

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 21/11/2023.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Geovanna Cristofani Cursino

**Avaliação de mediadores da resposta inflamatória na
interface materno-fetal: Estudo *in vitro* de infecção
bacteriana, isolada ou em combinação com *Mycoplasma
hominis*, em células amnióticas epiteliais imortalizadas**

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Jossimara Poletini

Botucatu

2022

Geovanna Cristofani Cursino

Avaliação de mediadores da resposta inflamatória na interface materno-fetal: Estudo *in vitro* de infecção bacteriana, isolada ou em combinação ao *Mycoplasma hominis*, em células amnióticas epiteliais imortalizadas

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

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Jossimara Poletini

Botucatu
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Cursino, Geovanna Cristofani.

Avaliação de mediadores da resposta inflamatória na interface materno-fetal : estudo *in vitro* de infecção bacteriana, isolada ou em combinação ao *Mycoplasma hominis*, em células amnióticas epiteliais imortalizadas / Geovanna Cristofani Cursino. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Márcia Guimarães da Silva

Coorientador: Jossimara Polettini

Capes: 40105008

1. Técnicas *in vitro*. 2. Infecções bacterianas. 3. Transição epitelial-mesenquimal. 4. Troca materno-fetal. 5. Células epiteliais.

Palavras-chave: Células amnióticas epiteliais imortalizadas (hFM-A; Estudo *in vitro*; Infecção polibacteriana; Resultado gestacional adverso; Transição epitelial-mesenquimal.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, **Doris e Dirceu**, que, mesmo com a distância física, se fizeram presentes em todas as minhas conquistas, pessoais e acadêmicas.

Agradecimientos

Aos **Orixás** e aos meus **Guias espirituais**,
Que me acompanharam, protegeram e me deram força para trilhar esse caminho e por,
mesmo tardiamente, me acolherem e me mostrarem o que é a felicidade genuína na fé.

A minha mãe, **Doris**,
Por sempre me impulsionar a dar meu melhor nos piores momentos, sei que, se não
fosse por ela, eu não estaria aqui. Obrigada por nunca me deixar esquecer da força da mulher
e do que a gente consegue conquistar quando nós seguimos nossos sonhos. Te amo mais do
que eu poderia mensurar em palavras.

Ao meu pai, **Dirceu**,
Que sempre permitiu que minhas escolhas se sobressaíssem às nossas diferenças e
sempre às acolheu, da sua maneira. Obrigada pela troca e pelos ensinamentos, nessa via de
mão dupla. Que esta conquista reflita todo o esforço que tivemos até aqui.

À **minha família**,
Pelo apoio, torcida e comemoração constante de todas minhas vitórias.

Às **mulheres** da minha vida, minha avó materna **Rosa**, minha tia **Analy** e à **Roberta**,
Por compartilharem dos meus momentos mais felizes e mais difíceis, deste plano ou
do outro, e que sempre reconheceram a dor, mas a beleza que é ser mulher. Por serem uma
rede de apoio às pessoas que eu mais amo, por cuidarem e deixarem serem cuidadas. Em um
mundo machista, vocês são minha luta.

À minha orientadora, **Márcia Guimarães da Silva**,
Pela oportunidade em conquistar mais um degrau da minha carreira profissional e por
ser otimista em todos os momentos que tudo pareceu desabar. Que sempre tenha dentro de si
espaço para a profissional competente, mesmo em momentos de sucateamento à pesquisa e
saúde, e pessoa empática a quem lhe recorrer.

Ao **Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal**,
Pelo impulsionamento mútuo, pela constante presença e ajuda na realização deste e a
troca de conhecimento constante. Sei que, todos que pisarem por aí, terão uma experiência
enriquecedora.

Aos meus amigos,
Giovana, Jeniffer, Mariana, Rafael e Vitória, pelo companheirismo, nos perrengues,
e pelo otimismo diário, dentro e fora do laboratório. Desejo a vocês o maior reconhecimento e
sucesso profissional e pessoal que têm pela frente.

Ao meu trio, **Carolina e Guilherme**, e às suas respectivas famílias,
Que iniciaram este caminho comigo e que participaram ativamente no processo de
formar o que eu sou hoje. Obrigada por terem me ensinado e me acolhido como uma família,
mesmo estando tão distante à minha.

À **Milena**,
Por me acompanhar durante tantos anos mesmo, majoritariamente, à distância. Você
me fez acreditar, nos momentos mais solitários, que a amizade é muito mais do que a
constância. Obrigada por ser meu silêncio confortável e por me trazer pra realidade.

Ao meu namorado, **Lucas**,
Que chegou na minha vida despretensiosamente e que me ensina, todos os dias, que
uma vida regada a sorrisos, demonstração sincera de amor e respeito é muito mais leve e
gostosa de ser vivida. Obrigada por me ensinar o verdadeiro significado da soma.

À **Ivana** e ao **Departamento de Imunologia e Microbiologia**,
Por nunca medir esforços para me ajudar na realização deste trabalho, desde doação do
tempo, conhecimento, compartilhamento de materiais e interesse genuíno.

Ao professor **Hélio Miot e Luzia Aparecida Trinca**,
Pelo auxílio e por fazer todos os números se transformarem em dados e somarem,
ainda mais, à produção científica brasileira com atenção à saúde.

Ao professor **Ramkumar Menon** e à **University of Medical Brunch (UTMB)**,
Pela doação da linhagem celular imprescindível para a realização deste estudo.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Patologia**, particularmente a **Vânia**,
Pelo acolhimento carinhoso de todas as dúvidas e perturbações, independente da hora
do dia.

Ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),

Pelo auxílio financeiro, durante esta trajetória. Deixo como registro, aqui, que as instituições de fomento continuem a possibilitar a realização de pesquisa no país, mesmo com a constante tentativa do sucateamento da educação. O Brasil é mais do que capaz, e torço, fielmente, para que um dia possamos realmente refletir, cientificamente, as mentes brilhantes que nós temos.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp) e ao

Instituto de Biociências de Botucatu (IBB),

Por ter me desafiado desde o primeiro dia que tive a oportunidade de frequentar a universidade e por me mostrar realidades diferentes da minha, bagagem esta que me tornou mais empática e humana. Que muitos, depois de mim, tenham as mesmas oportunidades que tive e que a universidade pública resista, que forme mentes pensantes que respeitem o coletivo da mesma forma que respeitam o individual.

Por fim, agradeço a mim, **Geovanna,**

Por não ter desistido no meio do caminho, por ter resistido estar longe de casa e por ter feito todas as adversidades um obstáculo a mais de serem superados. Hoje, consigo olhar com mais respeito e carinho à menina que chegou em Botucatu em 2016. Sei que ela estaria orgulhosa da profissional que se tornou, mas também pela pessoa que nos tornamos.

Resumo

Introdução: Apesar da etiologia multifatorial, uma das principais causas do Parto Pré-termo espontâneo (PP) é a infecção intra-amniótica por táxons bacterianos comumente pertencentes ao *core* patológico de disbioses vaginais, como a vaginose bacteriana e a vaginite aeróbia. Como expectável, há uma complexidade neste cenário infeccioso, devido a presença de diferentes interações bacterianas e assinaturas inflamatórias associadas, sendo que a participação conjunta dos micoplasmas genitais, embora conhecida, ainda se encontra em definição do real potencial patogênico. Além da infecção da cavidade amniótica, outro novo processo conhecido na fisiopatologia do PP é a transição epitelial-mesenquimal (EMT) nas membranas corioamnióticas, que tende a ser mediada, pela ação de p38MAPK, em resposta ao estresse oxidativo/ inflamatório. O objetivo desse estudo foi avaliar a regulação de mediadores da resposta inflamatória, em modelo *in vitro*, de células amnióticas epiteliais imortalizadas (hFM-AECs) desafiadas por diferentes espécies bacterianas, isoladas e em combinações com *Mycoplasma hominis*, bem como a interferência deste estímulo sobre a transição epitelial-mesenquimal. **Materiais e Métodos:** Três repetições de ensaio *in vitro* com hFM-AECs desafiadas com diferentes espécies isoladas e em combinações bacterianas com *M. hominis* foram realizadas nos momentos do estímulo e após 6h, 12h, 18h e 24h. Para avaliar a regulação inflamatória, em cada um dos desafios, os sobrenadantes foram coletados nos diferentes momentos e congelados em -80°C para posterior quantificação de Interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos e Granulócitos (GM-CSF), Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α , β -defensina (HBD)-1, HBD-2 e HBD-3 empregando-se a técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA). Para o estudo morfológico da EMT, as células amnióticas foram fixadas em paraformaldeído para posterior análise através do *cell shape index* (CSI). Os dados obtidos foram submetidos a um modelo de efeitos mistos combinado com *bootstrapping* paramétrico. Os dados dos mediadores foram apresentados em média seguidos de IC95% em relação ao controle negativo. Para a análise da EMT foram utilizados os testes One Way ANOVA e Teste T pareado. **Resultados:** (a) Níveis significativamente elevados de IL-6, IL-8, GM-CSF e HBD-1 foram detectados em relação à referência quando estimulado com *Fusobacterium nucleatum*, isolado ou em combinação com *M. hominis*, ao longo das 24 horas de estímulo; (b) Níveis de IL-13 diminuíram significativamente em relação ao controle negativo após 18 horas de estímulo com *F. nucleatum*, *Bacteroides fragilis*, *Peptostreptococcus anaerobius* e *Streptococcus agalactiae* isolados e em combinação com *M. hominis*; (c) A produção de TNF- α , HBD-2 e HBD-3 não diferiu do controle negativo, independentemente do tempo de estímulo e das combinações bacterianas; (d) Níveis de IL-1 β e IL-10 não foram detectados nos experimentos realizados; (e) No início do estímulo bacteriano, nenhum dos

