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

β DEFENSINAS EM MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS DE GESTAÇÕES COMPLICADAS POR PREMATURIDADE: EXPRESSÃO GÊNICA E IMUNOLOCALIZAÇÃO

Nathália Mayumi Noda Nicolau

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

Botucatu – SP
2013

Nathália Mayumi Noda Nicolau

β DEFENSINAS EM MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS DE GESTAÇÕES COMPLICADAS POR PREMATURIDADE: EXPRESSÃO GÊNICA E IMUNOLOCALIZAÇÃO

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

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Botucatu – SP
2013

Dedicatória

Aos meus pais,
Roberto e Cristina por toda dedicação à minha formação pessoal e intelectual, vocês sempre foram e serão meus exemplos de determinação, coragem, integridade, amor e de vida.

Ao meu marido, Rafael
Por todo carinho e atenção dedicados a mim, sempre ao meu lado em todas as decisões, não medindo esforços para me fazer feliz. Não consigo imaginar minha vida sem você.

A minha irmã, Larissa
Por ser além de irmã uma amiga, companheira, amorosa, impossível decrevê-la em palavras.

As minhas avós, Ilidia e Shizuyo
Sempre muito carinhosas, com pequenos gestos e atitudes me ensinam a cada dia ser uma pessoa melhor.

Agradecimentos especiais

A Deus,
Por tudo que já me foi proporcionado até hoje, só tenho a agradecer o dia após o outro ao lado de pessoas tão especiais.

A Jossimara Polettini,
Por desde a minha chegada ao laboratório ter sido a pessoa que me acolheu e me ensinou tudo que sei, você nunca mediu esforços pra me ajudar no que fosse necessário, e mesmo longe ainda se preocupa comigo, tudo teria sido muito mais difícil sem você, nunca conseguirei lhe agradecer o bastante.

A Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva
Agradeço a oportunidade de ter sido sua aluna tanto na graduação como na pós-graduação. Desde que assisti sua primeira aula me encantei com sua didática e inteligência. Como orientadora é sempre solícita e atenciosa, não poderia ter tido orientação melhor. Muito obrigada por todos os ensinamentos, os levarei por toda a vida.

Agradecimentos

À todo o pessoal do Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal, Aline Bolpetti, Ana Carolina Pereira, Bruna Ramos, Carolina Tafner, Eliane Vieira, Gabriel Vitor Pinto, Heloise Ranucci, Laura Martin, Mariana Morena e Natália Moço por toda ajuda e convivência. De forma especial, a Camila Marconi e Larissa D. Marcolino, por sempre estarem dispostas a me ajudar, ouvir, ensinar e além de tudo sempre me motivam nos momentos mais difíceis de cada experimento. Cada um contribuiu de alguma maneira, só tenho a agradecer.

As alunas de Iniciação Científica que estiveram conosco, Amanda Della Coletta e Niele D. Mendes, obrigada por sempre estarem prontas a ajudar.

À Secretária do Programa de Pós-Graduação em Patologia, Vânia Soler, e aos funcionários da Seção De Pós-Graduação, sempre muito atenciosos e prestativos.

Aos professores do Departamento de Patologia, em especial à Dra. Kunie Iabuki R. Coelho, pelas orientações na análise histológica das membranas corioamnióticas.

À Profa. Dra. Denise Fecchio, pela gentileza e amizade.

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

Às gestantes, que aceitaram a participar desse estudo.

À FAPESP, pela bolsa de estudos e auxílio financeiro concedidos.

Trabalho realizado no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, e no Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, com apoio financeiro da FAPESP (Processos 2009/52317-2 e 2010/14724-2) e da CAPES (PROAP).

Lista de Abreviaturas

ANs	Antimicrobianos naturais
CCR6	Receptor 6 de quimiocina (C-C *motif*)
DAB	Diaminobenzidina
DNA	*Deoxyribonucleic Acid*
HBD	*Human Beta Defensin*
HNPs	*Human Neutrophil Peptides*
IL	Interleucina
LA	Líquido amniótico
LPS	Lipopolissacarídeos
MEC	Matriz extracelular
PAMP	*Pathogen-associated molecular patters*
PBS	*Phosphate buffered saline*
PCR	*Polymerase chain reaction*
PGE2	Prostaglandina E2
PGs	Prostaglandinas
PMA	*Phenyl mercury acetate*
PP	Parto pré-termo
PT	Parto a termo
PTX-3	Pentraxina - 3
RIN	RNA *Integrity Number*
RNA	*Ribonucleic acid*
RPM	Rotura prematura de membranas
RPM-PT	Rotura Prematura de membranas pré-termo
TBP	TATA *box binding protein*
TLR	*Toll like receptor*
TNF-α	*Tumor necrosis factor*-alpha
TPP	Trabalho de parto pré-termo

Sumário

Revisão da Literatura..... 1
1. Introdução..... 1
2. Estrutura das membranas corioamnióticas..... 4
3. Invasão microbiana da cavidade amniótica e parto pré-termo..... 7
4. Mediadores da resposta imune inata e trabalho de parto pré-termo..... 8
5. Referências bibliográficas..... 14
Justificativa..... 27
Resumo..... 29
Abstract..... 31
Artigo científico..... 33
Anexos..... 54

1. Introdução

O trabalho de parto a termo, na espécie humana, é resultado de complexa rede de eventos, regulado por uma variedade de mecanismos e mediadores dos sistemas endócrino, nervoso e imune. Três processos distintos e interdependentes caracterizam o momento em que a gestação atinge o desfecho: o remodelamento cervical, o enfraquecimento e rotura das membranas fetais e a contratilidade miometrial, que, juntos, viabilizam a expulsão do feto após a 37ª semana de gestação[1,2]. Neste contexto, mediadores da resposta imune inata e adaptativa permeiam e possibilitam os mecanismos envolvidos no desencadeamento do parto[1].

No entanto, apesar dos inúmeros trabalhos e das tecnologias existentes, os mecanismos envolvidos no desencadeamento do trabalho de parto a termo ainda não estão completamente elucidados[3]. Além disso, as alterações endócrinas que antecedem o trabalho de parto não são uniformes entre as espécies (revisado por Vora, et al.[4]), o que dificulta extrapolar os achados obtidos na experimentação animal para os seres humanos.

A maior consequência do incompleto conhecimento dos mecanismos que desencadeiam o trabalho de parto a termo é a dificuldade em prevenir o trabalho de parto pré-termo (TPP), considerado um dos principais problemas da Clínica Obstétrica. Além da mortalidade neonatal, as comorbidades associadas ao parto pré-termo geralmente levam a diversas consequências na vida do neonato resultando em custos econômicos, físicos e psicológicos.[5]

O TPP é uma importante intercorrência obstétrica que acomete de 5 a 10% das gestações[6-8] e, apesar dos novos tratamentos e estratégias de prevenção, sua incidência não tem diminuído nos últimos anos[9]. Essa intercorrência gestacional é caracterizada pela presença de uma ou mais contrações a cada 10 minutos, com ritmo e freqüência regulares, acompanhadas de esvaecimento cervical igual ou superior a 50% e/ou dilatação cervical superior a 2 cm, no período em que a idade gestacional encontra-se entre 22 e 37

semanas[10]. A principal complicação para o recém-nascido relacionada aos episódios de TPP é a prematuridade, que é responsável por 70% dos índices de morbidade e mortalidade perinatal[11].

A etiologia do TPP é multifatorial, já que muitos fatores de risco podem estar envolvidos e atuando conjuntamente até a instalação deste processo. Muitos fatores associados à ocorrência de TPP são conhecidos, como a ocorrência de TPP em gestações prévias, múltiplas gestações, polidramnia, sangramento vaginal durante a gestação, rotura prematura de membranas (RPM), vaginose bacteriana, entre outros[10,12-14]. A diversidade de fatores potencialmente envolvidos na etiologia do TPP é, sem dúvida, uma dificuldade para o desenvolvimento de medidas efetivas para sua prevenção[15].

Apesar das várias contribuições já realizadas, inúmeros estudos têm buscado elucidar causas e mecanismos envolvidos no desenvolvimento do TPP mas sua patogênese permanece incompletamente conhecida[1,16,17]. Entre os fatores que são conhecidamente relacionados ao desenvolvimento do TPP, a infecção da cavidade amniótica merece destaque por estar frequentemente associada à episódios de TPP[1,18,19]. Define-se como infecção da cavidade amniótica a presença de micro-organismos no líquido amniótico (LA), na presença ou ausência de sinais clínicos de infecção[20].

Trabalhos da literatura relatam diferentes taxas de cultura positiva do LA, variando de 10 a 40% dos casos de TPP[19,21-23]. Somado a isso, já foi demonstrado que pacientes com infecção da cavidade amniótica, no segundo trimestre de gestação, têm risco aumentado para o desenvolvimento dessa complicação[24]. Segundo Goldenberg et al.[19], a infecção da cavidade amniótica está relacionada a 80% dos casos de TPP com idade gestacional inferior a 30 semanas, comparado com apenas 30% das gestantes, em trabalho de parto, com idade superior a 37 semanas. Outros estudos, porém, têm relatado a presença de vírus[25] e inúmeras espécies de bactérias[26] no LA de pacientes assintomáticas.

Acredita-se que as taxas de infecção do LA relatadas por estudos que utilizam métodos de cultura convencionais podem ser subestimados, visto a inexistência de métodos capazes de suprir todas as exigências dos inúmeros micro-organismos potencialmente presentes nele[27]. No entanto, a introdução de novas metodologias moleculares, que possibilitam a pesquisa de sequências conservadas inter-espécies, como o gene RNA ribossômico 16S, têm se mostrado muito eficiente para a determinação das frequências reais de positividade de infecção do LA[28-30].

Outra intercorrência gestacional que merece destaque na Clínica Obstétrica é a rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT). A rotura das membranas fetais é essencial durante o trabalho de parto, e normalmente procede ao início das contrações uterinas. No entanto, esse processo pode ser desencadeado antes das contrações, sendo denominado de rotura prematura de membranas (RPM). Em idade gestacional inferior a 37 semanas, caracteriza-se a RPM-PT, intercorrência presente em até 30% das gestações pré-termo[31]. Devido à associação da RPM-PT e morbidade materna e morbimortalidade perinatal[32], a RPM-PT tem sido objeto de muitos estudos epidemiológicos e clínicos, na tentativa de identificar fatores de risco. Esses fatores também são múltiplos, incluindo-se raça[33,34], fatores comportamentais (tabagismo, atividade e início da vida sexual, deficiência materna de zinco ou vitamina C)[34-38], complicações obstétricas (gemelaridade, múltiplos sangramentos vaginais durante a gestação, polidrâmnio, hipertensão e diabetes materna)[19,33,39] e infecções genitais e da cavidade amniótica[19,41], sendo essa última associada à maioria dos casos de RPM-PT[19, 42-44].

A RPM-PT é uma das maiores causas de prematuridade e é a mais importante causa de morbidade e mortalidade neonatais, particularmente por estar associada, ao período de latência entre a rotura das membranas fetais e o parto, a infecção neonatal[45,46] e compressão do cordão umbilical devido à redução do líquido amniótico[47].

A frequência e severidade das complicações neonatais após a RPM-PT variam com a idade gestacional e estão aumentadas na presença de infecção perinatal[47,48], elevando o índice de infecção neonatal de 1 a 3% para 8 a 30% e aumentando os índices de mortalidade neonatal, independente da idade gestacional[49]. A síndrome do desconforto respiratório, seguida de enterocolite necrosante, hemorragia intraventricular e sepse são as complicações mais graves frequentemente associadas à prematuridade e raramente encontradas nas gestações a termo[48].

2. Estrutura das membranas coriamnióticas

A visão tradicional é que a cavidade amniótica durante a gravidez normal seja estéril, e não contenha bactérias viáveis[51] apesar da grande quantidade de micro-organismos que colonizam o trato genital inferior (vagina e ectocérvice). O estado estéril da cavidade amniótica é, presumivelmente, realizado pela participação do sistema imune inato, incluindo a presença e composição do muco cervical[52], componentes celulares e proteicos presentes nos tecidos gestacionais, como células inflamatórias, mediadores e antimicrobianos, e a própria estrutura física da cavidade amniótica. Nesse contexto, as membranas corioamnióticas, que constituem a bolsa das águas que abriga o feto, são tecidos de extrema importância para o desenvolvimento fetal ao proporcionarem a manutenção do volume do LA e a proteção do feto e do cordão umbilical contra compressão e traumas. Além de atuarem também como barreira física contra infecções vindas do trato genital inferior, as membranas corioamnióticas desempenham importante função secretora[49].

