

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Faculdade de Medicina de Botucatu

**Associação entre presença de *Mycoplasma hominis* e
Ureaplasma urealyticum e níveis de citocinas pró e anti-
inflamatórias no líquido amniótico de gestações de
termo.**

Bruna Ribeiro de Andrade Ramos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Guimarães da Silva

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

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Ramos, Bruna Ribeiro de Andrade.

Associação entre presença de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* e níveis de citocinas pró e antiinflamatórias no líquido amniótico de gestações de termo. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Márcia Guimarães da Silva

Capes: 40103005

1. Gravidez. 2. Líquido amniótico.

Palavras-chave: Gestações de termo, *Mycoplasma hominis*, Citocinas, Líquido amniótico.

Sumário

Sumário

Capítulo I – Revisão de Literatura

1. Introdução	01
4.1. Subpopulações celulares e perfil de citocinas na gestação	01
4.2. Citocinas, hormônios e prostaglandinas na indução do trabalho de parto	06
4.3. Invasão da cavidade amniótica na gestação de termo	10
2. Referências Bibliográficas	14

Capítulo II – Artigo Científico

1. Abstract	23
2. Introduction	24
3. Pacients and Methods	26
4.1. Study population	26
4.2. AF and chorioamniotic membranes collection	27
4.3. Detection of <i>Mycoplasma hominis</i> and <i>Ureaplasma urealyticum</i> in AF	27
4.4. Measurement of cytokines in AF	27
4.6. Statistical analysis	28
5. Results	28
6. Discussion	30
7. References	33
Anexos	37

Capítulo I – Revisão de Literatura

Subpopulações Celulares e Perfil de Citocinas na Gestação

A gestação é uma fase caracterizada por alterações fisiológicas, hormonais e imunológicas do organismo materno. Neste contexto, as citocinas exercem importante papel na manutenção e no desfecho gestacionais.

As citocinas são polipeptídeos de 8 a 80KDa, secretados por células da imunidade inata e adaptativa, que atuam de maneira autócrina ou parácrina sobre as diferentes células do organismo. Agem através da ligação a receptores específicos nas membranas celulares, estabelecendo uma cascata de reações metabólicas que induzem ou inibem inúmeros genes, provocando as mudanças necessárias para o desenvolvimento da resposta imune (1). A principal via intracelular induzida pela ativação dos receptores de superfície de citocinas é o fator nuclear- κ B (NF- κ B). Resumidamente, NF- κ B são dímeros que podem ser formados por cinco subunidades (Rel-A, Rel-B, c-Rel, p50 e p52), cujas combinações dão origem a 11 dímeros diferentes (2). Quando inativados se encontram no citosol ligados à sua proteína inibidora, I κ B, da qual existem várias isoformas (3). A via mais conhecida de ativação do NF- κ B é através da fosforilação do I κ B que leva à liberação do NF- κ B e deixa livre sua sequência de localização nuclear, o que facilita sua translocação para o núcleo. Uma vez no núcleo celular, o sítio de ligação ao DNA de suas subunidades atua nas regiões promotoras de diferentes genes, como os genes envolvidos na resposta imune e inflamatória, induzindo sua transcrição (2).

As citocinas podem facilitar ou prejudicar a evolução da gestação, pois estão envolvidas no controle da resposta imune materna e no desenvolvimento fetal (4). Durante a gestação, são produzidas por inúmeras células do compartimento materno-fetal, como células endometriais, deciduais, amnióticas e coriônicas, além de linfócitos e macrófagos presentes nos tecidos maternos (5, 6).

O ambiente imunológico na decídua é bastante diferente daquele encontrado no sangue periférico. No início da gestação, as células presentes na decídua são células T (CD8+, CD4+) e células *Natural Killers* (NKs), denominadas NK uterinas. Outras populações celulares como células $T\gamma\delta$ e macrófagos também fazem parte dos leucócitos presentes na interface materno-fetal (7).

O paradigma de que o sucesso da gestação dependia do predomínio de resposta imune de perfil Th2, enquanto a resposta imune de perfil Th1 era associada a resultados gestacionais adversos, foi aceito por muitos anos pela comunidade científica (8, 9). Atualmente, estudos demonstram que o sucesso da gestação depende de um complexo e dinâmico balanço entre citocinas, que se modifica ao longo da gestação normal (10). O primeiro trimestre da gestação é marcado pela resposta imune de perfil Th1, visto que nesse primeiro estágio o microambiente inflamatório torna-se necessário tanto para permitir o correto reparo do epitélio uterino, o qual sofre danos consequentes da implantação do feto, quanto para remoção de debris celulares. No segundo trimestre o predomínio passa a ser da resposta imune de perfil Th2 (11, 12), com aumento de citocinas de atividade anti-inflamatória, importante para a manutenção da gestação. No terceiro trimestre e no momento do parto, o perfil Th1 volta a ser preponderante tanto sistemicamente (13), quanto no tecido placentário (14) e no líquido amniótico (LA) (15). Entretanto, trabalhos recentes vêm sugerindo a participação de outros tipos celulares, diferenciados a partir de Th0, em células produtoras de IL-17, chamadas Th17 e em células CD4+ CD25+, denominadas Treg, na manutenção da homeostasia durante a gestação (16, 17). Estes grupos celulares devem auxiliar na regulação da resposta imune, entretanto, pouco se conhece a respeito de sua influência em gestações sem intercorrências obstétricas.

A partir do terceiro trimestre de gestação níveis crescentes de citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8 e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) (18-22) são secretados pelos tecidos gestacionais e viabilizam o parto. Segundo Gotsch et al. (23), o

trabalho de parto espontâneo é caracterizado pela super-produção de citocinas pró-inflamatórias no ambiente intrauterino.