grupos diferiu da referência e todos apresentavam morfologia epitelial (0.7-0.9); (f) Diferentes isolados, *M. hominis*, *F. nucleatum* e *S. agalactiae*, e *F. nucleatum*, *B. fragilis* e *P. anaerobius* em combinação com *M. hominis* estimularam significativamente a EMT; (g) Apesar da significância estatística, as células não assumiram aspectos mesenquimais, de acordo com o *cell shape index* (0.4-0.6), mas se encontraram na faixa que delimita ambos tipos morfológicos (0.6-0.7), conhecida como metaestado. **Conclusão:** O PP é uma síndrome inflamatória multifatorial que requer a compreensão da dinâmica dos vários fatores envolvidos no seu desencadeamento, em particular a infecção da cavidade amniótica e a inflamação. O presente estudo demonstrou que, considerando as espécies bacterianas avaliadas, o *F. nucleatum*, isolado ou em combinação com *M. hominis*, tem uma importante capacidade de induzir uma assinatura inflamatória característica. Além disso, foi demonstrado que, além dos mediadores inflamatórios, as combinações bacterianas estimulam a transição epitelial-mesenquimal e, consequentemente, geram membranas corioamnióticas mais frágeis e mais susceptíveis à rotura. Finalmente, são necessários estudos futuros para enriquecer estas descobertas e orientar uma implementação de medidas que possam reduzir as consequências a curto e longo prazos e atuar como intervenção preventiva.

Palavras-chave: Estudo *in vitro*; células amnióticas epiteliais imortalizadas (hFM-AECs); resultado gestacional adverso; micoplasmas genitais; infecção polibacteriana; transição epitelial-mesenquimal.

Abstract

Introduction: Despite the multifactorial etiology, one of the main causes of spontaneous preterm birth (PB) is intra-amniotic infection by bacterial taxa commonly belonging to the pathological *core* of vaginal dysbioses, such as bacterial vaginosis and aerobic vaginitis. As expected, there is complexity in this infectious scenario, due to the presence of different bacterial interactions and associated inflammatory signatures, and the joint participation of genital mycoplasmas, although known, is still under definition regarding the real pathogenic potential. Besides the infection of the amniotic cavity, another new process known in the pathophysiology of PB is the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of the chorioamniotic membranes, which tends to be mediated, by p38MAPK pathway, in response to oxidative/inflammatory stress. The aim of this study was to evaluate the regulation of mediators of the inflammatory response, in an *in vitro* model, of immortalized epithelial amniotic cells (hFM-AECs) challenged by different bacterial species, alone and in combinations with *Mycoplasma hominis*, as well as the interference of this stimulus on the epithelial-mesenchymal transition. **Materials and Methods:** Three repetitions of *in vitro* assay with hFM-AECs challenged with different isolated species and in combinations with *M. hominis* were performed at the time of stimulus and after 6h, 12h, 18h and 24h. To evaluate the inflammatory regulation, in each of the challenges, supernatants were collected at the different times and frozen at -80°C for subsequent quantification of Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Tumor Necrosis Factor (TNF)- α , β -defensin (HBD)-1, HBD-2 and HBD-3 by employing the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique. For the morphological study of EMT, amniotic cells were fixed in paraformaldehyde (PFA) for further analysis by the cell shape index (CSI). The data obtained were subjected to a mixed effects model combined with parametric bootstrapping. The mediators data were presented as mean followed by 95% CI in relation to the negative control. One Way ANOVA and paired T-test were used for the EMT analysis. **Results:** (a) Significantly elevated levels of IL-6, IL-8, GM-CSF and HBD-1 were detected in relation to the reference when stimulated with *Fusobacterium nucleatum*, alone or in combination with *M. hominis*, over the 24 hours of stimulation; (b) IL-13 levels were significantly decreased in relation to the negative control after 18 hours of stimulation with *F. nucleatum*, *Bacteroides fragilis*, *Peptostreptococcus anaerobius* and *Streptococcus agalactiae* alone and in combination with *M. hominis*; (c) TNF- α , HBD-2 and HBD-3 production did not differ from the negative control, regardless of stimulus time and bacterial combinations; (d) Levels of IL-1 β and IL-10 were not detected in the experiments performed; (e) At the onset of bacterial stimulation, none of the groups differed from the reference and all showed epithelial morphology (0.7-0.9); (f) Different

isolates, *M. hominis*, *F. nucleatum* and *S. agalactiae*, and *F. nucleatum*, *B. fragilis* and *P. anaerobius* in combination with *M. hominis* significantly stimulated EMT; (g) Despite statistical significance, the cells did not assume mesenchymal aspects according to the cell shape index (0.4-0.6), but were in the range that delimits both morphological types (0.6-0.7), known as the metastate. **Conclusion:** PTB is a multifactorial inflammatory syndrome that requires an understanding of the dynamics of the various factors involved in its triggering, in particular the infection of the amniotic cavity and consequent inflammation. The present study demonstrated that considering the bacterial species evaluated, *F. nucleatum* alone or in combination with *M. hominis*, have an important capacity to induce a characteristic inflammatory signature. Furthermore, it has been shown that in addition to inflammatory mediators, bacterial combinations stimulate EMT and, consequently, generate more fragile chorioamniotic membranes that is more susceptible to rupture. Finally, future studies are needed to enrich these findings and guide an implementation of measures that can reduce short- and long-term consequences and act as a preventive intervention.

Keywords: *In vitro* study; immortalized amnion epithelial cells (hFM-AECs); adverse pregnancy outcome; genital mycoplasmas; polybacterial infection; epithelial-mesenchymal transition (EMT).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AN	Antimicrobianos naturais
CD4⁺	<i>Cluster of differentiation 4⁺</i>
COX	Cicloxygenase
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos
HBDs	β-defensinas humanas
hFM-AECs	Células amnióticas epiteliais imortalizadas
IL	Interleucina
MEC	Matriz extracelular
MET	Transição mesenquimal-epitelial
OOC	Organ-On-Chip
PAMP	Padrão molecular associado à patógeno
PG	Prostaglandina
PP	Parto pré-termo
PVL	<i>Panton-Valentine leukocidin</i>
RPM-PT	Rotura prematura de membranas pré-termo
RRP	Receptor de reconhecimento padrão
SASP	<i>Senescence-associated secretory phenotype</i>
TLR	<i>Toll-Like receptor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TPP	Trabalho de parto pré-termo
VA	Vaginite aeróbia
VB	Vaginose bacteriana