Durante o desenvolvimento embrionário, por volta da 17ª semana de gestação, com o aumento do tamanho do feto e consequente crescimento do saco coriônico, as vilosidades coriônicas sofrem compressão e são associadas à decídua parietal. A redução no suprimento sanguíneo das vilosidades coriônicas leva à rápida degeneração das mesmas,

formando uma região relativamente avascular denominada de cório liso. Após a formação do cório liso, as vilosidades associadas à decídua basal aumentam em número e se ramificam, constituindo o cório viloso, também chamado de cório placentário ou frondoso[53].

O terceiro tecido placentário corresponde ao âmnio, que delimita a superfície interna do trofoblasto[54]. Morfologicamente, possui uma porção membranosa, que se acopla ao cório liso; uma porção placentária, que recobre o cório viloso e uma porção funicular, que circunda o cordão umbilical[55].

O crescimento do saco coriônico é acompanhado por crescimento ainda mais rápido do saco amniótico[53]. Em decorrência desse crescimento, ocorre a fusão dessas duas membranas, originando as membranas corioamnióticas[56]. Essas membranas fetais são formadas pelo âmnio e cório conectados pela matriz extracelular (MEC) [57] sendo que o epitélio amniótico, camada mais superficial das membranas, está em contato direto com o líquido amniótico e macroscopicamente apresenta-se liso, translúcido e delgado. No epitélio amniótico, uma monocamada de células epiteliais colunares reveste a cavidade amniótica, e tais células apresentam conexões intercelulares especializadas em suas superfícies laterais e basais, para ligação com a membrana basal, a próxima camada do âmnio[40,58]. As células epiteliais amnióticas secretam colágenos tipos III e IV e glicoproteínas não colágenas que formam a membrana basal. Essas subcamadas são alicerçadas por uma camada compacta, formada por uma trama de colágeno, com densidades variadas[59], os quais são secretados por células mesenquimais e fibroblastos[60]. As fibras intersticiais (colágenos tipos I e III) formam feixes paralelos que mantém a integridade mecânica do âmnio, já os tipos V e VI formam filamentos conectivos entre o colágeno intersticial e a membrana basal epitelial[61].

A camada intermediária entre o âmnio e o cório tem aspecto histológico esponjoso e apresenta grande quantidade de glicoproteínas hidratadas, além de conter uma malha não

fibrilar de colágeno tipo IV[61]. Esta camada absorve estresse físico, pois permite que o âmnio deslize sobre o cório, o qual é firmemente aderido à decídua[45]. O cório é mais externo e apresenta sua primeira porção composta por células reticulares e tecido conectivo coriônico, o qual é constituído por escassas fibras colágenas apoiadas em uma membrana basal[60]. Sua camada celular assemelha-se a uma típica membrana epitelial, com o citotrofoblasto polarizado em direção à decídua. A camada citotrofoblástica é multicelular, podendo assim, variar em espessura[59], e o contato direto entre as células parece ser mais evidente que no âmnio[60].

A camada decidual é associada externamente ao corio-âmnio, deriva da decídua parietal e localiza-se internamente à parede uterina e desempenha importante papel hormonal e imunológico[62]. Essa conformação final das membranas fetais, com o âmnio internamente fundido ao cório, que por sua vez, se alicerça na decídua, ocorre após três fases distintas de desenvolvimento e dois processos de fusão, os quais se acreditam acontecer por volta da 20ª semana de gestação[59].

As fibras colágenas que compõem a MEC sofrem constante remodelação ao longo da gestação para acomodar o volume e tensão crescentes, uma vez que a manutenção da integridade estrutural das membranas fetais é essencial para o sucesso gestacional. Durante as últimas oito semanas de gestação, este processo de remodelação resulta em diminuição do teor de colágeno no âmnio[45], alteração que favorece o fenômeno biológico subsequente, a rotura das membranas no momento do parto. Em mais de 90% das gestações, a rotura das membranas fetais segue o início do trabalho de parto[33], e o aumento da separação espontânea, associado à diminuição da adesão das camadas amniótica e cório-decidual, contribuem para o enfraquecimento das mesmas durante o processo de trabalho de parto[63].

Dessa forma, as membranas corioamnióticas, são de extrema importância para o desenvolvimento fetal, uma vez que protege o feto contra traumas, mantém o volume do líquido amniótico e confere proteção do cordão umbilical e do sangue fetal contra

compressão, além de atuarem como barreira mecânica contra infecções vindas do trato genital inferior[45].

Além de revestir a superfície placentária e constituir o saco amniótico, as membranas fetais desempenham funções de manter as condições ideais de esterilidade do líquido amniótico e de ser barreira imunológica. A identificação da expressão de mediadores do sistema imune inato, como os receptores *Toll-like* (TLRs) -2 e -4[64], e produção de antimicrobianos naturais[65], como □-defensinas humanas, nas membranas corioamnióticas, sugere que esse tecido não funcione apenas como barreira mecânica aos micro-organismos, mas também como barreira imunológica[58] durante a resposta a uma possível invasão microbiana na cavidade amniótica.

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

Embora a etiologia do parto pré-termo seja multifatorial, vários micro-organismos têm sido associados à sua patogênese, especialmente através da ascensão do trato genital inferior[66], com subsequente recrutamento neutrofílico e instalação de corioamnionite. A corioamnionite histológica é definida como inflamação das membranas corioamnióticas, e a maioria dos casos ocorrem na ausência de sinais clínicos e de sintomas de infecção, sendo que pode estar presente em mais de 20% das gestações de termo e em mais de 50% dos partos pré-termo[67-69]. Em estudo recente do nosso grupo de pesquisa, Marconi et al.[70] demonstraram infecção da cavidade amniótica em gestantes que apresentaram parto prematuro. O estudo demonstrou que tal infecção é de natureza polimicrobiana e que, na maioria dos casos, há combinação de micro-organismos aeróbios e anaeróbios.

Os patógenos mais frequentemente isolados no líquido amniótico de pacientes com infecção intra-amniótica são comumente encontrados na microbiota vaginal, incluindo *Gardnerella vaginalis, Escherichia coli, Leptotrichia amnionii, Bacterioides fragilis, Prevotella bivia, Mycoplasma hominis e Ureaplasma urealyticum*[71]. Quando tais micro-organismos predominam na

microbiota vaginal, em relação aos lactobacilos, caracteriza-se a alteração de flora vaginal. Essa alteração está intimamente associada ao risco de parto prematuro[72], uma vez que as bactérias patogênicas em elevada concentração podem ascender à cavidade amniótica, suscitar resposta inflamatória nos tecidos gestacionais e deflagrar o trabalho de parto. Evidências desse processo são as observações de que citocinas inflamatórias estão aumentadas no líquido amniótico de gestantes com infecção intra-amniótica, especialmente aquelas causadas por *U. urealyticum* e *M. hominis*[73].

Kim et al.[74] propuseram um novo modelo de invasão microbiana intra-amniótica, no qual o estágio inicial ocorre por invasão intra-amniótica através de discreta região das membranas fetais, seguido por proliferação bacteriana no líquido amniótico e, posteriormente, a extensão dessa infecção atingiria toda superfície das membranas, iniciando-se pelo âmnio.

Romero et al.[75] descreveram o trabalho de parto a termo como uma síndrome inflamatória, que além de estimular os mecanismos desencadeantes do desfecho gestacional, pode ser importante na remoção dos restos placentários e na resposta uterina à patógenos no período pós-parto[39]. Porém, na presença de infecção intra-amniótica essa cascata inflamatória é amplificada[13,76-78] e ativada precocemente, podendo resultar no parto pré-termo.

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

Processos inflamatórios estão associados à inúmeros processos biológicos conhecidos como ovulação, implantação e desencadeamento do parto[66]. Estudos com RNA celular e transcriptoma, antes e após o parto, indicaram que mediadores da resposta inflamatória estão presentes nas membranas corioamnióticas mesmo na ausência de sinais histológicos de inflamação[79], indicando que o parto espontâneo a termo é caracterizado por um perfil inflamatório na decídua, membranas corioamnióticas e na cérvice.

Com o reconhecimento do parto como um processo inflamatório, pode-se entender que estímulos patogênicos podem estimular a imunidade decidual não programada. Na vigência de infecção, ocorrem subsequentes recrutamento e ativação de leucócitos para as membranas fetais[80], resultando em amplificação da resposta inflamatória.

Já é conhecido na literatura que as células que compõem as camadas teciduais das membranas corioamnióticas, assim como placenta e decídua, são importantes fontes de mediadores inflamatórios[81,82]. O sistema imune inato, diferentemente da imunidade adquirida, reconhece patógenos através da interação de uma variedade de perfis moleculares, como constituintes da parede celular bacteriana, RNA viral e outros. Este reconhecimento envolve moléculas de reconhecimento de padrões conhecidos como os TLRs, e cada um dos 10 tipos já descritos na literatura (TLR1-10) são específicos para os diferentes padrões de reconhecimento de patógenos (PAMPs)[83]. Bactérias Gram-positivas, lipoproteínas associadas à micobactérias, peptidioglicano e ácido lipoteicóico são alguns PAMPs reconhecidos pelo TLR-2[84,85], enquanto o TLR-4 é o principal mediador da resposta imune ao lipopolissacarídeo (LPS)[86]. Ambos receptores são especialmente expressos pelo epitélio amniótico, células coriônicas e deciduais[87,88], constituindo a primeira linha de defesa contra infecção durante a gestação[89]. Kim et al.[88] descreveram que a expressão proteica de TLR-2 e TLR-4 é significantemente maior no epitélio amniótico na presença de corioamnionite histológica, tanto em partos pré-termo quanto a termo. Sugerindo que a expressão aumentada dos TLRs nos tecidos gestacionais, no momento do trabalho de parto, pode aumentar a proteção do hospedeiro contra invasão polimicrobiana da cavidade amniótica, nesse momento tão vulnerável da gestação.

Além da ação via TLRs, acredita-se que, durante a infecção na cavidade amniótica, as próprias bactérias e seus produtos estimulem os tecidos gestacionais a produzirem citocinas pró-inflamatórias como parte da resposta do hospedeiro[1]. Assim, a ativação precoce de TLRs na interface materno-fetal pode perturbar o bem estabelecido perfil anti-

inflamatório necessário para a manutenção da gestação no segundo trimestre[90]. A análise da produção de Interleucina (IL)-6, IL-8, IL-10 e Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) por cultura de trofoblastos humanos, sob estimulação microbiana, revelou que as bactérias estimulam a expressão de RNA mensageiro de citocinas pró e anti-inflamatórias[91], resultando em desequilíbrio entre os dois perfis de citocinas, causado por infecção intra-amniótica, que pode potencializar a indução de parto prematuro.

Outro grupo de moléculas envolvidas na cascata de iniciação do parto são as prostaglandinas (PGs), mediadores lipídicos derivados da metabolização do ácido araquidônico pela via da ciclooxigenase. Níveis séricos e amnióticos de PGs, bem como sua expressão nos tecidos uterinos e nas membranas corioamnióticas[92,93] encontram-se elevados com o avanço da idade gestacional e durante o trabalho de parto[94]. A PGE_2 é considerada um mediador chave para o início e manutenção do trabalho de parto, pois afeta a contração miometrial, remodelamento cervical e rotura das membranas fetais[95]. Estudos anteriores demonstraram que, na vigência de TPP e infecção da cavidade amniótica, os níveis de PGs encontram-se aumentados no LA [96].

Embora algumas citocinas sejam consideradas preditores bioquímicos do parto pré-termo, outros mediadores do sistema imune inato com tal característica vêm sendo avaliados no contexto da gestação[97]. A Pentraxina 3 (PTX3) é uma proteína inflamatória de fase aguda da família da Proteína C Reativa, produzida por diversas células do sistema imune, em resposta à estímulos inflamatórios como IL-1, TNF- α e também à produtos bacterianos[98,99]. A concentração sérica dessa proteína aumenta com o avanço da idade gestacional, atingindo os níveis mais elevados durante o trabalho de parto[100], fortalecendo ainda mais a teoria de que o trabalho de parto é uma síndrome inflamatória[101]. Estudos recentes sugerem que a PTX3 possa ser um novo preditor de TPP, uma vez que sua concentração é significativamente maior no soro de mulheres que apresentam essa complicação gestacional, em comparação às gestações normais[97]. Por outro lado, embora a

PTX3 participe do reconhecimento e resistência contra patógenos específicos, facilitando a apoptose, a literatura ainda é escassa na avaliação de PTX3 como marcador preditivo de infecção intra-amniótica.

No contexto dos mediadores atuantes na gestação, os antimicrobianos naturais (ANs) merecem destaque. Alguns pequenos peptídeos catiônicos antimicrobianos, chamados α-defensinas humanas (HNPs) e β-defensinas humanas (HBDs) têm sido descritos. As HNPs 1-4 estão presentes nos grânulos azurófilos nos neutrófilos e têm um importante papel no extermínio não dependente de oxigênio de bactérias[102], enquanto as HBDs são produzidas por células epiteliais e constituem o maior grupo de antimicrobianos naturais. Na gestação, já foram encontrados ANs no líquido amniótico[103], decídua, placenta e membranas fetais[104]. Essa expressão, especialmente pelas membranas fetais, pode ser importante durante o trabalho de parto e no nascimento, quando o muco cervical é perdido e a cérvice está dilatada, tornando o útero mais susceptível à infecções. Nesse cenário podemos destacar as HBDs que atuam principalmente através da neutralização de micro-organismos invasores[105].