Uma das citocinas envolvidas no desencadeamento do parto é a IL-1 β . Esta citocina pró-inflamatória possui papel crucial na regulação da resposta imune, induzindo a ativação de genes de outros mediadores pró-inflamatórios (24) e a contratilidade miometrial através da síntese de prostanóides pelo epitélio amniótico e pelas células decíduais. Em modelo experimental, a infusão desta citocina na cavidade amniótica de primatas prenhes induziu a síntese de TNF- α e prostaglandinas (PG), com resultante atividade uterina (25). Neste mesmo sentido, Ammälä et al. (26) detectaram elevadas concentrações de IL-1 β e de seus receptores na decídua de gestantes em trabalho de parto espontâneo quando comparadas a gestantes submetidas à cesárea eletiva. Já é conhecido na literatura que a IL-1 β desempenha papel central na regulação da resposta inflamatória em tecidos lesados, sendo produzida por células decíduais em resposta a endotoxinas bacterianas na infecção intrauterina (27).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica secretada como proteína de 26 kDa que é produzida por uma variedade de células, incluindo fibroblastos, monócitos/macrófagos, células endoteliais, células endometriais e células decíduais (28). Entre suas funções no sistema imune, destaca-se a propriedade de regulação da resposta inflamatória. A IL-6 pode exercer ambos os efeitos pró e anti-inflamatórios, dependendo da célula-alvo e de suas concentrações nestes microambientes (29, 30). Esta citocina é um dos principais mediadores de eventos biológicos como febre e resposta de fase aguda e diversos trabalhos apontam seu papel na gestação e no parto (22, 31, 32).

Em roedores, a IL-6 é sintetizada por células do trato reprodutivo da fêmea e por tecidos gestacionais e está envolvida na implantação embrionária, no desenvolvimento placentário e nos estágios tardios da prenhez (31, 33-35). Segundo Keelan et al. (36) a IL-6, assim como outras citocinas de efeito pró-inflamatório, como o TNF- α e a IL-1 β , contribui para eventos que culminam no parto através de suas interações com a via de produção de PG. *In*

vitro, esta molécula regula positivamente a produção de PGE₂, PGF_{2α} e do receptor de PGF_{2α} em células amnióticas e decíduais (37, 38), além de estimular contratilidade miometrial por indução da expressão de receptores para ocitocina (32). Em modelo experimental, Robertson et al. (31) demonstraram a importância dessa molécula no desencadeamento do trabalho de parto de animais *wild type* quando comparadas a ratas *knockout* para IL-6.

A IL-8 é uma citocina que induz quimiotaxia neutrofílica, tendo função importante no mecanismo de defesa do hospedeiro. É produzida pela placenta humana (39) e detectada no LA a partir do segundo trimestre de gestação (40). Sua ação leva ao recrutamento de células do sistema imune para as membranas fetais e, ao mesmo tempo, contribui para a dilatação do canal cervical (41). Em trabalho com gestantes saudáveis, no 2º trimestre de gestação, Donders et al. (21) descreveram supressão de IL-6 e IL-8 no conteúdo vaginal quando comparadas a mulheres não-grávidas, porém observaram níveis aumentados dessas mesmas citocinas à proximidade do parto.

Outra citocina de padrão inflamatório, o TNF-α é sintetizado na superfície de macrófagos e células decíduais na forma de precursor biologicamente ativo e, através de ação enzimática, é convertido na proteína solúvel de 17kD. O TNF-α é uma das citocinas críticas para a gestação (42, 43) e atua como regulador da proliferação celular na unidade feto-placentária (44), atuando como modulador do crescimento trofoblástico e da invasão trofoblástica das arteríolas espiraladas. A identificação de TNF-α na decídua humana e de seus receptores (45) nas células placentárias sugere papel fundamental desse mediador na rede de citocinas produzidas na gestação (46).

Por sua vez, as citocinas anti-inflamatórias estão mais envolvidas na manutenção da gestação, especialmente no segundo trimestre. De fato, já foi demonstrado que a falha do padrão Th2 está associada a casos de abortos recorrentes (47) e complicações gestacionais (48).

Na gestação normal, a IL-10 influencia a atividade do trofoblasto placentário, exerce efeito supressor sobre as células NK e sobre a produção autócrina do TNF- α pelos monócitos, além de regular a imunoproteção fetal (49). Contudo, existem poucos dados sobre seu papel no desencadeamento do parto. Como demonstrado por Sadowsky et al. (50), a infusão desta citocina na cavidade amniótica de macacas é capaz de suprimir a atividade uterina IL-1 β induzida. Quanto à produção desta citocina no final da gestação, a literatura apresenta dados contraditórios. Dudley et al. (51) não observaram diferenças significativas entre os níveis de IL-10 no LA de pacientes submetidas à cesárea eletiva, quando comparadas a pacientes em trabalho de parto a termo ou em trabalho de parto pré-termo. Por outro lado, Greig et al. (52) descrevem que a IL-10 está presente no LA com concentrações mais elevadas no terceiro trimestre. Ainda segundo esses autores, a IL-10 está associada à infecção intrauterina, sendo detectada em níveis mais elevados do que nas gestações pré-termo.

À exemplo da IL-10, a IL-4 é uma citocina do perfil Th2, produzida por células T ativadas, mastócitos e basófilos (53). A IL-4 estimula o desenvolvimento e expansão das células Th2 e inibe a ativação de macrófagos (1). Este mediador inibe a produção espontânea ou induzida por lipopolissacárides (LPS) de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α por monócitos (54-56). Adicionalmente, Simhan et al. (53) demonstraram que a IL-4 reduz a produção de PGE₂ pelas células decíduais *in vitro* em resposta ao LPS, sugerindo seu efeito anti-inflamatório na gestação.