Sumário

Sumário

Capítulo I.....	18
Revisão de Literatura.....	19
1. Introdução.....	20
2. Referências bibliográficas.....	35
Capítulo II.....	41
Artigo científico.....	42
ABSTRACT.....	44
GRAPHICAL ABSTRACT.....	45
1. INTRODUCTION.....	46
2. MATERIAL AND METHODS.....	47
2.1 Immortalized amnion epithelial cells (hFM-AEC) culture.....	47
2.2 Bacterial culture.....	48
2.3 Stimulation of hFM-AEC.....	48
2.4 Immunoassays.....	49
2.5 Microscopy analysis and cell shape index (CSI) evaluation.....	50
2.6 Statistical analysis.....	50
3. RESULTS.....	50
3.1 Evaluation of inflammatory biomarkers after bacterial stimulation.....	50
3.2 Characterization of Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) after bacterial stimulation.....	58
4. DISCUSSION.....	59
5. CONCLUSION.....	62
6. FUNDING INFORMATION.....	62
7. CONFLICTS OF INTEREST.....	63
8. ETHICS STATEMENTS.....	63
9. REFERENCES.....	64
Anexos.....	69

Capítulo I

1. Introdução

O sucesso gestacional é determinado pela dinâmica, balanceada, de componentes biológicos com diferentes características moleculares, morfológicas, imunológicas e fisiológicas que permeiam o desenvolvimento do feto ao longo da gestação. A interface materno-fetal é composta por estruturas distintas, porém, com um objetivo comum: manter o microambiente intrauterino funcional que permita o desenvolvimento do feto ao longo das 41 semanas de gestação. As membranas corioamnióticas são um exemplo destas estruturas, sendo responsáveis por garantir proteção mecânica e imune somada ao aporte endócrino ao longo da gestação (1).

As membranas corioamnióticas são constituídas por múltiplas camadas, desde a mais interna, o âmnio, até a mais externa, o córion. O âmnio é constituído pelo epitélio amniótico, uma monocamada de células cuboides resistentes à distensão e ao estresse mecânico que mantém contato direto com o líquido amniótico, suportado por uma camada basal compacta seguida de células amnióticas mesenquimais embebidas em uma matriz extracelular (MEC) rica em colágeno do tipo IV e fibroblastos. Devido à sua constituição, o âmnio é o principal responsável pela promoção da força tênsil e manutenção da estrutura íntegra das membranas ao longo da gestação. Somado a isso, é fonte de fatores biologicamente ativos, tem atividade inflamatória regulada, seja por fatores pró- ou anti-inflamatórios, e expressa fatores intermediários, tanto epiteliais e mesenquimais, que auxiliam no remodelamento tecidual (1,2).

O córion, por sua vez, mantém contato com a decídua, constituinte materno da interface materno-fetal. Esse é responsável por prover suporte físico ao âmnio, impedindo sua degradação, e funciona como uma barreira ao sistema imune materno, permeando o desenvolvimento de um feto alogênico, pela constituição compartilhada com antígenos paternos, através do desenvolvimento de uma tolerância imunológica (3,4). É constituído por uma camada externa formada pelo trofoblasto, sendo chamada citotrofoblasto, e uma camada interna formada pelo mesoderma somático, chamada sinciotrofoblasto. Ambas as camadas

celulares se encontram embebidas em uma MEC composta por colágeno, elastina e microfibrilas e, as duas últimas, garantem propriedade viscoelástica à membrana e garantem o desenvolvimento fetal. Distribuídas nas camadas coriônicas há células mesenquimais, fibroblastos e macrófagos teciduais que produzem mediadores inflamatórios e auxiliam o remodelamento da membrana através da redistribuição dos componentes da própria MEC. As células coriônicas contêm marcadores de células-tronco combinados a uma maior quantidade de fatores de crescimento e citocinas comparado ao âmnio, tendo um efeito antibacteriano superior as camadas mais internas (Figura 1) (1,3).

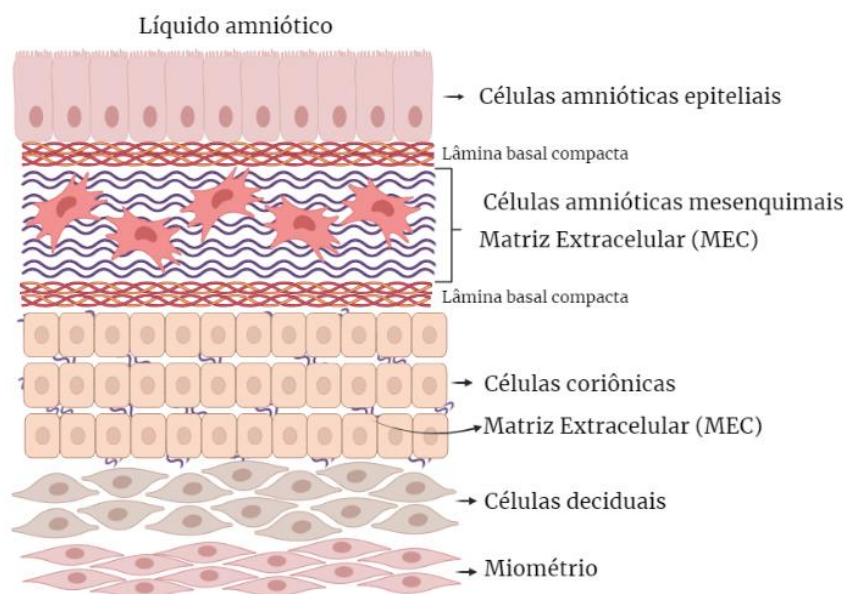


Figura 1. Representação morfológica da interface materno-fetal. Há a representação, desde a camada mais interna em contato com o líquido amniótico, o âmnio, à mais externa, a decidua, da interface materno-fetal. As membranas corioamnióticas constituem o compartimento fetal e permeiam, através de suas propriedades que variam desde níveis físicos a fisiológicos e imunológicos, o sucesso da gestação.

Com base na constante necessidade fisiológica do remodelamento das membranas corioamnióticas, em particular do âmnio, ao longo da gestação e no momento do trabalho de parto, avaliou-se o papel celular frente ao estresse e distensão mecânica, que permeiam o acúmulo de microfraturas e requerem constante reparo (5). Estudos recentes demonstraram que

os mecanismos envolvidos neste processo são mediados pela ação combinada de células epiteliais e mesenquimais do âmnio. As células amnióticas são capazes de proliferar, migrar e, devido as características pluripotentes, são capazes de, constantemente, flutuarem entre os morfotipos epiteliais e mesenquimais de acordo com a necessidade tecidual. Este evento é descrito não apenas através de modificações morfológicas, mas também em relação à expressão de marcadores da natureza celular bem como ao comportamento fisiológico esperado da linhagem celular em questão. Esta capacidade é descrita como transição epitelial-mesenquimal (EMT – *Epithelial-Mesenchymal transition*) bem como mesenquimal-epitelial (MET – *Mesenchymal-Epithelial transition*) de acordo com a transformação ocorrida. Além dos dois estados bem definidos, é possível que estas células se encontrem em um chamado “metaestado”, expressando não apenas um tipo de marcador celular, mas a concomitância de marcadores epiteliais e mesenquimais (5–7). Estudos recentes demonstraram que o processo de transição tende a ser mediado, em parte, pela p38 MAPK em resposta ao estresse oxidativo (8). Apesar de ser um processo esperado, quando há a falha no reparo das microfraturas, há a perda de integridade e, conseqüentemente, uma maior predisposição a resultados gestacionais adversos (5,9,10).

O sucesso gestacional é resultado da sinergia de fatores intrínsecos, à mãe e ao feto, e fatores extrínsecos. Apesar disto, a fim de tornar a gestação possível, há a participação decisiva do sistema imune materno, que desenvolve um padrão ao longo da gestação, e possibilita haja uma tolerância imunológica ao feto, uma vez que o mesmo é identificado como um aloenxerto, visto que sua constituição é 50% pela participação de antígenos paternos (4). Desta forma, o microambiente materno-fetal não exhibe propriedades de supressão, mas sim, modulação imunológica (11).

Preconiza-se que haja um balanço dinâmico na produção das citocinas, de forma que no primeiro trimestre gestacional há o predomínio do perfil Th1, no qual o microambiente pró-

inflamatório torna-se necessário tanto para permitir o correto reparo do endométrio, após a implantação do feto, quanto para remoção de *debris* celulares remanescentes; o segundo trimestre gestacional é caracterizado pelo predomínio do perfil Th2, com aumento de citocinas com atividade anti-inflamatória, importantes para a manutenção da gestação; por fim, no terceiro trimestre gestacional e no momento do parto, o predomínio volta a ser do perfil Th1 e possibilita a expulsão do feto (12–16).