As HBDs são pequenos peptídeos catiônicos formados a partir de seis resíduos de cisteínas altamente conservados ligados por três pontes dissulfeto, entre as cisteínas 1-5, 2-4 e 3-6, possuindo um comprimento que pode variar de 36 a 42 aminoácidos[106-108]. Em humanos, as beta defensinas são codificadas por genes localizados em um cluster no cromossomo 8p23[107].

Para a sua síntese, os genes das HBDs codificam um peptídeo precursor hidrofóbico, uma sequência sinal rica em leucina, seguida ou não de uma pró-sequência e, enfim, um peptídeo maduro com seis cisteínas modificado na região carboxi-terminal[109-110]. Esses precursores são codificados em 2 éxons separados por um íntron de comprimento variável, sendo que um éxon codifica o sinal e a pró-sequência e o outro codifica o peptídeo maduro[109-110]. Possivelmente, para que as pró-sequências tornem-se

biologicamente ativas estas precisam ser clivadas por enzimas proteolíticas, as quais ainda não foram identificadas.

Já existem cerca de 28 sequências de HBDs já detectadas no genoma humano[112], porém as HBDs1-4 são as que têm sido mais estudadas na última década[113]. As HBDs são antimicrobianos potentes e seletivos, atuam contra bactérias gram-positivas e gram-negativas[110-114], além disso possuem atividades antiviral[115] e antifúngica[116]. Esses ANs participam da defesa primária do hospedeiro através da interação direta com micro-organismos[117], podendo romper a membrana bacteriana via interação eletrostática[118]. Além disso, as HBDs podem ativar a imunidade adaptativa durante o processo infeccioso através da ação quimiotática a componentes do sistema imune como células T, monócitos, células dendríticas imaturas[119-120] e mastócitos[121], atuando, por exemplo, como sinalizadores endógenos de TLRs[120,122] e/ou ainda como ligantes do receptor de quimiocina (CCR6)[109]. Somado a isso podem induzir a produção de citocinas por monócitos e por células epiteliais[119,123].

A HBD-1 foi isolada de hemofiltrados[125] e, entre outros tecidos, é expressa no trato geniturinário[126,127], respiratório[128] e no tecido placentário[124]. A expressão constitutiva da HBD-1 está bem estabelecida em diversos tecidos, como pele e gengiva[129-131] e nesses casos, sua expressão não é afetada pela produção de mediadores inflamatórios. Apesar disso, estudos recentes têm mostrado que a HBD-1 pode também ser produzida sob estímulos de citocinas, como a IL-1 β[132], ou de produtos bacterianos[133-135]. Por outro lado, Buhimschi et al.[136] demonstraram em cultura de células amnióticas que a produção de HBD-1 não foi estimulada nem por LPS nem por peptidoglicano.

A HBD-2 foi inicialmente identificada em queratinócitos[137] e no epitélio pulmonar[138], sendo sua expressão mais prevalente observada na pele[134] e no trato respiratório[128,138]. Durante a resposta inflamatória e/ou invasão microbiana, as HBD-2 podem ser produzidas em resposta às citocinas inflamatórias[139-141] ou aos produtos

bacterianos[138,142] seja por tecidos gestacionais[133,142] como em outros sistemas[138, 143, 144]. Nesse contexto, a expressão de RNA mensageiro de HBD-2 esteve aumentada em 104 vezes em cultura de células trofoblásticas de placentas de termo tratadas com IL-1β[104]. Soto et al.[103] descreveram aumento de HBD-2 no líquido amniótico em casos de TPP e RPM-PT, na presença de infecção e/ou inflamação na cavidade amniótica, demonstrando que essa defensina é um constituinte do líquido amniótico que participa da resposta antimicrobiana. A fonte de HBD-2 no líquido amniótico ainda é incerta, porém, é possível que as membranas corioamnióticas contribuam como fonte desse antimicrobiano natural, uma vez que a expressão de seu RNA mensageiro já foi relatada no cório e no epitélio amniótico[104].

A expressão de HBD-3 já foi relatada em tecidos não reprodutivos como os da cavidade oral[145], pulmão[112] e tecido ósseo[146], com particularidade especial de formação de dímeros. Essa defensina possui um largo espectro de atividade antimicrobiana, sendo ativa contra muitas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina e também à fungos[147,148]. A HBD-3 foi detectada no útero e no endométrio[147,149], tendo sua expressão mais elevada na fase secretória do ciclo menstrual, com expressão predominante nas células epiteliais[149]. Sob estímulos inflamatórios, a HBD-3 é a β-defensina mais abundante e mais expressa em células de epitélio amniótico[136]. Szukiewicz et al.[150] observaram que na presença de RPM-PT e corioamnionite, as células amnióticas estimuladas com LPS via receptor TLR-4 apresentam significante aumento de expressão de HBD3 em relação à gestação de termo. Por outro lado, Iavazzo et al.[151] não descreveram associação de HBD-3 e parto prematuro.

A HBD-4 foi caracterizada através do genoma, embora já identificada no endométrio[152] e no antro gástrico[153]. Garcia et al.[153] demonstraram que sua expressão pode ser induzida em células epiteliais do trato respiratório humano após a exposição ao acetato de fenil mercúrio (PMA) ou à infecção bacteriana *in vitro*. Porém, pouco se sabe sobre a expressão e regulação dessa defensina em outros sistemas.

Os raros relatos da literatura demonstram a importância dos AN na proteção uterina durante infecção da cavidade amniótica, e nesse sentido já é sugerido que a análise proteômica do líquido amniótico seja uma ferramenta de reconhecimento de presença de corioamnionite histológica[154]. Além disso, Iavazzo et al.[151] concluíram que a presença de HBD-2 no liquido amniótico de gestações do segundo trimestre pode ser considerado um preditor de RPM-PT. Apesar disso, a literatura ainda é escassa quanto à atividade e expressão das HBDs nos tecidos gestacionais pré-termo e/ou na presença de infecção intrauterina.

Tomados em conjunto os dados da literatura apontam que muitos mediadores inflamatórios são sintetizados na interface materno-fetal e que participam de mecanismos fisiológicos do parto e das complicações gestacionais associadas à infecção da cavidade amniótica. O entendimento da participação desses mediadores contribui para o estabelecimento da fisiopatologia dessas adversidades gestacionais e sem dúvida encoraja o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção.

5. Referências bibliográficas

1. Peltier MR. Immunology of term and preterm labor. Reprod Biol Endocrinol 2003; 1:122.
2. Orsi NM. Cytokine networks in the establishment and maintenance of pregnancy. Hum Fertil 2008; 11:222-230.
3. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, et al. Inflammation and pregnancy. Reprod Sci 2009; 16:206-215.
4. Vora S, Abbas A, Kim CJ, et al. Nuclear factor-kappa B localization and function within intrauterine tissues from term and preterm labor and cultured fetal membranes. Reprod Biol Endocrinol 2010; 8:8.
5. Behrman RE, Butler AS. Preterm birth: Causes, Consequences, and Prevention. The National Academic press 2007; 313-429.
6. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, et al. Epidemiology and causes of preterm birth. Lancet 2008; 371:75-84.

7. Tracy SK, Tracy MB, Dean J, et al. Spontaneous preterm birth of liveborn infants in women at low risk in Australia over 10 years: a population-based study. BJOG 2007; 114:731-735.
8. McPheeters ML, Miller WC, Hartmann KE, et al. The epidemiology of threatened preterm labor: A prospective cohort study. Am J Obstet Gynecol 2005; 192:1325-1330.
9. Martin JA, Kochanek KD, Strobino DM, et al. Annual summary of vital statistics-2003. Pediatrics 2005; 115:619-34.
10. Gestação de Alto Risco / Secretaria de Políticas, Área Técnica da Saúde da Mulher. Brasília: Ministério da Saúde, 2000.
11. McCormik MC. The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidy. N Engl J Med 1985; 321:82-90.
12. Hitti J, Nugent R, Boutain D, et al. Racial disparity in risk of preterm birth associated with lower genital tract infection. Peadiatr and Perinat Epidemiol 2007; 21:330-337.
13. Lo CC, Hsu JJ, Hsieh CC, et al. Risk factors for spontaneous preterm delivery before 34 weeks of gestation among Taiwanese women. Taiwan J Obstet Gynecol 2007; 46:389-394.
14. Varma R, Gupta JK, James DK, et al. Do screening-preventative interventions in asymptomatic pregnancies reduce the risk os preterm delivery – A critical appraisal of the literature. Eur j Obstet Gynecol reprod Biol 2006; 127:145-159.
15. Ancel PY. Perspectives in the prevention of premature birth. Eur J Obstet Gynecol and Reprod Biol 2004; 117:2-5.
16. McNamara HM. Problems and challenges in the management of preterm labor. BJOG 2003; 110:79-85.
17. Hirsh E, Wang H. The molecular pathophysiology of bacterially induced preterm labor: insights from the murine model. J Soc Gynecol Investig 2005; 12:145-155.
18. Gibbs RS, Romero R, Hillier SL, et al. A review of premature birth and subclinical infection. Am J Obst Gynecol 1992; 166:1515-1528.
19. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. N Engl J Med 2000; 342:1500-1507.
20. Romero R, Marzor M. Infection and preterm labor. Clin Gynecol 1988; 31:553-584.

21. Hillier SL, Witkin SS, Krohn MA, et al. The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnion infection. Obst Gynecol 1993; 81:941-948.

22. Gonçalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2002; 8:3-13.

23. Jacobsson B, Mattsby-Baltzer I, Andersch B, et al. Microbial invasion and cytokine response in amniotic fluid in a Swedish population of women in preterm labor. Acta Obstet Gynecol Scand 2003; 82: 120-128.

24. Horowitz S, Mazor M, Romero R, et al. Infection of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* in the midtrimester of pregnancy. J Reprod Med 1995; 40:375-379.

25. Wenstrom KD, Andrews WW, Bowles NE, et al. Intrauterine viral infection at time of second-trimester genetic amniocentesis. Obstet Gynecol 1998; 92:420-424.

26. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, et al. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. BJOG 2002; 109:527-533.

27. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, et al. The role of inflammation and infection in preterm birth. Semin Reprod Med 2007; 25:21-39.

28. Jalava J, Mantymaa ML, Ekblad U, et al. Bacterial 16S rDNA polymerase chain reaction in the detection of intra-amniotic infection. Br J Obstet Gynecol 1996; 103:664-669.

29. Gardella C, Riley DE, Hitti J, et al. Identification and sequencing of bacterial rDNA in culture-negative amniotic fluid from woman in preterm labor. Am J Perinatol 2004; 21:319-323.

30. Miralles R, Hodge R, McParland PC, et al. Relationship between antenatal inflammation and antenatal infection identified by detection of microbial genes by polymerase chain reaction. Pediatr Res 2005; 57:570-577.

31. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. Obstet Gynecol 2003; 101:178-193.

32. ACOG Practice Bulletin No. 80: premature rupture of membranes. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. ACOG Committee on Practice Bulletins-Obstetrics. Obstet Gynecol 2007; 109:1007-1019.

33. Lee T, Silver H. Etiology and epidemiology of preterm premature rupture of the membranes. Clin Perinatol 2001; 28:721-734.

34. Savitz DA, Blackmore CA, Thorp JM. Epidemiologic characteristics of preterm delivery: Etiologic heterogeneity. Am J Obstet Gynecol 1991; 164:467-471.

35. Silverman RK, Wojtowycz M. Risk factors in premature rupture of membranes. Prim Care Update Ob Gyns 1998; 5:181.

36. Simhan HN, Caritis SN, Krohn MA, et al. The vaginal inflammatory milieu and risk of early premature preterm rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol. 2005; 192:213-218.

37. Kyrklund-Blomberg NB, Granath F, Cnattingius S. Maternal smoking and causes of very preterm birth. Acta Obstet Gynecol Scand 2005; 84:572-527.

38. Casanueva E, Ripoll C, Meza-Camacho C, et al. Possible interplay between vitamin C deficiency and prolactin in pregnant women with premature rupture of membranes: facts and hypothesis. Med Hypotheses 2005; 64:241-247.

39. Yang J, Hartmann KE, Savitz DA, et al. Vaginal bleeding during pregnancy and preterm birth. Am J Epidemiol 2004; 160:118-125.

40. McParland PC, Bell SC. The fetal membranes and mechanisms underlying their labour-associated and pre-labour rupture during pregnancy. Fetal Matern Med Review 2004; 15:73–108.

