C, Williams L. Racial, ethnic, and economic disparities in the prevalence of pregnancy complications. *Matern Child Health J* 2009; 13:198-205.
11. Brooke OG, Anderson HR, Bland JM, Peacock JL, Stewart CM. Effects on birth weight of smoking, alcohol, caffeine, socioeconomic factors, and psychosocial stress. *BMJ* 1989; 298:795-801.
12. Wadhwa PD, Culhane JF, Rauh V, Barve SS, Hogan V, Sandman CA, et al. Stress, infection and preterm birth: a biobehavioural perspective. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2001; 15:17-29.
13. Elizabeth Jesse D, Graham M, Swanson M. Psychosocial and spiritual factors associated with smoking and substance use during pregnancy in African American and White low-income women. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2006; 35:68-77.
14. McCormick MC, Brooks-Gunn J, Shorter T, Holmes JH, Wallace CY, Heagarty MC. Factors associated with smoking in low-income pregnant women: relationship to birth weight, stressful life events, social support, health behaviors and mental distress. *J Clin Epidemiol* 1990; 43:441-8.
15. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000; 342:1500-7.
16. Dominguez TP. Race, racism, and racial disparities in adverse birth outcomes. *Clin Obstet Gynecol* 2008; 51:360-70.
17. Fiscella K. Race, genes and preterm delivery. *J Natl Med Assoc* 2005; 97:1516-26.
18. Menon R. Spontaneous preterm birth, a and genetic dilemma: etiology, pathophysiologic and genetic heterogeneities and racial disparity. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008; 87:590-600.
19. Lei H, Furth EE, Kalluri E. A programmed cell death and extracellular matrix degradation is activated in amnion before the onset of labor. *J Clin Invest* 1996; 98:1971-8.
20. Menon R, Fortunato SJ. Infection and the role of inflammation in preterm premature rupture of the membranes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; 21:467-78.
21. French JI, McGregor JA. The pathobiology of premature rupture of membranes. *Semin Perinatol* 1996; 20:344-68.
22. Kumar V, Fausto N. Robbins e Cotran - Patologia - Bases Patológicas. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier 2005.
23. Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspases substrates. *Cell Death Differ* 2003; 10:76-100.
24. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177:57-65.
25. Watanabe H, Kanzaki H, Narukawa S, Inoue T, Katsuragawa H, Kaneko Y, et al. Bcl-2 and Fas expression in eutopic and ectopic human endometrium during the menstrual cycle in relation to endometrial cell apoptosis. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:360-8.
26. Hsueh AJ, Billig H, Tsafiriri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled

- apoptotic process. *Endocr Rev* 1994; 707-24.
27. Runić R, Lockwood CJ, LaChapelle L, Dipasquale B, Demopoulos RI, Kumar A, et al. Apoptosis and Fas expression in human fetal membranes. *J Clinical Metab* 1998; 83:660-6.
 28. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:745-56.
 29. Hettis SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998; 279:300-7.
 30. Barrisic K, Petrik J, Rumora L. Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta Pharm* 2003; 53:151-164.
 31. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407:770-6.
 32. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997; 22:299-306.
 33. McCathy NJ, Evan GI. Methods for detecting and quantifying apoptosis. *Curr Top Dev Biol* 1998; 279:300-7.
 34. Sağol S, Sağol O, Ozkal S, Asena U. Role of apoptosis, bcl-2 and bax protein expression in premature rupture of fetal membranes. *J Reprod Med* 2002; 47:809-15.
 35. Vadillo Ortega F, Arechevaleta F, Beltrán Montoya J. Apoptosis and extracellular matrix degradation in chorio-amnion during labor and premature membrane rupture. *Ginecol Obstet Mex* 1998; 66:202-7.
 36. Balkundi DR, Ziegler JA, Watchko JF, Craven C, Trucco M. Regulation of FasL/Fas in human trophoblasts: possible implications for chorioamnionitis. *Biol Reprod* 2003; 69:718-24.
 37. Fortunato SJ, Menon R, Bryant C, Lombardi SJ. Programmed cell death (apoptosis) as a possible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrane degradation in premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182:1468-76.
 38. El Khwad M, Pandey V, Stetzer B, Mercer BM, Kumar D, Moore RM, et al. Fetal membranes from term vaginal deliveries have a zone of weakness exhibiting characteristics of apoptosis and remodeling. *J Soc Gynecol Investig* 2006; 13:191-5.
 39. George RB, Kalich J, Yonish B, Murtha AP. Apoptosis in the chorion of fetal membranes in preterm premature rupture of membranes. *Am J Perinatol* 2008; 25:29-32.
 40. Kataoka S, Furuta I, Yamada H, Kato EH, Ebina Y, Kishida T, et al. Increased apoptosis of human fetal membranes in rupture of the membranes and chorioamnionitis. *Placenta* 2002; 23:224-31.
 41. Murtha AP, Auten R, Herbert WNP. Apoptosis in the chorion leave of term patients with histologic chorioamnionitis. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2002; 10:93-6.
 42. Tanir HM, Sener T, Artan S, Kaytaz B, Sahin-Mutlu F, Ozen ME. Programmed cell death (apoptosis) in placenta from normal pregnancy and pregnancy complicated by term (t) and preterm (p) premature rupture of membranes (PROM). *Arch Gynecol Obstet* 2005; 273:98-103.
 43. Menon R, Fortunato SJ. The role of matrix degrading enzymes and apoptosis in rupture of membranes. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11:427-37.
 44. Parmeley TH. Spontaneous cell death in the chorion leave. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162:1576-81.
 45. Lonergan M, Aponso D, Marvin KW, Helliwell RJA, Sato TA, Mitchell MD, et al. Tumor Necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TRAIL receptors, and the soluble receptor osteoprotegerin in human gestacional membranes and

- amniotic fluid during pregnancy and labor at term and preterm. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:3835-44.
46. Lu LC, Hsu CD. Elevated amniotic fluid nucleosome levels in women with intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol* 1999; 94:7-10.
 47. Yoon
 48. Gravielli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119(3):493-501.
 49. Moro L, Vasconcelos AC, Santos FGA, Alves CM, Nunes IBM. Determination of the minimal representative number of microscopic fields to quantify apoptosis in canine lymph nodes. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2004; 56:408-10.
 50. Artal R, Sokol RJ, Neuman M, Burstein AH, Stojkov J. The mechanical properties of prematurely and non-prematurely ruptured membranes. Methods and preliminary results. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 125(5):655-9.
 51. Fortunato SJ, Menon R. Distinct molecular events suggest different pathways for preterm labour and PROM. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:1399-1405.
 52. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Role of tumor necrosis factor-alpha in the rupture premature and preterm labor pathways. . *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187:1159-62.
 53. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. TNF- α promotes caspase activation and apoptosis in human fetal membranes. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19:201-4.
 54. Fortunato SJ, Menon R. IL-1 β is a better inducer of apoptosis in human fetal membranes than IL-6. *Placenta* 2003; 24:922-8.