O desfecho gestacional a termo é caracterizado por um conjunto de eventos que, em cascata, desencadeiam a expulsão do feto após a 37ª semana de gestação. Os sinais clínicos envolvem a indução da contratilidade miometrial, aumento da dilatação cervical e rotura das membranas corioamnióticas (17). O miométrio, durante a progressão da gestação, encontra-se quiescente devido a um balanço imunológico, entre os perfis Th1 e Th2, bem como pela ação da progesterona, a qual reprime a expressão gênica de mediadores inflamatórios e proteínas associadas a contração. Próximo ao momento do parto, há um aumento da expressão da família miR-200, responsável por estimular o catabolismo da progesterona, e, conseqüentemente, permitir a contratilidade miometrial (18). A dilatação cervical é um processo físico, que resulta da redução da capacidade tênsil da cérvix devido à alteração da matriz extracelular, como a perda da estruturação do colágeno, aumento da produção de glicosaminoglicanos e alteração de barreira epitelial e imune (19). Por fim, há rotura das membranas corioamnióticas devido a ativação dos tecidos materno-fetais. A placenta, bem como as membranas corioamnióticas, são tecidos temporários no corpo humano, de forma que, à medida que a gestação progride, confluem para a senescência (20). Células senescentes alteram sua expressão gênica, com conseqüente mudança na expressão de proteínas secretadas, como fatores de crescimento, proteases, quimiocinas e citocinas, conjunto de alterações conhecido como *senescence-associated secretory phenotype* (SASP) o qual descreve uma tendência pró-inflamatória que

gera alterações que se guiam desde níveis moleculares à anatômicos e, conseqüentemente, prejudicam a integridade das membranas corioamnióticas (21,22).

Apesar de compartilharem parte da mesma evolução clínica, uma vez que o desencadeamento do trabalho de parto ocorra em gestações de termo, o trabalho de parto pré-termo (TPP) é uma síndrome inflamatória com etiologia multifatorial que atinge cerca de 5-18% das gestações ao redor do mundo (23). Esse é definido como àquele que ocorre previamente à 37ª semana de gestação, sendo a principal causa de morte neonatal combinado a comorbidades de curto e longo prazos (24,25). A principal consequência desta intercorrência é o parto pré-termo (PP), que atinge cerca de dois terços das gestações que apresentam TPP espontâneo (26).

Estudos anteriores descreveram a etiopatologia do PP através de fatores de risco que têm uma assinatura morfológica, bioquímica oxidativa e inflamatória específica e capaz de ativar os tecidos materno-fetais previamente à 37ª semana de gestação (27–29). Apesar da ampla diversidade destes fatores, a cascata inflamatória ainda é uma das principais causas da ocorrência do PP (30) e, por sua vez, está intimamente relacionada, mesmo que não exclusivamente (20), à infecção intra-amniótica. Entende-se como infecção intra-amniótica a invasão microbiana da cavidade amniótica associada à uma inflamação intra-amniótica, na presença ou ausência de sinais clínicos de infecção (31,32).

O acesso destes microrganismos às membranas corioamnióticas, seguido do estabelecimento da infecção, se dá através da ascensão transcervical advinda do trato genital inferior. Kim *et al.* (33) propuseram um modelo de invasão da cavidade amniótica que referencia o acesso à cavidade amniótica, através de uma região restrita, seguida de sua proliferação intra-amniótica e, por fim, seu espraiamento e adesão às membranas corioamnióticas, iniciando pelo âmnio.

No cenário de invasão da cavidade amniótica, todos os estratos da interface materno-fetal contribuem com a produção de mediadores inflamatórios (34), pois expressam receptores de reconhecimento padrão (RRP), os *Toll-Like receptors* (TLRs), capazes de identificar os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que são sequências conservadas de DNA ou RNA, proteínas, lipídeos e polissacarídeos presentes na membrana ou envelope dos microrganismos (35), e descrevem a primeira linha de defesa durante a gestação (36,37). Estes receptores são expressos por todos os estratos da interface materno-fetal, desde o epitélio amniótico, células coriônicas e células decíduais, com particular enfoque para o TLR-2 e TLR-4, principalmente no terceiro trimestre. Entretanto, sabe-se que, ao longo da gestação, todos os tipos de TLRs (TLR1-TLR10) são expressos de maneira espaço-temporal específica (35,38). O TLR-2 é responsável pelo reconhecimento de lipoproteínas associadas a micobactérias, peptidoglicanos e bactérias Gram-positivas (39); o TLR-4 reconhece o lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede celular de bactérias Gram-negativas (40).

Partindo do pressuposto que o TPP compreende uma síndrome inflamatória, a ascensão destes microrganismos é capaz de suscitar uma resposta inflamatória não programada e, conseqüentemente, perturbar o perfil estabelecido para o sucesso gestacional (16). O reconhecimento dos patógenos estimula a produção de mediadores inflamatórios, com particular destaque para as citocinas, interleucina (IL)-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral (TNF - *Tumor Necrosis Factor*)- α , e quimiocinas, como IL-8 e fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF - *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), que recrutam células inflamatórias, como os neutrófilos, para o nicho da infecção, amplificando a resposta, bem como ativando as fosfolipases, enzimas responsáveis por desencadear a via de metabolização do Ácido Araquidônico, pela via da cicloxigenase (COX)-1, e produzir mediadores como as prostaglandinas (PG), em particular, a E2, responsável pelo estímulo da contratilidade miometrial. Estes mediadores também estimulam a função das

metaloproteinases, que enfraquecem as membranas corioamnióticas e induzem a rotura das mesmas (41).

A resposta inflamatória suscitada pelos microrganismos apresenta duas frentes principais, pró- e anti-inflamatória. A resposta pró-inflamatória é desencadeada com o intuito de eliminação do agente patogênico, sendo que compreende a participação das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6, responsáveis por desencadear e amplificar a resposta pró-inflamatória, e as quimiocinas IL-8 e GM-CSF, responsáveis pela quimiotaxia dos neutrófilos e monócitos, respectivamente. Em contrapartida, a resposta anti-inflamatória é responsável por conter e balancear esta reação pró-inflamatória, a fim de limitar os danos teciduais, tendo como principais mediadores a IL-10 e IL-13 (42).

A IL-1 β e o TNF- α são citocinas pró-inflamatórias produzidas, principalmente, por monócitos teciduais ativados, mas também por outros tipos celulares, incluindo células epiteliais e linfócitos T. Em um cenário inflamatório, o estímulo da transcrição dos genes relacionados se dá pelo reconhecimento dos PAMPS pelos TLRs, entretanto, a produção da forma biologicamente ativa da IL-1 β requer a participação do inflamassomo. As principais funções relacionadas às estas citocinas são ativação endotelial, estimulando a expressão de moléculas de adesão endotelial, a produção de outros mediadores, como mecanismo de amplificação da resposta inflamatória e da atividade pró-coagulante endotelial; ativação celular, sendo que o TNF- α e a IL-1 β estimulam a resposta de neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, células mesenquimais, e a ativação do perfil Th17; resposta sistêmica aguda, através de regulações térmicas, de metabolismo lipídico, proteico, etc (42,43).

A IL-6 é uma citocina produzida por vários tipos celulares, incluindo macrófagos, células endoteliais e células T e apresenta atividade sobre a resposta sistêmica aguda, síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado e estimula a proliferação de linfócitos B produtores de anticorpos (42,43). Esta citocina é pleiotrópica, ou seja, sua atividade varia de acordo com a

sinalização clássica ou trans. A sinalização clássica é descrita pela interação da IL-6 com seu respectivo receptor de membrana (mIL6-R) e age de forma anti-inflamatória; a trans, por sua vez, permeia a interação da IL-6 com seu respectivo receptor solúvel (sIL-6R) e tem efeito pró-inflamatório. Independentemente da via, a IL-6 só interage com o receptor após a homodimerização com a subunidade β da glicoproteína 130 (gp130); porém, na presença do gp130 solúvel, um antagonista natural da sinalização trans, há a neutralização da bioatividade da IL-6 e, consequentemente, a repressão da resposta inflamatória (44).