41. Aagaard-Tillery KM, Nuthalapaty FS, Ramsey PS, et al. Preterm premature rupture of membranes: perspectives surrounding controversies in management. Am J Perinatol 2005; 22: 287-297.

42. Gomez R, Romero R, Edwin SS, et al. Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. Infect Dis Clin North Am. 1997; 11:135-176.

43. Furman B, Shoham-Vardi I, Bashiri A, et al. Clinical significance and outcome of preterm prelabor rupture of membranes: population-based study. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2000; 92:209-216.

44. Menon R, Fortunato SJ. Fetal membranes inflammatory cytokines: a switching mechanism between the preterm premature rupture of membranes and preterm labor pathways. J Perinat Med 2004; 32:391-399.

45. Parry S, Strauss JF, 3rd. Premature rupture of the fetal membranes. N Engl J Med 1998; 338: 663-670.

46. Corchia C, Ferrante P, Da Frè M, et al. Cause-specific mortality of very preterm infants and antenatal events. J Pediatr 2013; DOI: doi: 10.1016/j.jpeds.2012.11.093. *In press.*

47. Storness-Bliss C, Metcalfe A, Simrose R, et al. Correlation of residual amniotic fluid and perinatal outcomes in periviable preterm premature rupture of membranes. J Obstet Gynaecol Can 2012; 34:154-158.

48. Goldenberg RL. The management of preterm labor. Obstet Gynecol 2002; 100:1020-1037.

49. Romero R, Erez O, Espinoza J. Intrauterine infection, preterm labor, and cytokines. J Soc Gynecol Investig 2005;12: 463-465.

50. Noor S, Nazar AF, Bashir R, et al. Prevalance of PPROM and its outcome. J Ayub Med Coll Abbottabad 2007; 19: 14-17.

51. Romero R, Gotsch F, Pineles B, et al. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. Nutr Rev 2007; 65: S194-S202.

52. Hein M, Valore EV, Helmig RB, et al. Antimicrobial factors in the cervical mucus plug. Am J Obstet Gynecol 2002; 187: 137-144.

53. Moore KL, Persaud, TVN. Embriologia clínica. volume 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

54. Benirschke K, Pekarske SL. Placental pathology casebook. Extensive calcification of the umbilical cord and placenta. J Perinatol 1995; 15: 81-83.

55. Rezende J. Obstetrícia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

56. Chua WK, Oyen ML. Do we know the strength of the chorioamnion? A critical review and analysis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2009; 144: S128-S133.

57. Hay ED. Extracellular matrix. J Cell Biol 1981;9:205s-223s.

58. Sánchez RV, Castrejón MC, Orozco YH, et al. Análisis tridimensional de la estructura de las membranas corioamnióticas humanas al término de la gestación. Ginecol Obstet Mex 2008; 76: 38-44.

59. Oyen ML, Cook RF, Stylianopoulos T, et al. Uniaxial and biaxial mechanical behavior of human amnion. Journal of Materials Research 2005; 20: 2902-2909.

60. Casey ML, MacDonald PC. Interstitial collagen synthesis and processing in human amnion: a property of the mesenchymal cells. Biol Reprod 1996; 55: 1253-1260.

61. 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.

62. Calvin SE, Oyen ML. Microstructure and mechanics of the chorioamnion membrane with an emphasis on fracture properties. Ann N Y Acad Sci 2007; 1101: 166-185.

63. Strohl A, Kumar D, Novince R, et al. Decreased adherence and spontaneous separation of fetal membrane layers--amnion and choriodecidua--a possible part of the normal weakening process. Placenta 2010; 31: 18-24.

64. Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, et al. Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. Am J Obstet Gynecol. 2004; 191:1346-1355.

65. King AE, Paltoo A, Kelly RW, et al. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. Placenta 2007; 28:161-169.

66. Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, et al. Inflammation in preterm and term labour and delivery. Semin Fetal Neonatal Med 2006; 11:317-326.

67. Polettini J, Peracoli JC, Candeias JM, et al. 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.

68. Edwards RK. Chorioamnionitis and labor. Obstet Gynecol Clin North Am 2005; 32:287-296.

69. Silva MG, Peracoli JC, Sadatsune T, et al. Cervical *Lactobacillus* and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. Int J Gynaecol Obstet 2003; 81:175-182.

70. Marconi C, de Andrade Ramos BR, Peracoli JC, et al. Amniotic Fluid Interleukin-1 Beta and Interleukin-6, but not Interleukin-8 Correlate with Microbial Invasion of the Amniotic Cavity in Preterm Labor. Am J Reprod Immunol 2011;65:549-556.

71. Sherman DJ, Tovbin J, Lazarovich T, et al. Chorioamnionitis caused by gram-negative bacteria as an etiologic factor in preterm birth. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997; 16:417-423.

72. Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, et al. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal microbiota, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. BJOG 2009; 116:1315-1324.

73. Perni SC, Vardhana S, Korneeva I, et al. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in midtrimester amniotic fluid: association with amniotic fluid cytokine levels and pregnancy outcome. Am J Obstet Gynecol 2004; 191:1382-1386.

74. Kim MJ, Romero R, Gervasi MT, et al. Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection. Lab Invest 2009; 89:924-936.

75. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, et al. The preterm parturition syndrome. BJOG 2006; 113 Suppl 3:17-42.

76. Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera H, et al. In vitro secretion profiles of interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF alpha after selective infection with Escherichia coli in human fetal membranes. Reprod Biol Endocrinol 2007; 5:46.

77. Holmlund U, Cebers G, Dahlfors AR, et al. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. Immunology 2002; 107:145-151.

78. Szukiewicz D, Szewczyk G, Pyzlak M, et al. Increased production of beta-defensin 3 (hBD-3) by human amniotic epithelial cells (HAEC) after activation of toll-like receptor 4 in chorioamnionitis. Inflamm Res 2008; 57 Suppl 1:S67-S68.

79. Haddad R, Gould BR, Romero R, et al. Uterine transcriptomes of bacteria-induced and ovariectomy-induced preterm labor in mice are characterized by differential expression of arachidonate metabolism genes. Am J Obstet Gynecol 2006; 195:822-828.

80. Andrews WW, Goldenberg RL, Faye-Petersen O, et al. The Alabama Preterm Birth study: polymorphonuclear and mononuclear cell placental infiltrations, other markers of inflammation, and outcomes in 23- to 32-week preterm newborn infants. Am J Obstet Gynecol 2006; 195:803-808.

81. Osman I, Young A, Ledingham MA, et al. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. Mol Hum Reprod 2003; 9:41-45.

82. Menon R, Swan KF, Lyden TW, et al. Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1 beta and interleukin-6) in amniochorionic membranes. Am J Obstet Gynecol 1995; 172:493-500.

83. Bauer S, Muller T, Hamm S. Pattern recognition by Toll-like receptors. Adv Exp Med Biol 2009; 653:15-34.

84. Patni S, Flynn P, Wynen LP, et al. An introduction to Toll-like receptors and their possible role in the initiation of labour. BJOG 2007; 114:1326-1334.

85. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell 2006; 124:783-801.

86. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science 1990; 249:1431-1433.

87. Leroy MJ, Dallot E, Czerkiewicz I, et al. Inflammation of choriodecidua induces tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of human myometrial cells. Biol Reprod 2007; 76:769-776.

88. Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, et al. Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. Am J Obstet Gynecol 2004; 191:1346-1355.

89. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol 2002; 20:197-216.

90. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, et al. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? Immunol Today 1993; 14:353-356.

91. Griesinger G, Saleh L, Bauer S, et al. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines of human placental trophoblasts in response to pathogenic bacteria. J Soc Gynecol Investig 2001; 8:334-340.

92. Allport VC, Pieber D, Slater DM, et al. Human labour is associated with nuclear factor-kappaB activity which mediates cyclo-oxygenase-2 expression and is involved with the 'functional progesterone withdrawal'. Mol Hum Reprod 2001; 7:581-586.

93. Romero R, Munoz H, Gomez R, et al. Increase in prostaglandin bioavailability precedes the onset of human parturition. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1996; 54:187-191.

94. Lee DC, Romero R, Kim JS, et al. Evidence for a spatial and temporal regulation of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 expression in human amnion in term and preterm parturition. J Clin Endocrinol Metab 2010; 95:E86-E91.

95. Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, et al. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. Endocr Rev 2000; 21:514-550.

96. Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJ, et al. Cytokines, prostaglandins and parturition--a review. Placenta 2003; 24 Suppl A:S33-S46.

97. Assi F, Fruscio R, Bonardi C, et al. Pentraxin 3 in plasma and vaginal fluid in women with preterm delivery. BJOG 2007; 114:143-147.

98. Deban L, Bottazzi B, Garlanda C, et al. Pentraxins: multifunctional proteins at the interface of innate immunity and inflammation. Biofactors 2009; 35:138-145.

99. Garlanda C, Maina V, Martinez de la Torre Y, et al. Inflammatory reaction and implantation: the new entries PTX3 and D6. Placenta 2008; 29 Suppl B:129-B134.

100. Rovere-Querini P, Antonacci S, Dell'Antonio G, et al. Plasma and tissue expression of the long pentraxin 3 during normal pregnancy and preeclampsia. Obstet Gynecol 2006; 108:148-155.

101. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, et al. The preterm parturition syndrome. BJOG 2006; 113 Suppl 3:17-42.

102. Ashitani J, Mukae H, Hiratsuka T, et al. Plasma and BAL fluid concentrations of antimicrobial peptides in patients with *Mycobacterium avium*-intracellulare infection. Chest. 2001; 119:1131-1137.

103. Soto E, Espinoza J, Nien JK, et al. Human beta-defensin-2: a natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. J Matern Fetal Neonatal Med 2007; 20:15-22.

104. King AE, Paltoo A, Kelly RW, et al. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. Placenta 2007; 28:161-169.

105. Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. Trends Microbiol 2000; 8:402-410.

106. Raj PA, Dentino AR. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. FEMS Microbiol Lett 2002; 206: 9-18.

107. Linzmeier R, Ho CH, Hoang BV, et al. A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. Gene. 1999; 233: 205-211.

108. White SH, Wimley WC, Selsted ME. Structure, function, and membrane integration of defensins. Curr Opin Struct Biol. 1995; 5: 521-527.

109. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nat Rev Immunol. 2003; 3: 710-720.

110. Lehrer RI. Primate defensins. Nat Rev Microbiol. 2004; 2: 727-738.

111. Huttner KM, Bevins CL. Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. Pediatr Res 1999; 45:785-794.

112. Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, et al. Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99:2129-2133.

113. Pazgier M, Hoover DM, Yang D, et al. Human beta-defensins. Cell Mol Life Sci 2006; 63:1294-1313.

114. Harder J, Bartels J, Christophers E, et al. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. J Biol Chem. 2001; 276: 5707-5713.

115. Klotman ME, Chang TL. Defensins in innate antiviral immunity. Nat Rev Immunol. 2006; 6:447-556.

116. Aerts AM, François IE, Cammue BP, et al. The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. Cell Mol Life Sci. 2008; 65:2069-2079.

117. Quiñones-Mateu ME, Lederman MM, Feng Z, et al. Human epithelial beta defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. AIDS 2003;17:39-48.

118. Hoover DM, Rajashankar KR, Blumenthal R, et al. The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. J Biol Chem. 2000; 275: 32911-32918.

119. Yang D, Biragyn A, Hoover DM, et al. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. Annu Rev Immunol 2004; 22: 181-215.

120. Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, et al. Human -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104:18631-18635.

121. Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, et al. Antimicrobial peptides human beta-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. Eur J Immunol 2007; 37: 434-444.

122. Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. Science 2002; 298:1025-1029.

123. Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, et al. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. J Invest Dermatol 2007; 127: 594-604

124. Svinarich DM, Gomez R, Romero R. Detection of human defensins in the placenta. Am J Reprod Immunol 1997; 38:252-255.

125. Bensch KW, Raida M, Magert HJ, et al. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. FEBS Lett 1995; 368:331-335.

126. Valore EV, Park CH, Quayle AJ, et al. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. J Clin Invest 1998; 101:1633-1642.

127. Gankovskaia OA, Koval'chuk LV, Gankovskaia LV, et al. [Role of Toll-like receptors and defensins in antimicrobial protection of urogenital tract in females]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 2008; 1:46-50.

128. Singh PK, Jia HP, Wiles K, et al. Production of beta-defensins by human airway epithelia. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95:14961-14966.

129. Ali RS, Falconer A, Ikram M, et al. Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. J Invest Dermatol 2001; 117:106-111.

130. Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, et al. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. Infect Immun 1998; 66:4222-4228.

131. Zhao C, Wang I, Lehrer RI. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. FEBS Lett. 1996; 396:319-322.

132. Stock SJ, Kelly RW, Riley SC, et al. Natural antimicrobial production by the amnion. Am J Obstet Gynecol 2007; 196:255 e1-6.

133. Joly S, Organ CC, Johnson GK, et al. Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. Mol Immunol 2005; 42:1073-1084.

134. Sorensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, et al. Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. J Immunol 2005; 17:4870-4879.

135. Zhu BD, Feng Y, Huang N, et al. *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) enhances human beta-defensin-1 gene transcription in human pulmonary gland epithelial cells. Acta Pharmacol Sin 2003; 24:907-912.

136. Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, et al. The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. Am J Obstet Gynecol 2004; 191:1678-1687.

137. Harder J, Bartels J, Christophers E, et al. A peptide antibiotic from human skin. Nature 1997; 387:861.

138. Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, et al. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. Am J Respir Cell Mol Biol 2000; 22:714-721.

139. Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I. Modulation of human beta-defensin-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production. J Immunol 2003; 170:4226-4236.

140. King AE, Fleming DC, Critchley HO, et al. Regulation of natural antibiotic expression by inflammatory mediators and mimics of infection in human endometrial epithelial cells. Mol Hum Reprod 2002; 8:341-349.

141. Pioli PA, Weaver LK, Schaefer TM, et al. Lipopolysaccharide-induced IL-1 beta production by human uterine macrophages up-regulates uterine epithelial cell expression of human beta-defensin 2. J Immunol 2006; 176: 6647-6655.

142. Pivarcsi A, Nagy I, Koreck A, et al. Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human beta-defensin-2 in vaginal epithelial cells. Microbes Infect 2005; 7: 1117-1127.

143. Liu AY, Destoumieux D, Wong AV, et al. Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. J Invest Dermatol 2002; 118: 275-281.

144. Bando M, Hiroshima Y, Kataoka M, et al. Interleukin-1alpha regulates antimicrobial peptide expression in human keratinocytes. Immunol Cell Biol 2007; 85:532-537.

145. Dunsche A, Acil Y, Dommisch H, et al. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. Eur J Oral Sci 2002; 110:121-124.

146. Varoga D, Wruck CJ, Tohidnezhad M, et al. Osteoblasts participate in the innate immunity of the bone by producing human beta defensin-3. Histochem Cell Biol 2009;131:207-218.

147. Garcia JR, Jaumann F, Schulz S, et al. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of Xenopus oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. Cell Tissue Res 2001; 306:257-264.

148. Harder J, Bartels J, Christophers E, et al. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. J Biol Chem. 2001; 276: 5707-5713.

149. King AE, Critchley HO, Kelly RW. Innate immune defences in the human endometrium. Reprod Biol Endocrinol 2003; 1:116.

150. Szukiewicz D, Szewczyk G, Pyzlak M, et al. Increased production of beta-defensin 3 (hBD-3) by human amniotic epithelial cells (HAEC) after activation of toll-like receptor 4 in chorioamnionitis. Inflamm Res 2008; 57 Suppl 1:S67-S68.

151. Iavazzo C, Tassis K, Gourgiotis D, et al. The role of human beta defensins 2 and 3 in the second trimester amniotic fluid in prediting preterm labor and premature rupture of membranes. Arch Gynecol Obstet 2010; 281: 793-799.

152. King AE, Fleming DC, Critchley HO, et al. Differential expression of the natural antimicrobials, beta-defensins 3 and 4, in human endometrium. J Reprod Immunol 2003; 59:1-16.

153. García JR, Krause A, Schulz S, et al. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. FASEB J 2001; 15: 1819-1821.

154. Buhimschi IA, Zambrano E, Pettker CM, et al. Using proteomic analysis of the human amniotic fluid to identify histologic chorioamnionitis. Obstet Gynecol 2008;111: 403-412.

Justificativa

O parto prematuro é uma importante intercorrência obstétrica que acomete cerca de 10% das gestações e é a principal causa de morbimortalidade perinatal no mundo. A diversidade de fatores potencialmente envolvidos na etiologia do parto prematuro é, sem dúvida, uma dificuldade para o desenvolvimento de medidas efetivas de prevenção, fato que justifica que apesar de novos tratamentos e estratégias, sua incidência não tem diminuído nos últimos anos.

Muitos estudos da literatura empreendem esforços para elucidar os fatores de risco envolvidos no parto prematuro e destacam desde infecções do trato genital inferior até o componente genético, representado por polimorfismos de genes associados à matriz extracelular e a produção de citocinas inflamatórias.

Já é reconhecido na literatura que a eventos inflamatórios na cavidade amniótica podem estar pronunciados na gestação pré-termo e que as membranas corioamnióticas desempenham papel de barreira imunológica além de servirem de barreira mecânica contra as infecções advindas do trato genital inferior.

Estudos clínicos têm mostrado que a participação da resposta imune inata na interface materno-fetal pode ter impacto no sucesso da gestação. Somado à isso, são crescentes às evidências que o sistema imune inato é ativado nessa interface. Dentre os componentes do sistema imune inato, destaca-se a expressão de agentes antimicrobianos naturais, as β defensinas.

As β defensinas participam da defesa primária do hospedeiro através da interação direta com micro-organismos. Em adição ao seu papel antimicrobiano, podem ativar a imunidade adaptativa durante o processo infeccioso.

Assim, o estudo das β defensinas pode contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia do parto prematuro e sem dúvida encorajar o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção dessa importante adversidade gestacional.

Resumo

Introdução: Eventos inflamatórios na interface mateno-fetal estão pronunciados em gestações complicadas por prematuridade e a corioamnionite é reconhecida como a principal causa de morbimortalidade perinatal. As membranas corioamnióticas desempenham papel fundamental na imunidade inata local e inibem o crescimento de micro-organismos, em parte, pela expressão de β defensinas humanas (HBDs). Essas moléculas são antimicrobianos naturais que apresentam atividade antibatcteriana, antifúngica e antiviral e são produzidas por células epiteliais. **Objetivo:** Quantificar a expressão gênica e avaliar a imunolocalização de HBD-1, HBD-2 e HBD-3 em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por prematuridade. **Pacientes e Métodos:** Trata-se de um estudo prospectivo e transversal. Fragmentos das membranas corioamnióticas foram coletadas de gestantes atendidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. O grupo estudo foi constituído por 25 membranas corioamnióticas de gestantes em Trabalho de Parto Prematuro na presença ou não de Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo que tiveram parto prematuro como desfecho gestacional. Como grupo controle, 27 membranas corioamnióticas de gestações de termo em trabalho de parto foram analisadas. Fragmentos das membranas corioamnióticas foram fixadas em formalina a 10%, embebidas em parafina e seccionadas para análise da imunolocalização de HBD-1, HBD-2 e HBD-3 pela técnica de imunoistoquímica. Outros fragmentos das membranas corioamnióticas foram congelados em nitrogênio líquido e submetidos à extração do RNA total para posterior quantificação da expressão de RNAm de HBD-1, HBD-2 e HBD-3 empregando-se a técnica de PCR em tempo real utilizando o sistema *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems). Os resultados obtidos no estudo foram submetidos

aos testes z e de Mann Whitney. O *software* empregado foi o *SigmaStat* e o nível de significância adotado foi de 5%. **Resultados:** Os dados sócio-demográficos e obstétricos não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto as variáveis idade materna, estado civil, raça, paridade e histórico de complicações obstétricas entre os grupos pré-termo e termo. A expressão gênica de HBD-1, HBD-2 e HBD-3 pelas membranas corioamnióticas não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos parto prematuro HBD-1 (Md =0,62; 0,0-105,0); HBD-2 (Md= 0,17; 0,0-5,2); HBD-3 (Md= 0,11; 0,0-140,5) e termo HBD-1 (Md= 0,80; 0,02-25,0); HBD-2 (Md=0,0; 0,0-43,2); HBD-3 (Md=0,06; 0,0-972,1), p>0,05. Também não houve diferença na expressão gênica das β defensinas de interesse associada à complicação gestacional que originou o parto prematuro como desfecho gestacional e à presença de corioamnionite histológica. A imunomarcação para HBD-1, HBD-2 e HBD-3 foi evidenciada nas células do epitélio amniótico, células coriônicas e deciduais em gestações pré-termo e termo. **Conclusão:** As membranas corioamnióticas são fontes de HBD-1, HBD-2 e HBD-3 e a sua expressão de RNAm não é modulada pela prematuridade.

Palavras-chave: Gestação, Prematuridade, Membranas Corioamnióticas, Beta Defensinas Humanas.

Abstract

Introduction: Inflammatory events can be pronounced in the maternal-fetal interface in pregnancies complicated by prematurity and chorioamnionitis is a major cause of perinatal morbidity and mortality. The chorioamniotic membranes play fundamental role in the local innate immunity and inhibit the microorganisms growth, partly by the expression of human β defensins (HBDs). These molecules are natural antimicrobials that present antibacterial, antifungal and antiviral activities and are produced by epithelial cells. **Objective:** To quantify the expression and to evaluate the immunolocalization of HBD-1, HBD-2 and HBD-3 in chorioamniotic membranes from pregnancies complicated by prematurity. **Study design:** This was a prospective controlled study. Fragments of chorioamniotic membranes were collected from pregnant women admitted at the Obstetrics Unit of the Clinical Hospital of the Botucatu Medical School, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil. The study group consisted of 25 chorioamniotic membranes samples from pregnant women with preterm labor, in the presence or not of Preterm Premature Rupture of Membranes (PPROM), who delivery prematurely. In the control group, 27 chorioamniotic membranes from pregnancies at term in the presence at labor were analysed. Samples of the chorioamniotic membranes were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and sectioned for immunolocalization of HBD-1, HBD-2 and HBD-3 by immunohistochemistry technique. Other chorioamniotic membranes samples were collected in liquid nitrogen and total RNA was extracted to quantify mRNA expression of HBD-1, HBD-2 and HBD-3 using real time quantitative PCR employing the TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Statistical analyses were performed using z and Mann Whitney tests in SigmaStat Software and the level of significance adopted was of 5%. **Results:** In relation to demographic and obstetrics data no statistically significant difference concerning maternal age, marital status, race, parity and history of complications

were observed between pregnancy women in preterm and term groups. The relative expression of HBD-1, HBD-2, and HBD-3 were not significantly different when compared preterm HBD-1(fold-change 0.62 (0.0-105.0)); HBD-2 (fold-change 0.17 (0.0-5.2); HBD-3 (fold-change 0.11 (0.0-140.5))) and term deliveries (HBD-1 (fold-change 0.80 (0.02-25.0)); HBD-2 (fold-change 0.0 (0.0-43.2)); HBD-3 (fold-change 0.06 (0.0-972.1)). The relative amounts of HBD1, HBD2 and HBD3 were not significantly different regarding the pregnancy complications that resulted in preterm delivery (PPROM or PTL with intact membranes) or the presence or absence of histologic chorioamnionitis. HBD-1, HBD-2 and HBD-3 were immunolocalized to amnio, chorion and decidua cells from preterm and term pregnancies. **Conclusion:** Chorioamniotic membranes are sources of HBD-1, HBD-2 and HBD-3 and their mRNA expressions are not moduleted by prematurity.

Keywords: Pregnancy, Prematurity, Chorioamniotic Membranes, Human Beta Defensins.

Beta defensinas em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por prematuridade: expressão gênica e imunolocalização

Nathália Mayumi Noda Nicolau[1], Jossimara Polettini[1], José Carlos Peraçoli[2], Márcia Guimarães da Silva[1].

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho – UNESP".

[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.

*Autor de correspondência

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

Departamento de Patologia

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

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

E-mail: mgsilva@fmb.unesp.br

Este artigo está apresentado de acordo com as normas do European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology (ISSN 0301-2115 – Fator de Impacto: 1.58).

Conclusão

As membranas corioamnióticas são fontes de produção de HBD1, HBD2 e HBD3 e essa expressão não é modulada pela prematuridade.