Citocinas, hormônios e prostaglandinas na indução do trabalho de parto

As citocinas permeiam e possibilitam diversas vias envolvidas no desencadeamento do parto. Próximo à resolução da gestação, três processos distintos e independentes, o remodelamento cervical, o enfraquecimento e rotura das membranas fetais e a contratilidade miometrial, viabilizam a expulsão do conceito (57).

Um dos mecanismos influenciados pela rede de citocinas, já estabelecido na iniciação do trabalho de parto, é a interação entre os hormônios estrógeno e progesterona (PR) e seus receptores. Durante a gestação, níveis plasmáticos elevados de PR mantêm a quiescência uterina através de sua ação em receptores de progesterona PR-B. A ativação destes receptores leva ao bloqueio de receptores estrogênicos presentes no miométrio (58). Dados recentes ainda sugerem possível ação indireta da PR no útero e na cérvix, inibindo a resposta inflamatória pelo bloqueio de fator transcricional nuclear NF- κ B e a expressão de genes responsáveis pela contratilidade uterina (58).

O nível plasmático de PR sofre drástica redução funcional próximo ao termo da gestação. A iniciação do parto é acompanhada pelo aumento da expressão de enzimas metabolizadoras da PR; a falha no parto de ratas *knockout* para genes codificadores destas enzimas sugere que o metabolismo local de PR seja crítico no desenvolvimento do parto (59). No final da gestação, citocinas pró-inflamatórias apresentam-se em níveis elevados e poderiam bloquear a ação da PR. De fato, estudos *in vitro* comprovam a ação inibitória recíproca entre citocinas inflamatórias e PR, via NF- κ B (60). Outro evento importante é a alteração no padrão de expressão dos receptores de PR já que após a 37ª semana ocorre superexpressão da isoforma inibidora (receptor A) em detrimento da expressão do receptor B (61) e, ainda durante esta fase, há uma redução na expressão de co-fatores ativadores da PR. Esses

mecanismos em conjunto levam à redução funcional da PR ocasionando aumento da sensibilidade miometrial ao estrógeno (62) (Figura 1).

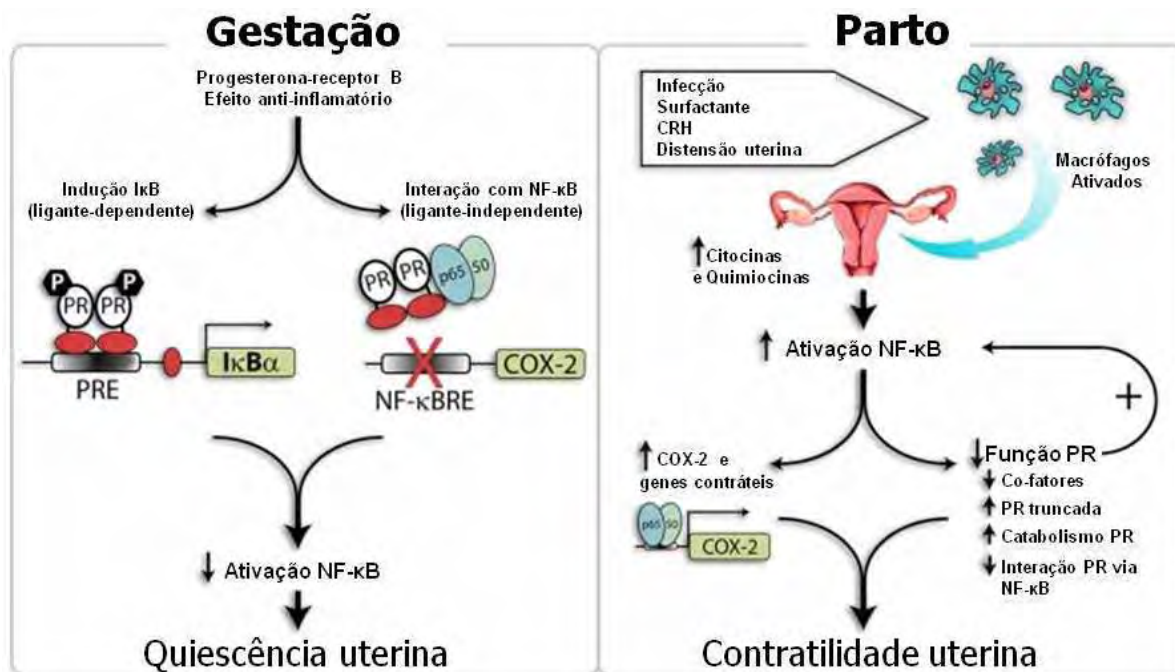


Figura 1. Mecanismos de regulação da progesterona durante a gestação (quiescência) e durante o trabalho de parto (contratilidade) (Fonte: Mendelson, 2009).

O estrógeno tem efeito na contração miometrial diretamente e também indiretamente, por estimular a secreção de ocitocina e vasopressina, cujos receptores se encontram expressos antes do parto (63). Estes uterotônicos ativam a fosfolipase C, levando ao aumento de cálcio intracelular e potencializando, desta maneira, as contrações uterinas desencadeadas pela ação estrogênica (64).