As quimiocinas são citocinas que agem, predominantemente, através de atividade quimiotática. A IL-8/CXCL-8 age principalmente sobre os neutrófilos e restritamente sobre monócitos e eosinófilos e é secretada predominantemente, mesmo que não totalmente, por monócitos teciduais ativados e células endoteliais. A produção desta quimiocina é guiada por metabólitos microbianos, porém, o principal estímulo são a IL-1 β e o TNF- α . De forma semelhante, o GM-CSF age principalmente sobre monócitos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e restritamente sobre neutrófilos e é secretado por vários tipos celulares, incluindo macrófagos, mastócitos, células T, fibroblastos e células endoteliais em resposta a IL-1 β , TNF- α e IL-6. As quimiocinas são de extrema importância na amplificação da resposta inflamatória, devido ao recrutamento celular para o nicho da infecção que funciona como uma retroalimentação positiva na produção de citocinas pró-inflamatórias previamente citadas (43,45).

A IL-10 é produzida por macrófagos e linfócitos T, principalmente regulatórios, e inibe a expressão de IL-12, coestimuladores e MHC de classe II por macrófagos e células dendríticas, mediadores relacionados ao reconhecimento de agentes e amplificação da resposta pró-inflamatória. A IL-13 é uma citocina produzida por linfócitos T CD4⁺ e mastócitos, dentre outras fontes, e estimula a produção de muco, por células epiteliais, de colágeno, por fibroblastos, desvia a ativação macrofágica para a via alternativa, ou seja, perfil macrofágico que age predominantemente no reparo tecidual em restrição da atividade microbiana, etc (42).

Por mais que as funções não se sobreponham, ambas as citocinas apresentam duas finalidades comuns: contenção da resposta pró-inflamatória a fim de minimizar dano tecidual e direcionamento da produção de mediadores e atividades celulares para o reparo e reorganização tecidual (43).

Somada à ação das citocinas no estabelecimento da resposta inflamatória, destacam-se a ação dos antimicrobianos naturais (AN), como as β -defensinas humanas (HBDs), que foram previamente associados à modulação hormonal, idade materna e invasão microbiana da cavidade amniótica, além de sua participação em processos fisiológicos e necessários para o estabelecimento e progresso gestacional, como implantação, evolução gestacional, desenvolvimento fetal e parto (46). A produção destes mediadores é estimulada através do reconhecimento, pelos RRP, como TLRs, de produtos microbianos, como lipídeos, proteínas ou ácidos nucleicos, principalmente por células epiteliais, de forma que participam da defesa primária do hospedeiro, através do reconhecimento e neutralização de microrganismos invasores (46). Olmos-Ortiz *et al.* (47) demonstraram que a produção amniótica de HBD-1 e -2 aumentava, de forma significativa, após infecção com cepas de *E. coli* (2 a 24h após estímulo), além de produção basal de HBD-3 superior, no âmnio, quando comparado a outros compartimentos, como a coriodecídua (47).

A fonte predominante dos microrganismos previamente identificados no líquido amniótico de gestantes com complicações, como o TPP, é a microbiota vaginal, devido à compatibilidade taxonômica microbiana entre estes dois microambientes (48). A microbiota vaginal equilibrada como já bem estabelecido no século passado por Nugent *et al.* (49) e reafirmada por estudos de metagenômica (50,51), requer uma abundância relativa superior de diferentes espécies lactobacilares em relação aos demais táxons bacterianos. Entretanto, perturbações do microambiente vaginal são frequentes, com consequente alteração da microbiota para àquela com predomínio de cocobacilos Gram-variáveis, predominantemente

anaeróbias, com depleção de morfotipos lactobacilares. Este quadro é descrito como uma disbiose vaginal clássica, a vaginose bacteriana (VB). Esta entidade está presente em 15-42% das gestantes e aumenta de 2 a 4 vezes a incidência do PP, mas também da rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT), definida como a rotura das membranas corioamnióticas previamente ao início da contratilidade miometrial antes da 37ª semana de gestação (41).

Outra entidade que se agrega ao estado de disbioses vaginais é a vaginite aeróbia (VA), descrita por Donders *et al.* (52,53) e caracterizada por microrganismos comensais estritamente aeróbios provenientes do trato gastrointestinal, de forma que as espécies bacterianas mais frequentemente isoladas são *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus fecalis*. Somada à constituição da microbiota, outros quatro critérios constituem o escore para diagnóstico de VA, incluindo percentagem de células parabasais, infiltrado inflamatório, neutrófilos tóxicos e achados qualitativos de citólise, presença de bacilos pequenos e cadeias de cocos.

Dentre os táxons bacterianos constituintes do *core* patológico da VB previamente identificadas em gestações complicadas, destaca-se *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus spp.*, *Escherichia coli*, *Leptotrichia amnionii*, *Bacterioides fragilis*, *Prevotella bivia*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma spp.*, entre outras. Apesar da relação entre VB e o PP como desfecho gestacional desfavorável, estar embasada, predominantemente, na capacidade de estímulo da resposta inflamatória pelos microrganismos (54–59), estudos recentes demonstraram que, apesar desta relação ser verdadeira, não se limita próximo ou no momento do desfecho gestacional (60,61), de forma que a alteração da microbiota vaginal pode ocorrer previamente ou ao longo da gestação. Isso é suportado pela capacidade que o endométrio tem de funcionar como reservatório para os microrganismos (62).

Apesar do cenário ser, sabidamente, polibacteriano, os micoplasmas genitais, em particular *Mycoplasma hominis*, são os mais frequentemente isolados em membranas

corioamnióticas e líquido amniótico de gestações complicadas por corioamnionite clínica ou histológica (41,62,63).

Os micoplasmas genitais pertencem a classe dos Mollicutes, microrganismos fastidiosos de crescimento lento, desprovidos de parede celular e com um genoma pequeno que limita sua biossíntese e predispõe a fatores ambientais e justifica seu comportamento parasitário (63). O método *gold-standard* para a identificação deste microrganismo continua sendo a cultura em meio e condições específicas, entretanto, devido suas características microbiológicas, mesmo em condições ideais, o crescimento deste microrganismo pode não ser o esperado e gerar variações, de acordo com o tipo de amostra, por exemplo, que não a representam de forma fidedigna (64). Ademais a este método, o PCR também é tido como gold standard (65), entretanto, sua acessibilidade, seja referente ao custeamento quanto à aplicação do mesmo na rotina clínica, ainda é limitada. Devido a isso, há, ainda, uma dificuldade em prever a patogenicidade deste microrganismo e a sua influência em um cenário infeccioso polibacteriano na interface materno-fetal.

Ainda que os micoplasmas genitais já tenham sido previamente associados a complicações gestacionais, o TPP é uma entidade complexa e seu gatilho não depende, exclusivamente, da presença de uma única espécie bacteriana, mas sim da sinergia evocada pela combinação de táxons bacterianos e da assinatura inflamatória associada. Até recentemente, assumia-se a interface materno-fetal, bem como o líquido amniótico, como microambientes estéreis que, ao mínimo contato com microrganismos, promoveria a ativação dos tecidos e, conseqüentemente, o desencadeamento do desfecho gestacional adverso. Entretanto, com a crescente onda de conhecimento sobre a importância da microbiota em diversos nichos do corpo humano, estudos recentes vêm demonstrando a existência de uma microbiota placentária, pelas técnicas moleculares, como metagenômica e sequenciamento *shotgun* (66). Aagaard *et al.* (67) demonstraram a presença de um microbioma placentário com assinatura única, porém,

semelhante a microbiota oral. Esses achados são sustentados por estudos anteriores (68–70) que justificam o alcance de microrganismos orais à interface materno-fetal por disseminação hematogênica (71). Contudo, as especificidades acerca do microbioma placentário ainda são diversas, visto que se assume sua existência, porém, ainda não há um padrão das comunidades comumente encontradas ou àquele tido como saudável e a sua real interferência no desenvolvimento e na microbiota fetal (66,72).

Somado aos micoplasmas genitais, há contribuintes aeróbios e anaeróbios constituintes do core patológico da VB. A espécie *Bacterioides fragilis*, bacilo Gram-negativo anaeróbio, é comumente encontrada na microbiota intestinal. É bem estabelecido que a instalação deste microrganismo em nichos distintos do original é capaz de gerar uma infecção com consequências clínicas, devido aos diversos mecanismos envolvidos em sua patogênese, como resistência a antibióticos, produção de toxinas e enzimas extracelulares, capacidade de adesão, entre outros (73). Apesar disso e de ser um microrganismo sabidamente constituinte da VB (74), os estudos a respeito do papel patogênico do *B. fragilis* na interface materno-fetal são escassos. Sherman *et al.* (75) identificaram associação significativa entre essa espécie bacteriana e o PP espontâneo.