Abstract

Introduction: Inflammatory events can be pronounced in the maternal-fetal interface in pregnancies complicated by prematurity and chorioamnionitis is a major cause of perinatal morbidity and mortality. The chorioamniotic membranes play fundamental role in the local innate immunity and inhibit the microorganisms growth, partly by the expression of human β defensins (HBDs). These molecules are natural antimicrobials that present antibacterial, antifungal and antiviral activities and are produced by epithelial cells. **Objective:** To quantify the expression and to evaluate the immunolocalization of HBD-1, HBD-2 and HBD-3 in chorioamniotic membranes from pregnancies complicated by prematurity. **Study design:** This was a prospective controlled study. Fragments of chorioamniotic membranes were collected from pregnant women admitted at the Obstetrics Unit of the Clinical Hospital of the Botucatu Medical School, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil. The study group consisted of 25 chorioamniotic membranes samples from pregnant women with preterm labor, in the presence or not of Preterm Premature Rupture of Membranes (PPROM), who delivery prematurely. In the control group, 27 chorioamniotic membranes from pregnancies at term in the presence at labor were analysed. Samples of the chorioamniotic membranes were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and sectioned for immunolocalization of HBD-1, HBD-2 and HBD-3 by immunohistochemistry technique. Other chorioamniotic membranes samples were collected in liquid nitrogen and total RNA was extracted to quantify mRNA expression of HBD-1, HBD-2 and HBD-3 using real time quantitative PCR employing the TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Statistical analyses were performed using z and Mann Whitney tests in SigmaStat Software and the level of significance adopted was of 5%. **Results:** In relation to demographic and obstetrics data no statistically significant difference concerning maternal age, marital status, race, parity and history of complications were observed between pregnancy women in preterm and term groups. The relative expression of HBD-1, HBD-2, and HBD-3 were not significantly different when compared preterm HBD-1(fold-change 0.62 (0.0-105.0)); HBD-2 (fold-change 0.17 (0.0-5.2); HBD-3 (fold-change 0.11 (0.0-140.5))) and term deliveries (HBD-1 (fold-change 0.80 (0.02-25.0)); HBD-2 (fold-change 0.0 (0.0-43.2)); HBD-3 (fold-change 0.06 (0.0-972.1)). The relative amounts of HBD1, HBD2 and HBD3 were not significantly different regarding the pregnancy complications that resulted in preterm delivery (PPROM or PTL with intact membranes) or the presence or absence of histologic chorioamnionitis. HBD-1, HBD-2 and HBD-3 were immunolocalized to amnio, chorion and decidua cells from preterm and term pregnancies. **Conclusion:** Chorioamniotic membranes are sources of HBD-1, HBD-2 and HBD-3 and their mRNA expressions are not moduleted by prematurity.

Keywords: Pregnancy, Prematurity, Chorioamniotic Membranes, Human Beta Defensins.

Introdução

As membranas corioamnióticas formam uma estrutura de extrema importância para o desenvolvimento fetal. Dentre suas principais funções estão a de proteção do feto contra traumas, a de manutenção do volume do líquido amniótico e a de proteção do cordão umbilical e do sangue fetal contra a compressão, além de servirem como barreira mecânica contra infecções vindas do trato genital inferior[1].

Além de revestir a superfície placentária e constituir o saco amniótico, as membranas fetais desempenham funções de manter as condições ideais de esterilidade do líquido amniótico e de ser barreira imunológica. A expressão de mediadores do sistema imune inato, como os receptores *Toll-like* (TLRs) -2 e -4 pelo epitélio amniótico, sugere que esse epitélio não funcione apenas como barreira mecânica aos micro-organismos, mas também na ativação do sistema imune[3] durante a resposta a uma possível invasão microbiana na cavidade amniótica, geralmente advinda do trato genital inferior[4,5].

Outra evidência importante da participação das membranas fetais na imunidade é a produção de agentes antimicrobianos por esse tecido[6]. Dentre os antimicrobianos naturais (AN), destacam-se as β-defensinas humanas (HBDs) que são pequenos peptídeos catiônicos produzidos principalmente por células epiteliais[7], sendo que as HBD-1 e -2 já foram detectadas em monócitos, macrófagos e células dendríticas derivadas de monócitos[8]. Existem cerca de 28 sequências de HBDs já detectadas no genoma humano[8], porém as HBDs1-4 são as que têm sido mais estudadas na última década[9].

As HBDs participam da defesa primária do hospedeiro através da interação direta com micro-organismos[10]. Em adição ao seu papel antimicrobiano, as HBDs podem também ativar a imunidade adaptativa durante o processo infeccioso através da ação quimiotática a componentes do sistema imune como células T, monócitos, células dendríticas imaturas[11,12] e mastócitos[13], atuando, por exemplo, como sinalizadores endógenos de TLRs[12,14]. Além disso, podem induzir a produção de citocinas por monócitos

e por células epiteliais[11,15]. No trato reprodutivo de mulheres não grávidas os AN estão presentes na vagina, cérvix, endométrio e nas tubas uterinas[16]. Na gestação, agentes antimicrobianos são encontrados no líquido amniótico[17,18], decídua, placenta e membranas fetais[19-21].

Os dados da literatura demonstram importância dos antimicrobianos naturais na proteção uterina durante infecção da cavidade amniótica, e nesse sentido já é sugerido que a análise proteômica do líquido amniótico seja uma ferramenta de reconhecimento de presença de corioamnionite histológica[22]. Além disso, Iavazzo et al.[23] concluíram que a presença de HBD-2 no liquido amniótico de gestações do segundo trimestre pode ser considerado um preditor de RPM-PT. Apesar disso, a literatura ainda é escassa quanto à atividade e expressão das HBDs nos tecidos gestacionais pré-termo e/ou na presença de infecção da cavidade amniótica.

Assim, considerando que eventos inflamatórios na cavidade amniótica podem estar pronunciados em gestações pré-termo, e que as membranas têm efeito inibitório sobre o crescimento de muitas bactérias, em parte, pela produção de β defensinas, o objetivo desse estudo é quantificar a expressão gênica e avaliar a imunolocalização de HBD-1, HBD -2, e HBD-3 em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por prematuridade.

Material e Métodos

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, um hospital terciário de referência para gestações de alto risco. As membranas corioamnióticas foram coletadas no período de Janeiro de 2008 a Dezembro de 2012 e a estimativa do tamanho amostral foi baseada na menor diferença de expressão de β defensinas estatisticamente significativa entre os grupos de parto prematuro

em estudo piloto. Dessa forma, assumindo α=0.05 e β=0.20, estimou-se tamanho amostral mínimo de 30 mulheres cada grupo, totalizando 60 mulheres a serem incluídas no estudo.

A população do estudo foi constituída por 25 gestantes em Trabalho de Parto Prematuro com bolsa das águas íntegras ou com Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo que tiveram parto prematuro como desfecho gestacional (Grupo PP). Como grupo controle, 27 gestantes a termo em trabalho de parto foram incluídas no estudo (Grupo PT). Gestantes que apresentaram diabetes, hipertensão, placenta prévia, polidramnia, incompetência istmo-cervical, gemelaridade, anomalias fetais congênitas comprovadas ou fertilização *in vitro* foram excluídas do estudo.

A idade gestacional foi estabelecida pela data da última menstruação e/ou por exame ultrassonográfico precoce (até 20 semanas). Nas gestantes que apresentaram RPM-PT, o diagnóstico foi confirmado pela história clínica e constatação de líquido amniótico na cavidade vaginal ou quando isto não foi possível, por meio de testes realizados na secreção do fundo de saco vaginal: cristalização do esfregaço em lâmina seca, queima de esfregaço em lâmina, pH vaginal e pesquisa de células fetais pela coloração do azul de Nilo[24]. Nesses casos, as pacientes permaneceram internadas na Enfermaria de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, sendo controladas clinicamente por meio de avaliação da frequência cardíaca e temperatura a cada 6 horas e, laboratorialmente por hemograma em dias alternados até a resolução da gestação. O diagnóstico de TPP foi confirmado pela presença de uma ou mais contrações a cada 10 minutos com ritmo e frequência regulares e esvaecimento cervical igual ou superior a 50% e/ou dilatação cervical igual ou superior a 2 cm[25]. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP e todas as pacientes envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa (Protocolo 189/2012).

No momento da resolução da gestação, logo após a dequitação, foram colhidas membranas corioamnióticas de todas as gestantes incluídas no estudo, os quais foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido com posterior armazenamento a -80ºC até a extração do RNA para posterior análise da expressão gênica por PCR em tempo real. Após esse procedimento, o restante das membranas foi fixado em formalina a 10%, e a seguir incluídos em blocos de parafina, os quais foram seccionados obtendo-se cortes de 6 μm de espessura para avaliação histológica e análise da imunolocalização das defensinas de interesse.

A corioamnionite histológica foi diagnosticada através da presença de infiltração neutrofílica presente nas membranas corioamnióticas, de acordo com Yoon et al. [26].

Os fragmentos de membranas corioamnióticas coletados congelados em nitrogênio líquido foram submetidos à extração de RNA total, usando o RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. A integridade do RNA obtido foi determinada por análise em aparelho Bioanalyzer, na qual foram aceitáveis RIN (RNA Integrity Number) igual ou maior que 2. A partir do DNA complementar obtido foi efetuada a amplificação dos genes das β defensinas de interesse em aparelho Line Gene K (Bioer®). Os *primers* e sondas específicos para HBD-1, -2, e -3 foram obtidos do sistema *TaqMan Gene Expression Assay* da *Applied Biosystems*. Paralelamente foi feita a amplificação do gene da TBP (*TATA box binding protein*) como controle endógeno, visto que o valor real de expressão gênica foi dado através da comparação do resultado de amplificação dos genes das β defensinas e TBP. Os níveis de expressão do RNA mensageiro das β defensinas avaliadas foram normalizados com a expressão de TBP pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Para a avaliação da imunoexpressão das β defensinas de interesse foi empregado o protocolo do kit de imunoistoquímica *Mach 4 Universal HRP Polymer Kit with DAB* (Biocare Medical). Para essa detecção, cortes histológicos das membranas corioamnióticas, incluídas em parafina, com espessura aproximada de 6 μm foram colocadas sobre lâminas

histológicas previamente tratadas com Vectabond (Vector Laboratories) e secas em estufa a 60ºC *overnight*. A seguir, os cortes foram submetidos à desparafinização e à recuperação antigênica empregando-se a solução Trilogy durante 30 minutos em banho-maria a 100ºC. Logo após esse procedimento, as lâminas foram lavadas com PBS, procedimento que foi repetido em todas as etapas de lavagem. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio 3% diluído em água por duas vezes de 30 minutos. Em seguida, anticorpos primários anti- HBD-1, HBD-2 e HBD-3 *(*Abcam) foram diluídos em solução de albumina bovina 1%, azida sódica 0,1% em PBS pH 7,4 com posterior incubação em câmera úmida *overnight,* nas diluições de 1:500, 1:250, 1:25 e 1:200 respectivamente. O reagente revelador utilizado foi o DAB com incubação por 5 minutos. A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris, fixada em quatro banhos de etanol absoluto e dois banhos de xilol. Após a coloração, as lâminas foram montadas com Permount e lamínula. Nas lâminas usadas como controle negativo da reação foram omitidos os anticorpos primários e seguido o mesmo protocolo de detecção das β defensinas. A marcação positiva foi detectada como coloração marrom de padrão citoplasmático.

Os dados referentes à idade materna, idade gestacional no momento do parto, peso do recém-nascido e concentração relativa de RNA mensageiro das defensinas nos grupos estudados estão apresentados em mediana seguido de amplitude total (valor mínimo – valor máximo) e foram submetidos ao teste de Mann-Whitney. As variáveis estado civil, raça, paridade e frequência de intercorrências gestacionais anteriores estão apresentados em número de pacientes seguidos de porcentagem (%) e foram submetidas ao teste de comparação de proporção (Teste z). O nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5%. O software utilizado para as análises foi o SigmaStat 3.1 (Jandel Corporation).

Resultados

As variáveis sócio-demográficas e obstétricas das gestantes incluídas no estudo estão apresentadas na Tabela 1. Em relação às variáveis idade materna, estado civil e cor autoreportada não significativa. O peso do recém-nascido foi significativamente maior no grupo PT houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. A mediana da idade gestacional, no momento do parto, foi estatisticamente diferente entre os grupos estudados em virtude do delineamento do estudo. Em relação à história obstétrica, incluindo paridade e intercorrências em gestações anteriores não houve diferença estatisticamente.

À microscopia, todas as membranas corioamnióticas das gestantes do grupo termo apresentaram-se dentro dos limites histológicos de normalidade. No grupo parto prematuro a incidência de corioamnionite foi de 44%, ou seja, 11 membranas corioamnióticas apresentaram infiltrado inflamatório com predomínio de células polimorfonucleares (Figura 1).

As quantificações relativas das expressões gênicas de HBD-1, HBD-2 e HBD-3 pelas membranas corioamnióticas estão apresentadas na Figura 2. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos parto prematuro HBD-1 (Md=0.62; 0,0-105,0); HBD-2 (Md=0,17; 0,0-5,2); HBD-3 (Md=0,11; 0,0-140,5) e termo HBD-1 (Md=0,80; 0,02-25,0); HBD-2 (Md=0,0; 0,0-43,2); HBD-3 (Md=0,06; 0,0-972,1).

As concentrações relativas das as β defensinas de interesse também não mostraram diferenças estatisticamente significativas quanto à presença ou não de corioamnionite histológica (Figura 3) bem como em relação ao desfecho gestacional que deflagrou o parto prematuro (Figura 4).

As membranas corioamnióticas de gestações pré-termo e de termo apresentaram imunomarcação para HBD-1, HBD-2 e, HBD-3. Todas as β defensinas de interesse neste

estudo foram detectadas nas células do epitélio amniótico, células coriônicas e deciduais (Figura 5).