Durante a gestação e, especialmente no momento do parto, níveis crescentes do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) são secretados pela placenta e membranas corioamnióticas. O mecanismo exato pelo qual a produção deste hormônio é regulada ainda é desconhecido. Concomitantemente, há decréscimo nos níveis de proteínas ligantes de CRH e aumento de expressão de seus receptores nos tecidos gestacionais. O consequente aumento de CRH ativo na circulação materna estimula a produção fetal de cortisol, promovendo

maturação fetal, além de aumentar a síntese de estrógeno placentário e a secreção de PG nas membranas fetais, decídua e miométrio (65). O hormônio adrenocorticotrófico fetal (ACTH) também atua nesta via, porém, o aumento de cortisol no momento do parto ocorre mesmo na falha do ACTH (64). Tanto o ACTH quanto o CRH ainda aumentam a produção de sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), que pode ser convertido em estrógeno pela glândula adrenal do feto (66). Markovic et al. (67) descobriram que o tratamento de células miometriais com IL-1 β aumenta a expressão do receptor CRH-R1, sugerindo mais uma via de atuação desta citocina no desencadeamento do parto.

Outro grupo de moléculas envolvidas na cascata de iniciação do parto são as prostaglandinas, mediadores lipídicos derivados da metabolização do ácido araquidônico pela via da ciclooxigenase (COX). Em humanos, existem duas isoformas principais: a COX-1, de expressão constitutiva e a COX-2, super-expressa em ambientes pró-inflamatórios, como nas gestações a termo. Uma terceira isoforma, a COX-3 foi recentemente descrita e é detectada principalmente no sistema nervoso central. Altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, no período próximo ao parto, influenciam o metabolismo do ácido araquidônico aumentando a produção de PG (57). Estudos relatam concentrações aumentadas destes mediadores na cavidade amniótica de gestantes em trabalho de parto (68) e já foi demonstrada sua capacidade de induzir contratilidade miometrial (69) e remodelamento cervical (64).

Em termos de celularidade, os leucócitos são essenciais para o desfecho da gestação, pois são responsáveis pela secreção das moléculas envolvidas nas cascatas desencadeadoras do trabalho de parto (36, 70, 71). Vega-Sanchez et al. (71) descreveram a presença de subpopulações leucocitárias específicas, diferenciadas das populações sanguíneas, recrutadas na interface materno-fetal no momento do parto. Este recrutamento leucocitário é induzido por quimiocinas, como a IL-8. Uma vez nos tecidos gestacionais, neutrófilos e linfócitos secretam enzimas proteolíticas, em especial as metaloproteinases de matriz (MMPs) (72, 73). As MMPs, principalmente MMP-9, degradam, entre outros constituintes das membranas

fetais, o colágeno tipo IV, seu principal constituinte. Desta maneira, a ação destas enzimas proteolíticas leva ao enfraquecimento das membranas ovulares e consequentemente à rotura. Devido sua atividade enzimática, as MMPs também são essenciais ao remodelamento da matriz extracelular da cérvix, contribuindo para o apagamento cervical.

Existem inúmeras outras moléculas que também atuam, ainda que de maneira mais sutil, no desencadeamento do parto. São fatores parácrinos e autócrinos, produzidos pela placenta, como activina-A, seu antagonista inibina-A e folistatina (74). Os níveis destes fatores estão aumentados no momento do parto, porém são menos determinantes e pouco estudados. Na verdade, o trabalho de parto é um evento complexo e dinâmico, compreende diversas vias integradas (Figura 2), que parece começar muito antes do parto *per se* e sobre o qual ainda repousam muitas questões a serem esclarecidas.

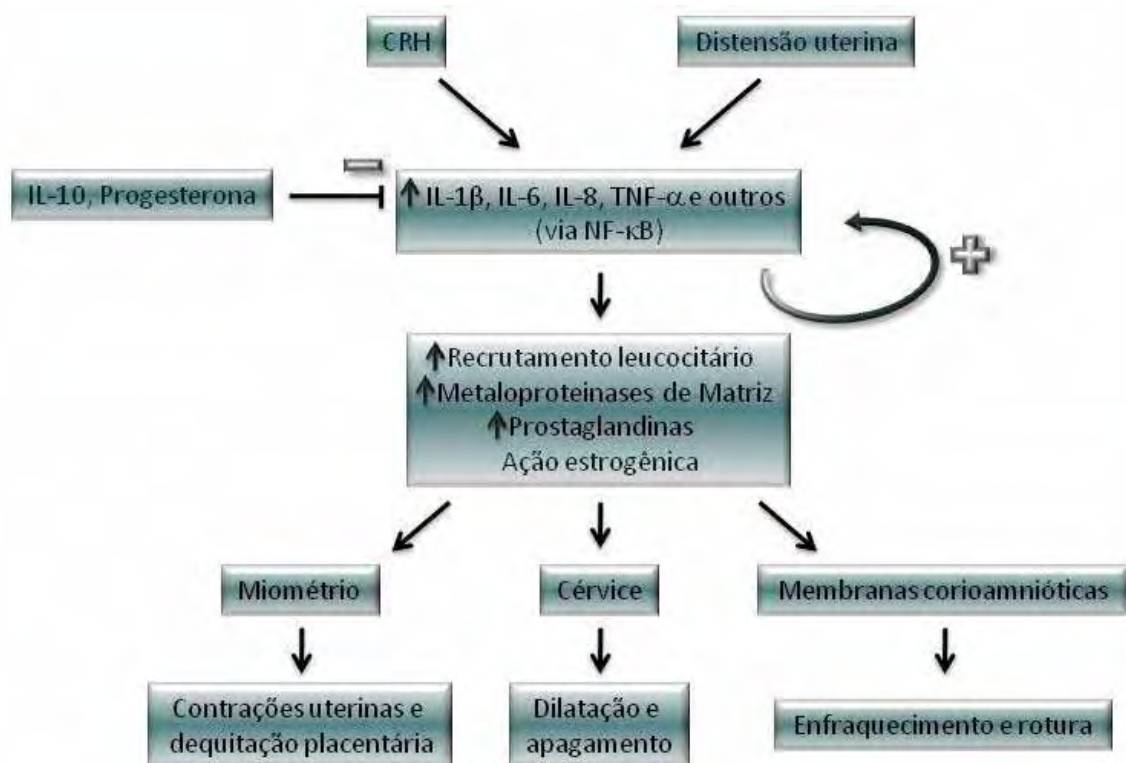


Figura 2. Modelo da cascata de mediadores envolvidos no trabalho de parto (Adaptado de Peltier, 2003).