Peptostreptococcus anaerobius, cocos Gram-positivos anaeróbios, são comumente encontrados na microbiota intestinal, entretanto, há uma distribuição na microbiota vaginal e na cavidade oral (76). Estudos anteriores (77,78) identificaram o *P. anaerobius* tanto no microambiente vaginal quanto no líquido amniótico, de gestantes com resolução da gestação inferior à 37ª semana de gestação. Além disso, a presença desse microrganismo na vagina e na placenta, de forma similar à *Sneathia sanguinegens*, foi associada ao menor tamanho ao nascer. (78)

Streptococcus agalactiae, ou *Streptococcus* do Grupo B (GBS), cocos Gram-positivos β-hemolíticos, aeróbios, que se organizam em cadeias, são comumente encontrados na

microbiota gastrointestinal e vaginal (79). Este microrganismo torna-se patogênico quando passa a infectar novos nichos, como a interface materno-fetal, onde não é modulado por espécies predominantes. As repercussões clínicas associadas a este microrganismo envolvem sepse materna (80) e neonatal (81), natimortalidade (82), meningite (81) e pneumonia (81) do neonato que podem ter repercussões a curto e longo prazos (83). Por fim, somado à capacidade de suscitar condições clínicas severas, é sabido que a infecção por *S. agalactiae* em membranas corioamnióticas aumenta o risco do desencadeamento de TPP bem como o desfecho gestacional pré-termo (84).

Staphylococcus aureus, cocos Gram-positivos aeróbios, que se organizam em cachos, são comumente encontrados na microbiota da pele (85). No contexto das disbioses vaginais, é destaque na VA (53) e tem sido associado a intercorrências gestacionais, como corioamnionite clínica (86), PP (85), RPM-PT (87) bem como com resultados neonatais adversos (88), como cerca de 90% dos casos de sepse neonatal tardia, particularmente naqueles que tiveram cuidados médicos intensivos (89). A virulência dessa espécie é justificada pela capacidade de produção de biofilme, responsável por prover uma maior resistência a antibióticos e funcionar como um mecanismo de evasão do sistema imune, produção de exotoxinas, como *Panton-Valentine leukocidin* (PVL) responsável por gerar poros, através da polimerização com estruturas anelares, nas membranas celulares, acelerando o processo de necrose e apoptose das células brancas por um desbalanço iônico e, como produto final, um aumento da atividade nuclear do NF- κ B, participando como agente transcricional de inúmeros fatores inflamatórios e, finalmente, capacidade em suscitar resposta pró-inflamatória significativa para o desbalanço gestacional através da produção de citocinas e quimiocinas com atividades pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-2, IL-6, GM-CSF, IFN- γ e TNF- α (85,89,90).

Por fim, *Fusobacterium nucleatum*, bacilos Gram-negativos estritamente anaeróbios, comumente encontrados na microbiota oral (68). Apesar de presente na cavidade oral, esse é

capaz de se disseminar, via hematogênica, para outros sítios, como a placenta, onde vem sendo amplamente associado a complicações gestacionais (91), como corioamnionite, PP e pré-eclâmpsia, além de complicações fetais, como feto natimorto e sepse neonatal precoce (92). A virulência dessa espécie bacteriana é justificada, predominantemente, pela produção de adesinas, interação com diversos tipos celulares, como células epiteliais, endoteliais, polimorfonucleares, monócitos, entre outras, e capacidade de invasão (92,93). É, devido à essas propriedades, que essa espécie induz uma infecção subclínica no momento da disseminação, não suscitando resposta inflamatória sistêmica materna. Entretanto, uma vez que fora da cavidade oral e da via de disseminação, o mesmo interage com o TLR-4 e estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-8 e TNF- α (93).

Apesar da disponibilidade de ensaios pré-clínicos para a avaliação da influência das espécies bacterianas, isoladas ou em combinação, nos tecidos materno-fetais, é sabido que o trabalho de parto humano apresenta peculiaridades que impossibilitam a transposição do conhecimento, de forma fidedigna, de outras espécies (94). Neste contexto, houve a urgência de modelos que permitissem a avaliação da interface materno-fetal, em particular, das membranas corioamnióticas através da cultura de linhagens celulares, como hFM-AECs (95). Estudos *in vitro*, portanto, permitem a mimetização do cenário infeccioso, além da produção de mediadores inflamatórios suscitada por essas interações bacterianas, em tecidos ou células humanas. No que se refere ao cenário inflamatório, permitem avaliar a capacidade de indução de MET por diversas combinações bacterianas e sob diferentes assinaturas. A maior limitação, no entanto, é a restrição do uso de apenas uma linhagem celular por cultura, o que impossibilita o reflexo da dinâmica tecidual, avaliando apenas partes do todo (96).

Nos últimos anos, devido ao avanço tecnológico na pesquisa em saúde, foi desenvolvido um novo modelo que permite a recriação de órgãos humanos, em todos os seus estratos, através de cultura celular intitulado *Organ-On-Chip* (OOC). Foi possível, portanto, a recriação das

membranas corioamnióticas (97,98), de forma é possível avaliar a interação dos diversos tipos celulares em seus respectivos estratos através de um sistema *transwell*, bem como permite o controle e acompanhamento do estímulo desde seu nicho inicial. A importância do desenvolvimento de novas tecnologias para o estudo dos desfechos gestacionais adversos envolve, principalmente, a expansão do conhecimento a respeito dos mecanismos envolvidos no desencadeamento e a necessidade de prevenção a fim de minimizar danos à saúde materna e fetal, a curto e longo prazos.

2. Referências bibliográficas

1. MARTIN, L.; RICHARDSON, L.; MENON, R. Characteristics, properties, and functionality of fetal membranes: An overlooked area in the field of parturition. Em: **Encyclopedia of Reproduction**. Elsevier, 2018:387–398.
2. LITWINIUK, M.; GRZELA, T. Amniotic membrane: New concepts for an old dressing. **Wound Repair and Regeneration**. Blackwell Publishing Inc., 2014;22:451–6.
3. ZARE-BIDAKI, M. *et al.* Antimicrobial Properties of Amniotic and Chorionic Membranes: A Comparative Study of Two Human Fetal Sacs. **J Reprod Infertil**. 2017;18.
4. PICCINNI, M. P. *et al.* Cytokines, Hormones and Cellular Regulatory Mechanisms Favoring Successful Reproduction. **Frontiers in Immunology**. Frontiers Media S.A., 2021;12.
5. RICHARDSON, L.; MENON, R. Proliferative, Migratory, and Transition Properties Reveal Metastate of Human Amnion Cells. **American Journal of Pathology**. 2018;188(9):2004–2015.
6. ZHANG, L. L. *et al.* Nagilactone E suppresses TGF- β 1-induced epithelial–mesenchymal transition, migration and invasion in non-small cell lung cancer cells. **Phytomedicine**. 2019;52:32–39.
7. MENON, R. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) of feto-maternal reproductive tissues generates inflammation: a detrimental factor for preterm birth. **BMB Reports**. The Biochemical Society of the Republic of Korea, 2022;55:370-379.
8. RICHARDSON, L. S.; TAYLOR, R. N.; MENON, R. Reversible EMT and MET mediate amnion remodeling during pregnancy and labor. **Science Signaling**. 2020;13(618).
9. BRYANT-GREENWOOD, G. D. The Extracellular Matrix of the Human Fetal Membranes: Structure and Function. **Placenta**. 1998;19.
10. RICHARDSON, L. S. *et al.* Discovery and Characterization of Human Amniochorionic Membrane Microfractures. **American Journal of Pathology**. 2017;187(12):1821-1830.
11. ANDER, S. E.; DIAMOND, M. S.; COYNE, C. B. Immune responses at the maternal-fetal interface. **Science Immunology**. American Association for the Advancement of Science., 2019;4.
12. CIERNY, J. T. *et al.* Maternal inflammatory markers and term labor performance. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. 2014;210(5): 447.e1-447.e6.
13. SYKES, L. *et al.* The Th1:Th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. **Mediators of Inflammation**. 2012;22.
14. NEAL, J. L. *et al.* Differences in inflammatory markers between nulliparous women admitted to hospitals in preactive vs active labor. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. 2015;212(1): 68.e1-68.e8.
15. PAZOS, M. *et al.* The influence of pregnancy on systemic immunity. **Immunologic Research**. 2012;54(1-3):254-261.
16. FUHLER, G. M. The immune system and microbiome in pregnancy. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**. Bailliere Tindall Ltd., 2020.
17. ROMERO, R.; DEY, S. K.; FISHER, S. J. Preterm labor: One syndrome, many causes. **Science American Association for the Advancement of Science**. 2014;345:760-5.
18. RENTHAL, N. E.; WILLIAMS, K. C.; MENDELSON, C. R. MicroRNAs-Mediators of myometrial contractility during pregnancy and labour. **Nature Reviews Endocrinology**. 2013;9:391–401.