Discussão

O presente estudo demonstrou que as membranas corioamnióticas de gestações pré-termo e de termo são fontes constitutivas ou induzidas de RNA mensageiro de HBD-1, HBD-2 e HBD-3 e que a extensão dessa expressão não é modulada pela presença de prematuridade, RPM-PT e/ou corioamnionite histológica. Contrariando os achados deste estudo, publicações anteriores, no contexto da gestação, descreveram que a expressão de HBD-3 aumenta após estímulo de células amnióticas com LPS, mimetizando a infecção intra-amniótica[21]. Nesse mesmo sentido, Szukiewicz et al.[27] analisando placentas de termo, encontraram aumento da concentração de HBD-3 devido à presença de corioamnionite histológica.

Já é de conhecimento da literatura mundial, que o parto prematuro é um dos desfechos gestacionais desfavoráveis mais importantes na Clínica Obstétrica, em cuja etiologia multifatorial pode-se destacar a infecção da cavidade amniótica e a inflamação intra-amniótica[28]. Nesse cenário, é efetiva a participação de moléculas do sistema imune inato para defesa do hospedeiro e que exibem atividades antimicrobianas contra um largo espectro de bactérias incluindo Gram positivas e Gram negativas, que são os principais micro-organismos envolvidos nas complicações gestacionais que deflagram o parto prematuro. Dentre essas moléculas encontra-se a contribuição das β defensinas, com ação de antimicrobianos naturais, na interface materno-fetal. Entretanto, os resultados encontrados no presente estudo contrariam a hipótese de que membranas corioamnióticas de gestações pré-termo expressam maiores concentrações de β defensinas. Iavazzo et al.[23] também não documentaram associação de HBD-3 no líquido amniótico do segundo

trimestre de gestação e parto prematuro, na presença ou não de Rotura Prematura de Membranas.

Em parte, nossos resultados podem ser explicados pela constituição dos grupos de estudo. Embora o grupo controle tenha sido constituído de gestações de termo, todas as pacientes estavam em trabalho de parto e segundo a literatura, moléculas e receptores envolvidos na resposta imune inata estão amplificadamente expressos em tecidos gestacionais no momento do trabalho de parto[29] com o objetivo de aumentar a proteção do hospedeiro contra invasão microbiana da cavidade amniótica, já que nesse momento a cérvix está dilatada e deixa a cavidade amniótica mais susceptível à infecções. Nesse sentido podemos sugerir que as β defensinas avaliadas estejam super expressas nas membranas corioamnióticas de gestações de termo em virtude do trabalho de parto, o que não torna possível determinar a real influência da prematuridade na expressão desses antimicrobianos naturais. Sem dúvida, a constituição de um grupo controle de gestações de termo, na ausência de trabalho de parto, seria crucial para elucidar essa hipótese.

Outro fato a ser considerado é que a regulação da síntese de β defensinas não é a mesma nos diferentes sistemas, e em membranas corioamnióticas *in vivo* é pouco conhecida. Em alguns tipos celulares como macrófagos uterinos, monócitos de sangue periférico[30] e até células amnióticas em cultura[31], o estímulo com citocinas inflamatórias induz síntese de β defensinas. King et al.[32] descreveram que células epiteliais endometriais aumentam a produção de AN após estímulo com IL-1β, citocina rapidamente produzida após exposição de macrófagos a endotoxinas[33]. Por outro lado, anos mais tarde, esses mesmos autores não encontraram aumento de HBD-1 após estimular células trofoblásticas com IL-1β[19]. Em membranas corioamnióticas, a expressão de β defensinas pode ser influenciada por citocinas, porém independentemente da presença de corioamnionite, uma vez que, em estudo anterior[34], nosso grupo avaliou a concentração de RNA mensageiro de citocinas inflamatórias nessas mesmas amostras e não encontrou diferença significativa de

IL-1β, IL-6, IL-8 ou TNF-α, na presença ou não de infiltrado inflamatório nas membranas corioamnióticas.

Além das diferenças teciduais e celulares de presença e produção de β defensinas, o fator transcricional pode justificar os resultados obtidos, uma vez que a diferença na quantidade de um RNA mensageiro específico entre duas amostras biológicas, não é necessariamente refletido por uma diferença quantitativa equivalente no nível de quantidade da proteína, que muitas vezes está implícito nos estudos.

Há de se ressaltar que o tamanho amostral mínimo inicialmente calculado para o estudo não foi atingido até o momento e que a inclusão de pacientes se faz necessária para confirmação dos resultados obtidos.

Em relação à imunolocalização das β defensinas nas membranas corioamnióticas, nossos resultados corroboram os achados da literatura que HBDs 1-3 são expressas por células do epitélio amniótico, coriônicas e deciduais em gestações pré-termo e de termo[19,35], e que as membranas corioamnióticas não desempenham apenas a função de proteção mecânica, mas também de barreira imunológica, com participação na resposta do hospedeiro à infecções advindas do trato genital inferior.

Assim, considerando a constituição dos grupos e a metodologia empregada no estudo da expressão gênica das β defensinas de interesse, podemos concluir que as membranas corioamnióticas são fontes de produção de HBD-1, HBD-2 e HBD-3 e que essa expressão não é modulada pela prematuridade.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Processos 2010/14724-2 e 2009/52317-2.

Referências

155. Parry S, (Parry and Strauss 1998). Mechanisms of disease: premature rupture of the fetal membranes. N Engl J Med 1998; 338:663-670.

156. Hay ED. Extracellular matrix. J Cell Biol 1981; 9:205-223.

157. Malak T, Ockleford CD, Bell SC, et al. Confocal immunoflorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term fetal membranes. Placenta 1993;14:385-406.

158. Andrews WW, Hauth JC, Goldenberg RL. Infection and preterm birth. Am J Perinatol 2000; 17:357-365.

159. Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2002; 8:3-13.

160. Polettini J, Takitane J, Peraçoli JC, et al. Expression of b defensins 1, 3 and 4 in choriamniotic membranes of preterm pregnancies complicated by chorioamnionitis. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2011; 157:150-155.

161. Huttner KM, Bevins CL. Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. Pediatr Res 1999; 45:785-94.

162. Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, et al. Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99:2129-2133.

163. Pazgier M, Hoover DM, Yang D, et al. Human beta-defensins. Cell Mol Life Sci 2006; 63:1294-1313.

164. Quiñones-Mateu ME, Lederman MM, Feng Z, et al. Human epithelial beta defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. AIDS 2003;17:39-48.

165. Yang D, Biragyn A, Hoover DM, et al. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. Annu Rev Immunol 2004; 22: 181-215.

166. Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, et al. Human -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104:18631-18635.

167. Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, et al. Antimicrobial peptides human beta-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. Eur J Immunol 2007; 37: 434-444.

168. Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. Science 2002; 298:1025-1029.

169. Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, et al. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. J Invest Dermatol 2007; 127: 594-604.

170. Feng Y, Pan X, Huang N, et al. The human beta-defensins expression in female genital tract and pregnancy-related tissues. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2003; 34:217-219.

171. Akinbi HT, Narendran V, Pass AK, et al. Host defense proteins in vernix caseosa and amniotic fluid. Am J Obstet Gynecol 2004;191:2090-2096.

172. Soto E, Espinoza J, Nien JK, et al. Human beta-defensin-2: a natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. J Matern Fetal Neonatal Med 2007; 20:15-22.

173. King AE, Paltoo A, Kelly RW, et al. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. Placenta 2007; 28:161-169.

174. Svinarich DM, Gomez R, Romero R. Detection of human defensins in the placenta. Am J Reprod Immunol 1997; 38:252-255.

175. Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, et al. The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. Am J Obstet Gynecol 2004; 191:1678-1687.

176. Buhimschi IA, Zambrano E, Pettker CM, et al. Using proteomic analysis of the human amniotic fluid to identify histologic chorioamnionitis. Obstet Gynecol 2008;111: 403-412.

177. Iavazzo C, Tassis K, Gourgiotis D, et al. The role of human beta defensins 2 and 3 in the second trimester amniotic fluid in prediting preterm labor and premature rupture of membranes. Arch Gynecol Obstet 2010; 281: 793-799.

178. Rezende J. Obstetrícia. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

179. Gestação de Alto Risco / Secretaria de políticas. Área técnica da saúde da mulher. Brasília: Ministério da Saúde; 2000.

180. Yoon BH, Romero R, Kim CJ, et al. Amniotic fluid interleukin-6: a sensitive test for antenatal diagnosis of acute inflammatory lesions of preterm placenta and prediction of perinatal morbidity. Am J Obstet Gynecol 1995;16:731-744.

181. Szukiewicz D, Szewczyk G, Pyzlak M, et al. Increased production of beta-defensin 3 (hBD-3) by human amniotic epithelial cells (HAEC) after activation of toll-like receptor 4 in chorioamnionitis. Inflamm Res 2008; 57:67-68.

182. Han YW, Shen T, Chung P, et al. Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth. J Clin Microbiol 2009; 47: 38-47.

183. Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, et al. Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. Am J Obstet Gynecol 2004; 191:1346-1348.

184. Pioli PA, Weaver LK, Schaefer TM, et al. Lipopolysaccharide-induced IL-1 beta production by human uterine macrophages up-regulates uterine epithelial cell expression of human beta-defensin 2. J Immunol 2006; 176: 6647-6655.

185. Stock SJ, Kelly RW, Riley SC, et al. Natural antimicrobial production by the amnion. Am J Obstet Gynecol 2007; 196:255-256.

186. King AE, Fleming DC, Critchley HO, et al. Regulation of natural antibiotic expression by inflammatory mediators and mimics of infection in human endometrial epithelial cells. Mol Hum Reprod 2002; 8:341-349.

187. Higgins GC, Foster JL, Postlethwaite AE. Interleukin 1 propeptide is detected intracellularly and extracellularly when human monocytes are stimulated with LPS in vitro. J Exp Med 1994;180:607-614.

188. Polettini J, Peraçoli JC, Candeias JM, et al. 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.

189. King AE, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challiet als JR. Innate immune defences in the human uterus during pregnancy. Placenta 2007; 28: 1099-1106.

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

Variáveis	PP (n=25)	PT (n=27)	*p*
Idade (anos)*	22(14-37)	23(16-38)	0,92
Estado civil**			
Solteira	10 (40%)	9 (33,3%)	0,86
União estável	15 (60%)	18 (66,6%)	0,98
Raça**			
Branca	24 (96%)	22 (81,5%)	0,27
Não-branca	1 (4%)	5 (18,5%)	0,40
Idade gestacional no momento do parto*	33s6d (27s6d-36s5d)	39s5d (37s1d-41s3d)	0,001
Paridade**			
Primigesta	15 (60%)	15 (55,5%)	0,93
Multigesta	10 (40%)	22 (44,5%)	0,83
Peso do recém-nascido (g)*	2130 (1155-3070)	3180 (1695-4360)	0,001
Intercorrências gestacionais anteriores**	5 (20%)	7 (26%)	0,65

*Mediana (Mín-Máx);**n (%); PP= Parto Prematuro; PT= Parto de Termo.

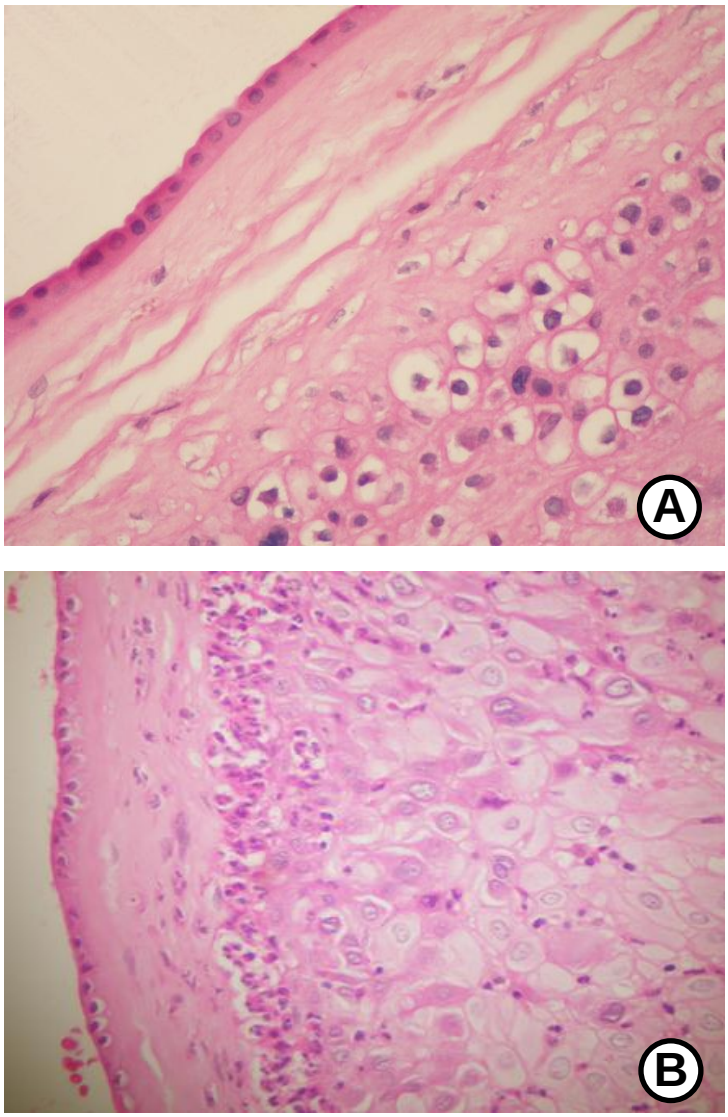

Figura 1: A) Membranas corioamnióticas normais evidenciando o âmnio com epitélio cúbico em monocamada sobre o tecido conjuntivo frouxo avascular, livre de infiltrado inflamatório. HE.200x; B) Membranas corioamnióticas demonstrando extenso infiltrado inflamatório agudo. HE. 200X.