Invasão microbiana da cavidade amniótica na gestação de termo

Apesar da relativa escassez de trabalhos que pesquisem a invasão microbiana da cavidade amniótica em gestações de termo (75-77), acredita-se que o ambiente uterino em condições fisiológicas seja estéril. Autores como Romero et al.(75) e Kim et al. (78) reforçam esse conceito ao descrevem ausência de microrganismos no LA de gestantes de termo, fora de trabalho de parto. Entretanto, Bearfield et al. (79) contradizem esse achado na medida que descrevem invasão da cavidade amniótica de 70,8% em gestações de termo.

Mesmo com a contradição que envolve este tema, a literatura é contundente ao descrever taxas elevadas de invasão microbiana em gestações complicadas quanto comparadas a gestações normais (78, 80). Já foi relatado na literatura que a invasão microbiana subclínica da cavidade amniótica ocorre em 18% das gestantes em trabalho de parto a termo e membranas ovulares íntegras (81) e em 34% das gestantes com rotura prematura de membranas de termo e que esta invasão microbiana é um fator de risco para o desenvolvimento de infecção puerperal relacionada à morbidade materna (82). Em trabalho realizado por Gómez et al. (83) foram avaliadas 148 amostras de LA de gestações de termo, na ausência ou presença de rotura prematura de membranas, e a prevalência de invasão microbiana da cavidade amniótica no grupo de gestantes com membranas íntegras foi de 15,6% em comparação com 39,7% no grupo rotura prematura das membranas.

De fato, infecções intra-amnióticas são largamente associadas a importantes complicações gestacionais como trabalho de parto prematuro (TPP) ou rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT). A presença de patógenos na cavidade amniótica é reconhecida por receptores Toll-like (TLR) presentes na superfície de células leucocitárias, deciduais, coriônicas, amnióticas e endometriais (84). Existem 10 isoformas de TLR descritas em humanos, sendo as isoformas TLR1, 2, 4 e 6 conhecidamente expressas pelos tecidos

gestacionais (85). Estes receptores apresentam importante função na imunidade inata, pois reconhecem microrganismos invasores através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS). A ativação de TLRs desencadeia uma complexa cascata de sinalização intracelular. Uma das vias intracelulares ativada é o NF- κ B que culmina na produção de citocinas pró-inflamatórias (85). Desta maneira, níveis elevados destes mediadores nos tecidos materno-fetais em decorrência da presença de microrganismos induzem ao trabalho de parto prematuramente.

Entretanto, alguns dados sugerem que nem sempre a presença de bactérias na cavidade amniótica desencadeie essa cascata. Segundo Lee et al. (86), a frequência de cultura positiva no LA de gestações de termo, em trabalho de parto, foi de 7%. Em trabalho recente, Marconi et al. (87) descreveram prevalência de 5% de invasão da cavidade amniótica em gestações de segundo trimestre que tiveram resolução da gestação à termo. Steel et al. (76) aventam a hipótese de que a cavidade amniótica ou as membranas corioamnióticas possam ser colonizadas por bactérias sem necessariamente culminar em TPP. De acordo com Yoon et al. (88), gestantes com cultura positiva do LA apresentavam níveis mais baixos de IL-6 em gestações de termo quando comparado com gestações pré-termo, sugerindo que a inflamação intra-amniótica possa ter diferente significado clínico na gestação pré-termo e na de termo.

Uma importante característica, comum a muitos casos de invasão microbiana da cavidade amniótica, é seu *status* polimicrobiano. Muitos autores relatam a presença concomitante de diversos microrganismos em casos de TPP e RPM (77, 89, 90). Essa característica é em parte responsável pelo pouco conhecimento atual sobre a influência específica de cada microrganismo na resposta imune materna e no consequente resultado gestacional. Estrada-Gutierrez et al. (91) estudaram a influência de leucócitos residentes na secreção de mediadores, dependendo do microrganismo isolado. De acordo com o estudo, *Streptococcus* do grupo B induzem a produção de MMP-9, via TNF- α , enquanto *Ureaplasma*

urealyticum estimula a secreção de PGE_2 , provavelmente via $\text{IL-1}\beta$, estimulando a contratilidade miometrial.

A principal via de acesso de bactérias patogênicas à cavidade amniótica é através do canal transcervical. O trato genital inferior feminino é normalmente colonizado por grande diversidade microbiana incluindo *Lactobacillus* sp, *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* sp, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, entre outros (92, 93). Dentre os microrganismos citados, as espécies *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* merecem destaque por serem frequentemente encontradas no LA e associadas a casos de TPP (94-97).