19. MAHENDROO, M. Cervical remodeling in term and preterm birth: Insights from an animal model. **Reproduction**. 2012;143:429–38.
20. SILVA, M. C. *et al.* Inflammation, but not infection, induces EMT in human amnion epithelial cells. **Reproduction Research**. 2020.
21. DAVALOS, A. R. *et al.* Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. **Cancer and Metastasis Reviews**. 2010;29:273-83.
22. FREUND, A. *et al.* Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. **Trends in Molecular Medicine**. 2010;16:238-46.
23. LIU, L. *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **The Lancet**. 2012;379:2151–2161.
24. MWANIKI, M. K. *et al.* Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review. **The Lancet**. 2012;379:445–52.
25. MURRAY, C. J. L. *et al.* Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**. 2012;380(9859):2197–2223.
26. GOLDENBERG, R. L. *et al.* Epidemiology and causes of preterm birth. **The Lancet**. 2008;371.
27. VILLAR, J. *et al.* The preterm birth syndrome: A prototype phenotypic classification. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. 2012;206(2):119–123.
28. GOLDENBERG, R. L. *et al.* The preterm birth syndrome: Issues to consider in creating a classification system. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. 2012;206(2):113–118.
29. FREY, H. A.; KLEBANOFF, M. A. The epidemiology, etiology, and costs of preterm birth. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**. W.B. Saunders Ltd., 2016;21:68-73.
30. GREEN, E. S.; ARCK, P. C. Pathogenesis of preterm birth: bidirectional inflammation in mother and fetus. **Semin Immunopathol**. 2020;42(4):413-429.
31. MYNTTI, T. *et al.* Amniotic Fluid Infection in Preterm Pregnancies with Intact Membranes. **Disease Markers**. 2017;2017.
32. HEYBORNE, K. Amniotic fluid infection, inflammation, and colonization in preterm labor with intact membranes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. 2014;210(2):125.e1-125.e15.
33. KIM, M. J. *et al.* Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection. **Laboratory Investigation**. 2009;89(8):924–936.
34. GOMEZ-LOPEZ, N. *et al.* Inflammasomes: Their Role in Normal and Complicated Pregnancies. **The Journal of Immunology**. 2019;203(11):2757–2769.
35. OLMOS-ORTIZ, A. *et al.* Innate immune cells and toll-like receptor–dependent responses at the maternal–fetal interface. **International Journal of Molecular Sciences**. 2019;20.
36. JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**. 2002;20:197-216.
37. BAUER, S.; MILLER, T.; HAMM, S. Pattern Recognition by Toll-Like Receptors. **Adv Exp Med Biol**. 2009;653:15-34.
38. KOGA, K.; MOR, G. Toll-Like Receptors at the Maternal-Fetal Interface in Normal Pregnancy and Pregnancy Disorders. **American Journal of Reproductive Immunology**. 2010;63:587–600.

39. TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**. Elsevier B.V., 2010;140:805–20.
40. MAZGAEN, L.; GURUNG, P. Recent advances in lipopolysaccharide recognition systems. **International Journal of Molecular Sciences**. MDPI AG, 2020;21.
41. NADEAU, H. C. G.; SUBRAMANIAM, A.; ANDREWS, W. W. Infection and preterm birth. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**. 2016;21(2):100–105.
42. ABBAS AK; LICHTMAN AH; PILLAI S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8º ed. Elsevier Editora Ltda., 2015.
43. ROBBINS SL; COTRAN RS. **Patologia**: Bases patológicas das doenças . 9º ed. Elsevier Editora Ltda., 2016.
44. Noda-Nicolau NM, Poletini J, da Silva MG, Peltier MR, Menon R. Polybacterial stimulation suggests discrete IL-6/IL-6R signaling in human fetal membranes: Potential implications on IL-6 bioactivity. **J Reprod Immunol**. 2018;126:60–8.
45. Raquel C, Basso L, Santos D. **Clonagem, Expressão, Purificação e Ensaio Biológico da Proteína GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos**. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.
46. ZHAI, Y. J. *et al.* Defensins: defenders of human reproductive health. **Human Reproduction Update**. 2022;1–29.
47. OLMOS-ORTIZ, A. *et al.* Compartmentalized Innate Immune Response of Human Fetal Membranes against *Escherichia coli* Choriodecidual Infection. **International Journal of Molecular Sciences**. 2022;23(6).
48. HELMO, F. R. *et al.* Intrauterine infection, immune system and premature birth. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**. Taylor and Francis Ltd., 2018;31:1227–33.
49. NUGENT, R. P.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L. Reliability of Diagnosing Bacterial Vaginosis Is Improved by a Standardized Method of Gram Stain Interpretation. **Journal Of Clinical Microbiology**. 1991;29.
50. RAVEL J, GAJER P, ABDO Z, SCHNEIDER GM, KOENIG SSK, MCCULLE SL, *et al.* Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proc. Nat. Acad. Sci USA**. 2011;108(1):4680–7.
51. FRANCE MT, MA B, GAJER P, BROWN S, HUMPHRYS MS, HOLM JB, *et al.* VALENCIA: a nearest centroid classification method for vaginal microbial communities based on composition. **Microbiome**. 2020;8(1).
52. DONDEERS GGG, VEREECKEN A, BOSMANS E, DEKEERSMAECKER A, SALEMBIER G, SPITZ B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. **BJOG**. 2002;109(1):34–43.
53. DONDEERS, G. G. G. *et al.* Aerobic vaginitis: no longer a stranger. **Research in Microbiology**. 2017;168(9–10):845–858.
54. NODA-NICOLAU NM, TANTENGCO OAG, POLETTINI J, Silva MC, BENTO GFC, CURSINO GC, *et al.* Genital Mycoplasmas and Biomarkers of Inflammation and Their Association With Spontaneous Preterm Birth and Preterm Prelabor Rupture of Membranes: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 13, **Frontiers in Microbiology**. Frontiers Media S.A.; 2022.