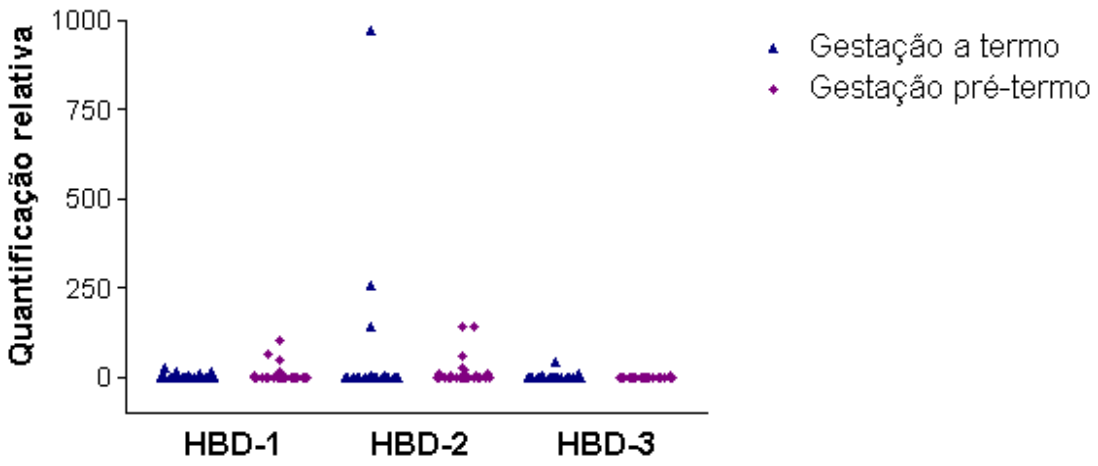

Figura 2: Quantificação relativa de RNAm da HBD-1, HBD-2 e HBD-3 nas membranas corioammnióticas incluídas no estudo agrupadas pela idade gestacional. Teste de Mann Whitney, p>0,05.

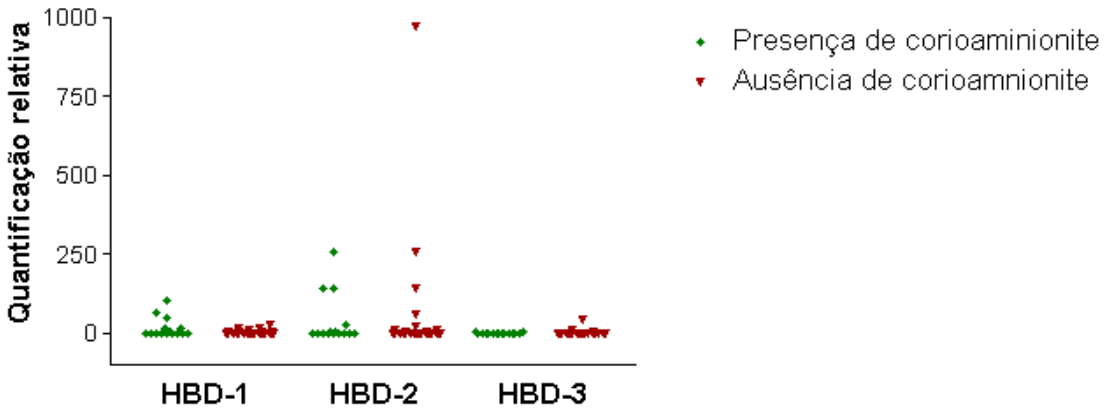

Figura 3: Quantificação relativa do RNAm da HBD-1, HBD-2 e HBD-3 nas membranas corioammnióticas incluídas no estudo agrupadas pelo *status* de presença ou não de corioamnionite histológica.Teste de Mann Whitney, p>0,05.

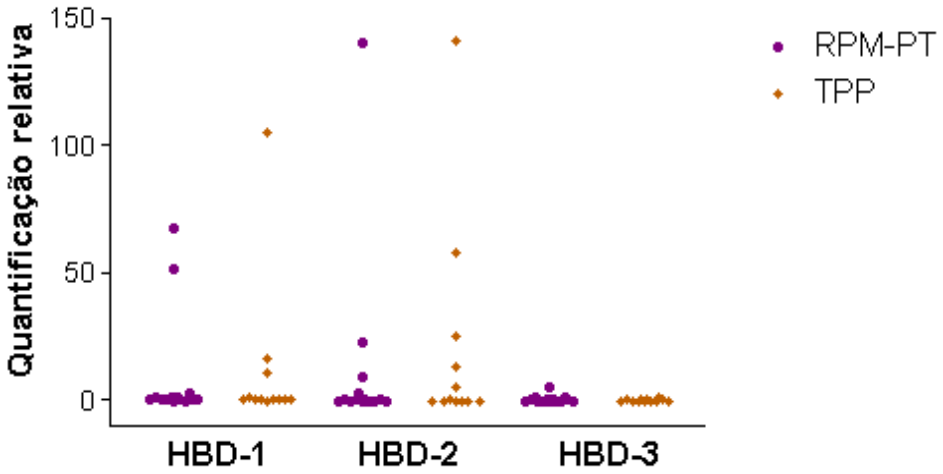

Figura 4: Quantificação relativa do RNAm da HBD-1, HBD-2 e HBD-3 nas membranas corioammnióticas de gestações complicadas pela prematuridade incluídas no estudo agrupadas com relação à presença ou não de Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo. Teste de Mann Whitney, p>0,05.

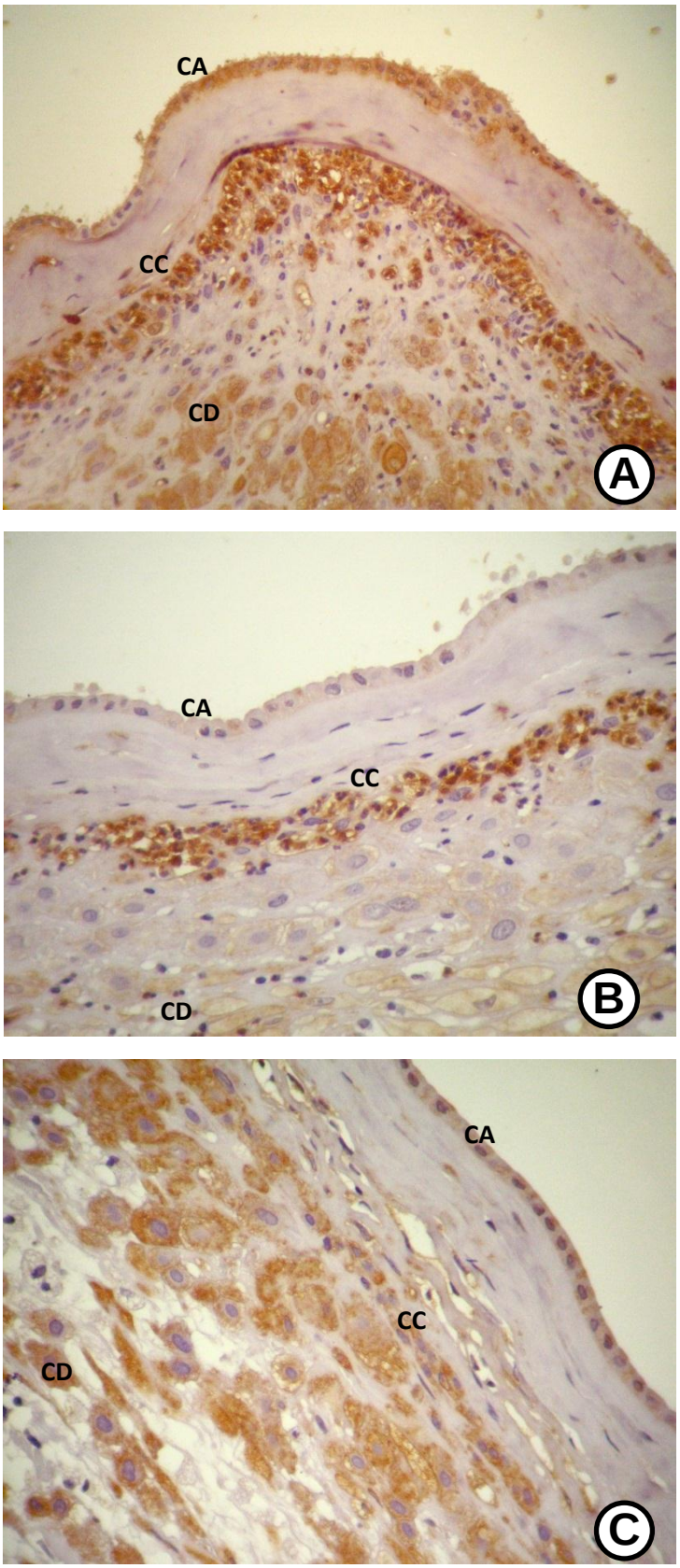

Figura 5: Imunoexpressão de β defensinas nas membranas corioamnióticas. A) HBD-1, B) HBD-2, C) HBD-3 em células amnióticas (CA), coriônicas(CC) e deciduais(CD).

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO PATOLOGIA
Distrito de Rubião Júnior, s/nº - Caixa Postal 564 - CEP 18.618-000 - Botucatu - SP - Brasil
☎ (014)3811-6238 - Ramais 6146/6042/6238 - Fax (014) 3815-2348

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos a senhora a participar da pesquisa "**Beta defensinas em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por prematuridade: expressão gênica, protéica e imunolocalização"** que tem por objetivo estudar a presença de substâncias que agem como antibióticos naturais nas membranas que formam a bolsa das águas de gestações que resultaram em parto antes do momento esperado. No momento do parto, após o nascimento do bebê e a retirada da placenta, um fragmento da bolsa das águas será coletado para análise. O restante da placenta será encaminhado para incineração, conforme realizado em todos os partos. Esta pesquisa é de responsabilidade da pós-graduanda Nathália Mayumi Noda Nicolau, sob orientação da Profª. Drª. Márcia Guimarães da Silva, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, com a participação da pós-doutoranda Jossimara Polettini.

Pelo presente instrumento, eu _____ devidamente esclarecida, ciente da autorização a mim solicitada, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, e ciente, também, de que as informações serão utilizadas exclusivamente pelas pesquisadoras, que manterão sigilo sobre minha identidade, e que as mesmas estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas e de que **posso retirar este consentimento a qualquer hora sem prejuízo do meu atendimento neste serviço,** firmo meu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO,** concordando em participar da pesquisa proposta. Estou ciente também que este estudo não trará benefício imediato para minha gestação, mas poderá produzir conhecimentos para futuras gestações e que não receberei nenhum benefício financeiro por participar do estudo.

Esse documento, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), será elaborado em duas vias, sendo uma entregue a paciente pesquisada e outra será mantida em arquivo pela pesquisadora. Em caso de dúvida, favor ligar para o CEP no telefone (14) 3811-6143.

Botucatu, _____ de _____de 201_.

_____
Assinatura da paciente

_____
Nathália Mayumi Noda Nicolau
Rua Coronel Fonseca,2041, Apto D33
Jardim Bom Pastor, Botucatu, 18603-495
Fone: (14) 97900003
e-mail: nathalia.mayumi@yahoo.com.br

_____
Profª. Drª. Márcia Guimarães da Silva
Rua Izidoro Bertaglia, 746
Jardim Paraíso II, Botucatu, 18610-140
Fone: (14) 3815 24 17
e-mail: mgsilva@fmb.unesp.br

unesp
Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br

Ética

Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 07 de maio de 2012 Of. 189/2012

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

Prezada Drª Márcia,

Informo que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 4191-2012) Beta defensinas em membranas corioamnióticas de gestações complicadas por prematuridade: expressão gênica, protéica e imunolocalização, a ser conduzido por Nathalia Mayumi Noda, orientada por Vossa Senhoria, com a colaboração de Jossimara Polettini, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 07/05/2012.

Situação do Projeto: APROVADO. Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Prof. Dr. Trajano Sardenberg
Coordenador do CEP