Esses microrganismos, pertencentes à família *Mycoplasmataceae*, não apresentam parede celular, possuem capacidade biossintética limitada e são bactérias de crescimento fastidioso. São comumente referidos na literatura como micoplasmas genitais e sua presença têm sido implicada em complicações reprodutivas e prematuridade desde a década de 70 (98). Em estudo recente, Marconi et al. (87) relataram prevalência de 40,0% de infecção intra-amniótica em gestantes em TPP que culminaram em parto prematuro em comparação com 5% em gestantes pré-termo fora de trabalho de parto. Outro estudo, que analisou 181 amostras de líquido amniótico de pacientes em TPP com membranas intactas, demonstrou que a presença de *U. urealyticum* está associada ainda ao risco aumentado para importantes morbidades perinatais, assim como ao aumento da morbidade neonatal, em comparação à infecção por outros agentes microbianos, diagnosticados por cultura (95). Adicionalmente, Novy et al. (99), em estudo experimental, reproduziram o quadro de TPP em macacas do gênero *Rhesus* inoculadas com *U. parvum* e *M. hominis*, comprovando capacidade desses microrganismos de induzir essa complicação gestacional. Entretanto, embora as espécies *M. hominis* e *U. urealyticum* sejam detectadas na cavidade amniótica, seus papéis na patogênese de complicações gestacionais ainda não estão totalmente esclarecidos.

Considerando a escassez de trabalhos na literatura que avaliem o *status* microbiológico da cavidade amniótica de gestações de termo, principalmente com envolvimento de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*, bem como a caracterização do perfil de citocinas produzidas na cavidade amniótica na presença microbiana, estudos com esses objetivos se justificam, pois poderão contribuir para a compreensão da regulação da resposta imune inata na interface materno-fetal no final da gestação.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas*

1. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6ª edição ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltda; 2008.
2. Cookson VJ, Chapman NR. NF-kappaB function in the human myometrium during pregnancy and parturition. *Histol Histopathol* 2010;25:945-56.
3. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:49-62.
4. Raghupathy R. Manipulation of cytokine production profiles as a therapeutic approach for immunologic pregnancy loss. *Indian J Biochem Biophys* 2008;45:229-36.
5. Chow SS, Craig ME, Jones CA, Hall B, Catteau J, Lloyd AR, et al. Differences in amniotic fluid and maternal serum cytokine levels in early midtrimester women without evidence of infection. *Cytokine* 2008;44:78-84.
6. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T. Cytokine production in chorioamnionitis. *J Reprod Immunol* 2000;47:185-96.
7. Huddlestone H, Schust DJ. Immune interactions at the maternal-fetal interface: a focus on antigen presentation. *Am J Reprod Immunol* 2004;51:283-9.
8. Raghupathy R. Maternal anti-placental cell-mediated reactivity and spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 1997;37:478-84.
9. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353-6.
10. Chaouat G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol* 2007;29:95-113.
11. Makhseed M, Raghupathy R, El-Shazly S, Azizieh F, Al-Harmi JA, Al-Azemi MM. Pro-inflammatory maternal cytokine profile in preterm delivery. *Am J Reprod Immunol* 2003;49:308-18.
12. El-Shazly S, Makhseed M, Azizieh F, Raghupathy R. Increased expression of pro-inflammatory cytokines in placentas of women undergoing spontaneous preterm delivery or premature rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol* 2004;52:45-52.
13. Arntzen KJ, Lien E, Austgulen R. Maternal serum levels of interleukin-6 and clinical characteristics of normal delivery at term. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997;76:55-60.
14. Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. *Hum Pathol* 2004;35:47-54.

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

15. von Dadelszen P, Watson RW, Noorwali F, Marshall JC, Parodo J, Farine D, et al. Maternal neutrophil apoptosis in normal pregnancy, preeclampsia, and normotensive intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:408-14.
16. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:601-10.
17. Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology* 2010;129:147-53.
18. Gustafsson C, Hummerdal P, Matthiesen L, Berg G, Ekerfelt C, Ernerudh J. Cytokine secretion in decidual mononuclear cells from term human pregnancy with or without labour: ELISPOT detection of IFN-gamma, IL-4, IL-10, TGF-beta and TNF-alpha. *J Reprod Immunol* 2006;71:41-56.
19. Dudley DJ, Collmer D, Mitchell MD, Trautman MS. Inflammatory cytokine mRNA in human gestational tissues: implications for term and preterm labor. *J Soc Gynecol Investig* 1996;3:328-35.
20. Mor G. Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1127:121-8.
21. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Spitz B. Vaginal cytokines in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:1433-8.
22. Houben ML, Nikkels PG, van Bleek GM, Visser GH, Rovers MM, Kessel H, et al. The association between intrauterine inflammation and spontaneous vaginal delivery at term: a cross-sectional study. *PLoS One* 2009;4:e6572.
23. Gotsch F, Gotsch F, Romero R, Erez O, Vaisbuch E, Kusanovic JP, et al. The preterm parturition syndrome and its implications for understanding the biology, risk assessment, diagnosis, treatment and prevention of preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009;22 Suppl 2:5-23.
24. Chaves JH, Babayan A, Bezerra Cde M, Linhares IM, Witkin SS. Maternal and neonatal interleukin-1 receptor antagonist genotype and pregnancy outcome in a population with a high rate of pre-term birth. *Am J Reprod Immunol* 2008;60:312-7.
25. Baggia S, Gravett MG, Witkin SS, Haluska GJ, Novy MJ. Interleukin-1 beta intra-amniotic infusion induces tumor necrosis factor-alpha, prostaglandin production, and preterm contractions in pregnant rhesus monkeys. *J Soc Gynecol Investig* 1996;3:121-6.
26. Ammala M, Nyman T, Salmi A, Rutanen EM. The interleukin-1 system in gestational tissues at term: effect of labour. *Placenta* 1997;18:717-23.