55. PEELEN MJ, LUEF BM, LAMONT RF, MILLIANO I, JENSEN JS, LIMPENS J, *et al.* The influence of the vaginal microbiota on preterm birth: A systematic review and recommendations for a minimum dataset for future research. **Placenta**. W.B. Saunders Ltd., 2019;79:30–9.
56. TANTENGCO OAG, KECHICHIAN T, VINCENT KL, PYLES RB, MEDINA PMB, MENON R. Inflammatory response elicited by *Ureaplasma parvum* colonization in human cervical epithelial, stromal, and immune cells. **Reproduction**. 2021;163(1):1–10.
57. NODA-NICOLAU NM, SILVA MC, BENTO GFC, FERREIRA JSB, NOVAK J, MORALES JAP, *et al.* Cervicovaginal levels of human beta defensins during bacterial vaginosis. **PLoS One**. 2021;16(12).
58. TANTENGCO OAG, MENON R. Breaking Down the Barrier: The Role of Cervical Infection and Inflammation in Preterm Birth. **Front Glob Women's Health**. 2022;18(2).
59. TANTENGCO OAG, RICHARDSON LS, RADNAA E, KAMMALA AK, KIM S, MEDINA PMB, *et al.* Modeling ascending *Ureaplasma parvum* infection through the female reproductive tract using vagina-cervix-decidua-organ-on-a-chip and feto-maternal interface-organ-on-a-chip. **Federation of American Societies for Experimental Biology**. 2022;36(10).
60. D'IPPOLITO S, NICUOLO F, PONTECORVI A, GRATTA M, SCAMBIA G, SIMONE N. Endometrial microbes and microbiome: Recent insights on the inflammatory and immune “players” of the human endometrium. **American Journal of Reproductive Immunology**. Blackwell Publishing Ltd, 2018;80.
61. LOKKEN EM, MANDALIYA K, SRINIVASAN S, RICHARDSON BA, KINUTHIA J, LANNON S, *et al.* Impact of preconception vaginal microbiota on women's risk of spontaneous preterm birth: Protocol for a prospective case-cohort study. **BMJ**. 2020;10(2).
62. HOSNY AEDMS, EL-KHAYAT W, KASHEF MT, FAKHRY MN. Association between preterm labor and genitourinary tract infections caused by *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, Gram-negative bacilli, and coryneforms. **Journal of the Chinese Medical Association**. 2017;80(9):575–81.
63. AHMED, J. *et al.* *Mycoplasma hominis*: An under recognized pathogen. **Indian Journal of Medical Microbiology**. Indian Association of Medical Microbiologists, 2021;39:88–97.
64. CAPOCCIA, R.; GREUB, G.; BAUD, D. *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and adverse pregnancy outcomes. **Current Opinion in Infectious Diseases**. 2013;26:231–40.
65. TJOA E, JOON S, MOEHARIO LH. Diagnostic parameters of the AF Genital System® for detection of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. **Journal of International Medical Research**. 2021;49(10).
66. NEUMAN, H.; KOREN, O. The Pregnancy Microbiome. **Nestle Nutrition Institute Workshop Series**. 2017;88:1-9.
67. AAGAARD, K. *et al.* The placenta harbors a unique microbiome. **Science Translational Medicine**. 2014;6(237).
68. FARDINI Y, WANG X, TÉMOIN S, NITHIANANTHAM S, LEE D, SHOHAM M, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* adhesin FadA binds vascular endothelial cadherin and alters endothelial integrity. **Mol Microbiol**. 2011;82(6):1468–80.

69. FARDINI Y, CHUNG P, DUMM R, JOSHI N, HAN YW. Transmission of diverse oral bacteria to murine placenta: Evidence for the oral microbiome as a potential source of intrauterine infection. **Infect Immun**. 2010;78(4):1789–96.
70. HAN YW, WANG X. Mobile microbiome: Oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. **Journal of Dental Research**. 2013;92:485–91.
71. PARARAS, M. V.; SKEVAKI, C. L.; KAFETZIS, D. A. Preterm birth due to maternal infection: Causative pathogens and modes of prevention. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. 2006;25:562–99.
72. WASSENAAR TM, PANIGRAHI P. Is a foetus developing in a sterile environment? **Lett Appl Microbiol**. 2014;59(6):572–9.
73. YEKANI, M. *et al*. To resist and persist: Important factors in the pathogenesis of *Bacteroides fragilis*. **Microbial Pathogenesis**. Academic Press, 2020;149.
74. MALAGUTI, N. *et al*. Sensitive detection of thirteen bacterial vaginosis-associated agents using multiplex polymerase chain reaction. **BioMed Research International**. 2015;2015.
75. SHERMAN, D. J. *et al*. Chorioamnionitis Caused by Gram-Negative Bacteria as an Etiologic Factor in Preterm Birth. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis**. 1997;16.
76. LEGARIA, M. C. *et al*. *Peptostreptococcus anaerobius*: Pathogenicity, identification, and antimicrobial susceptibility. Review of monobacterial infections and addition of a case of urinary tract infection directly identified from a urine sample by MALDI-TOF MS. **Anaerobe**. Academic Press, 2021;72.
77. DIGIULIO DB, ROMERO R, AMOGAN HP, KUSANOVIC JP, BIK EM, GOTSCH F, *et al*. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: A molecular and culture-based investigation. **PLoS One**. 2008;3(8).
78. DOYLE, R. M. *et al*. Bacterial communities found in placental tissues are associated with severe chorioamnionitis and adverse birth outcomes. **PLoS ONE**. 2017;12(7).
79. SEALE, A. C. *et al*. Estimates of the Burden of Group B Streptococcal Disease Worldwide for Pregnant Women, Stillbirths, and Children. **Clinical Infectious Diseases**. 2017;65:S200–S219.
80. HALL J, ADAMS NH, BARTLETT L, SEALE AC, LAMAGNI T, BIANCHI-JASSIR F, *et al*. Maternal Disease with Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. **Clinical Infectious Diseases**. Oxford University Press, 2017;65:S112–24.
81. MADRID L, SEALE AC, KOHLI-LYNCH M, EDMOND KM, LAWN JE, HEATH PT, *et al*. Infant Group B Streptococcal Disease Incidence and Serotypes Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. **Clinical Infectious Diseases**. Oxford University Press, 2017;65:S160–72.
82. SEALE AC, BLENCOWE H, BIANCHI-JASSIR F, EMBLETON N, BASSAT Q, ORDI J, *et al*. Stillbirth with Group B Streptococcus Disease Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. **Clinical Infectious Diseases**. Oxford University Press; 2017;65:S125–32.
83. LAWN, J. E. *et al*. Group B Streptococcal Disease Worldwide for Pregnant Women, Stillbirths, and Children: Why, What, and How to Undertake Estimates? **Clinical Infectious Diseases**. 2017;65:S89–99.
84. BIANCHI-JASSIR, F. *et al*. Preterm Birth Associated with Group B Streptococcus Maternal Colonization Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. **Clinical Infectious Diseases**. Oxford University Press, 2017;65:S133–42.

85. DOSTER, R. S. *et al.* *Staphylococcus aureus* Infection of Human Gestational Membranes Induces Bacterial Biofilm Formation and Host Production of Cytokines. **Journal of Infectious Diseases**. 2017;215(4):653–657.
86. SORANO S, GOTO M, MATSUOKA S, TOHYAMA A, YAMAMOTO H, NAKAMURA S, *et al.* Chorioamnionitis caused by *Staphylococcus aureus* with intact membranes in a term pregnancy: A case of maternal and fetal septic shock. **Journal of Infection and Chemotherapy**. 2016;22(4):261–4.
87. ELEJE GU, ADINMA JI, GHASI S, IKECHEBELU JI, IGWEGBE AO, OKONKWO JE, *et al.* Antibiotic susceptibility pattern of genital tract bacteria in pregnant women with preterm premature rupture of membranes in a resource-limited setting. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**. 2014;127(1):10–4.
88. FREEMAN MC, MITCHELL S, IBRAHIM J, WILLIAMS J. Neonatal Toxic Shock Syndrome-Like Exanthematous Disease in North America. **J Pediatric Infect Dis Soc**. 2021;10(2):205–6.
89. MA, X. *et al.* The pathogenesis of prevalent aerobic bacteria in aerobic vaginitis and adverse pregnancy outcomes: a narrative review. **Reproductive Health**. BioMed Central Ltd., 2022;19.
90. KAAMBO, E.; AFRICA, C. W. J. The Threat of Aerobic Vaginitis The Threat of Aerobic Vaginitis to Pregnancy and Neonatal Morbidity. **Afr J Reprod Health**. 2017;21.
91. WU, C. *et al.* Genetic and molecular determinants of polymicrobial interactions in *Fusobacterium nucleatum*. **Biological Sciences**. 2021;118(23):e2006482118.
92. HAN, Y. W. *Fusobacterium nucleatum*: A commensal-turned pathogen. **Current Opinion in Microbiology**. Elsevier Ltd., 2015;23:141–7.
93. VANDER HAAR, E. L. *et al.* *Fusobacterium nucleatum* and adverse pregnancy outcomes: Epidemiological and mechanistic evidence. **Anaerobe**. Academic Press, 2018;50:55–9.
94. CARTER, A. M. Animal models of human pregnancy and placentation: alternatives to the mouse. **Reproduction**. 2020;160(6):R129–R143.
95. ABBAS, Y. *et al.* Investigation of human trophoblast invasion in vitro. **Human Reproduction Update**. 2020;26(4):501–513.
96. JENSEN, C.; TENG, Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? **Frontiers in Molecular Biosciences**. Frontiers Media S.A., 2020;7.
97. RICHARDSON, L. *et al.* Fetal Membrane Organ-On-Chip: An Innovative Approach to Study Cellular Interactions. **Reproductive Sciences**. 2019a.
98. RICHARDSON, L. *et al.* Amnion membrane organ-on-chip: an innovative approach to study cellular interactions. **FASEB Journal**. 2019b;33(8):8945–8960.

Capítulo II