27. Axemo P, Brauner A, Pettersson M, Eriksson L, Rwamushaija E, Bergstrom S. Amniotic fluid interleukins in Swedish and Mozambican pregnant women. *Gynecol Obstet Invest* 1996;41:113-7.
28. Tabibzadeh SS, Santhanam U, Sehgal PB, May LT. Cytokine-induced production of IFN-beta 2/IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells. Modulation by estradiol-17 beta. *J Immunol* 1989;142:3134-9.
29. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998;101:311-20.
30. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 2006;80:227-36.
31. Robertson SA, Christiaens I, Dorian CL, Zaragoza DB, Care AS, Banks AM, et al. Interleukin-6 is an essential determinant of on-time parturition in the mouse. *Endocrinology* 2010;151:3996-4006.
32. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, 3rd, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci* 2009;16:206-15.
33. Motro B, Itin A, Sachs L, Keshet E. Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:3092-6.
34. De M, Sanford TH, Wood GW. Detection of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in the uterus during the second half of pregnancy in the mouse. *Endocrinology* 1992;131:14-20.
35. Hondo E, Kokubu K, Kato K, Kiso Y. Localization of interleukin-6 receptor mRNA in the pregnant and non-pregnant mouse uterus. *J Reprod Dev* 2005;51:777-81.
36. Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJ, Sato TA, Marvin KW, Mitchell MD. Cytokines, prostaglanins and parturition--a review. *Placenta* 2003;24 Suppl A:S33-46.
37. Mitchell MD, Dudley DJ, Edwin SS, Schiller SL. Interleukin-6 stimulates prostaglandin production by human amnion and decidual cells. *Eur J Pharmacol* 1991;192:189-91.
38. Olson DM, Ammann C. Role of the prostaglandins in labour and prostaglandin receptor inhibitors in the prevention of preterm labour. *Front Biosci* 2007;12:1329-43.
39. Shimoya K, Matsuzaki N, Taniguchi T, Kameda T, Koyama M, Neki R, et al. Human placenta constitutively produces interleukin-8 during pregnancy and enhances its production in intrauterine infection. *Biol Reprod* 1992;47:220-6.

40. Romero R, Ceska M, Avila C, Mazor M, Behnke E, Lindley I. Neutrophil attractant/activating peptide-1/interleukin-8 in term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:813-20.
41. Hebisch G, Grauaug AA, Neumaier-Wagner PM, Stallmach T, Huch A, Huch R. The relationship between cervical dilatation, interleukin-6 and interleukin-8 during term labor. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;80:840-8.
42. Vinatier D, Tiffet O, Dufour P, Tiberghien B, Maunoury-Lefebvre C, Monnier JC. Cytokines and pregnancy: physiology. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1992;21:535-43.
43. Hill JA. Cytokines considered critical in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1992;28:123-6.
44. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Role of tumor necrosis factor-alpha in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:1159-62.
45. Kupferminc MJ, Peaceman AM, Aderka D, Wallach D, Peyser MR, Lessing JB, et al. Soluble tumor necrosis factor receptors in maternal plasma and second-trimester amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:900-5.
46. Eades DK, Cornelius P, Pekala PH. Characterization of the tumour necrosis factor receptor in human placenta. *Placenta* 1988;9:247-51.
47. Daher S, de Arruda G, Denardi K, Blotta MH, Mamoni RL, Reck AP, Camano L, et al. Cytokines in recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2004;62:151-7.
48. Marzi M, Vigano A, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1996;106:127-33.
49. Rein DT, Breidenbach M, Honscheid B, Friebe-Hoffmann U, Engel H, Gohring UJ, et al. Preeclamptic women are deficient of interleukin-10 as assessed by cytokine release of trophoblast cells in vitro. *Cytokine* 2003;23:119-25.
50. Sadowsky DW, Novy MJ, Witkin SS, Gravett MG. Dexamethasone or interleukin-10 blocks interleukin-1beta-induced uterine contractions in pregnant rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:252-63.
51. Dudley DJ, Hunter C, Mitchell MD, Varner MW. Amniotic fluid interleukin-10 (IL-10) concentrations during pregnancy and with labor. *J Reprod Immunol* 1997;33:147-56.
52. Greig PC, Herbert WN, Robinette BL, Teot LA. Amniotic fluid interleukin-10 concentrations increase through pregnancy and are elevated in patients with preterm labor associated with intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:1223-7.

53. Simhan HN, Chura JC, Rauk PN. The effect of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 on lipopolysaccharide-stimulated production of prostaglandin E2 by cultured human decidual cells. *J Reprod Immunol* 2004;64:1-7.
54. Standiford TJ, Strieter RM, Chensue SW, Westwick J, Kasahara K, Kunkel SL. IL-4 inhibits the expression of IL-8 from stimulated human monocytes. *J Immunol* 1990;145:1435-9.
55. Fenton MJ, Buras JA, Donnelly RP. IL-4 reciprocally regulates IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in human monocytes. *J Immunol* 1992;149:1283-8.
56. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-20.
57. Peltier MR. Immunology of term and preterm labor. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:122.
58. Mendelson CR. Minireview: fetal-maternal hormonal signaling in pregnancy and labor. *Mol Endocrinol* 2009;23:947-54.
59. Tibbetts TA, Conneely OM, O'Malley BW. Progesterone via its receptor antagonizes the pro-inflammatory activity of estrogen in the mouse uterus. *Biol Reprod* 1999;60:1158-65.
60. Kalkhoven E, Wissink S, van der Saag PT, van der Burg B. Negative interaction between the RelA(p65) subunit of NF-kappaB and the progesterone receptor. *J Biol Chem* 1996;271:6217-24.
61. Pieber D, Allport VC, Hills F, Johnson M, Bennett PR. Interactions between progesterone receptor isoforms in myometrial cells in human labour. *Mol Hum Reprod* 2001;7:875-9.
62. Mesiano S. Myometrial progesterone responsiveness and the control of human parturition. *J Soc Gynecol Investig* 2004;11:193-202.
63. Akerlund M. Vasopressin and oxytocin in normal reproduction and in the pathophysiology of preterm labour and primary dysmenorrhoea. Development of receptor antagonists for therapeutic use in these conditions. *Rocz Akad Med Białymst* 2004;49:18-21.
64. Kamel RM. The onset of human parturition. *Arch Gynecol Obstet* 2010;281:975-82.
65. Speroff L, Fritz M. The endocrinology of parturition. In: Co LWaW, editor. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 7th ed 2005. p. 295-315.
66. Marton IS. Foetal adrenal steroids--initiation of human parturition. *Acta Physiol Hung* 1988;71:557-9.
67. Markovic D, Vatish M, Gu M, Slater D, Newton R, Lehnert H, et al. The onset of labor alters corticotropin-releasing hormone type 1 receptor variant expression in human myometrium: putative role of interleukin-1beta. *Endocrinology* 2007;148:3205-13.

68. Romero R, Munoz H, Gomez R, Parra M, Polanco M, Valverde V, et al. Increase in prostaglandin bioavailability precedes the onset of human parturition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996;54:187-91.
69. Fischer DP, Hutchinson JA, Farrar D, O'Donovan PJ, Woodward DF, Marshall KM. Loss of prostaglandin F2alpha, but not thromboxane, responsiveness in pregnant human myometrium during labour. *J Endocrinol* 2008;197:171-9.
70. Gomez-Lopez N, Guilbert LJ, Olson DM. Invasion of the leukocytes into the fetal-maternal interface during pregnancy. *J Leukoc Biol* 2010;88:625-33.
71. Vega-Sanchez R, Gomez-Lopez N, Flores-Pliego A, Clemente-Galvan S, Estrada-Gutierrez G, Zentella-Dehesa A, et al. Placental blood leukocytes are functional and phenotypically different than peripheral leukocytes during human labor. *J Reprod Immunol* 2010;84:100-10.
72. Vadillo-Ortega F, Estrada-Gutierrez G. Role of matrix metalloproteinases in preterm labour. *BJOG* 2005;112 Suppl 1:19-22.
73. Christiaens I, Zaragoza DB, Guilbert L, Robertson SA, Mitchell BF, Olson DM. Inflammatory processes in preterm and term parturition. *J Reprod Immunol* 2008;79:50-7.
74. Keelan JA, Marvin KW, Sato TA, McCowan LM, Coleman M, Evans LW, et al. Concentrations of activin A, inhibin A and follistatin in human amnion, choriodecidual and placental tissues at term and preterm. *J Endocrinol* 1999;163:99-106.
75. Romero R, Avila C, Santhanam U, Sehgal PB. Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor. Association with infection. *J Clin Invest* 1990;85:1392-400.
76. Steel JH, Malatos S, Kennea N, Edwards AD, Miles L, Duggan P, et al. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatr Res* 2005;57:404-11.
77. Seong HS, Lee SE, Kang JH, Romero R, Yoon BH. The frequency of microbial invasion of the amniotic cavity and histologic chorioamnionitis in women at term with intact membranes in the presence or absence of labor. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:375 e1-5.
78. Kim MJ, Romero R, Gervasi MT, Kim JS, Yoo W, Lee DC, et al. Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection. *Lab Invest* 2009;89:924-36.
79. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG* 2002;109:527-33.
80. Onderdonk AB, Hecht JL, McElrath TF, Delaney ML, Allred EN, Leviton A. Colonization of second-trimester placenta parenchyma. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:52 e1- e10.

81. Romero R, Nores J, Mazor M, Sepulveda W, Oyarzun E, Parra M, et al. Microbial invasion of the amniotic cavity during term labor. Prevalence and clinical significance. *J Reprod Med* 1993;38:543-8.
82. Romero R, Mazor M, Morrotti R, Avila C, Oyarzun E, Insunza A, et al. Infection and labor. VII. Microbial invasion of the amniotic cavity in spontaneous rupture of membranes at term. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:129-33.
83. Gomez R, Romero R, Galasso M, Behnke E, Insunza A, Cotton DB. The value of amniotic fluid interleukin-6, white blood cell count, and gram stain in the diagnosis of microbial invasion of the amniotic cavity in patients at term. *Am J Reprod Immunol* 1994;32:200-10.
84. Koga K, Mor G. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:587-600.
85. Patni S, Flynn P, Wynn LP, Seager AL, Morgan G, White JO, et al. An introduction to Toll-like receptors and their possible role in the initiation of labour. *BJOG* 2007;114:1326-34.
86. Lee SE, Romero R, Kim CJ, Shim SS, Yoon BH. Funisitis in term pregnancy is associated with microbial invasion of the amniotic cavity and intra-amniotic inflammation. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006;19:693-7.
87. Marconi C, Ramos BRA, JC P, Donders GG, Silva MG. Amniotic fluid interleukin-1 beta and interleukin-6, but not interleukin-8 correlate with microbial invasion of the amniotic cavity in preterm labor. *Am J Reprod Immunol* 2010. DOI:10.1111/j.1600-0897.2010.00940.x
88. Yoon BH, Romero R, Moon J, Chaiworapongsa T, Espinoza J, Kim YM, et al. Differences in the fetal interleukin-6 response to microbial invasion of the amniotic cavity between term and preterm gestation. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003;13:32-8.
89. Thomakos N, Daskalakis G, Papapanagiotou A, Papantoniou N, Mesogitis S, Antsaklis A. Amniotic fluid interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha at mid-trimester genetic amniocentesis: relationship to intra-amniotic microbial invasion and preterm delivery. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;148:147-51.
90. Oh KJ, Lee KA, Sohn YK, Park CW, Hong JS, Romero R, et al. Intraamniotic infection with genital mycoplasmas exhibits a more intense inflammatory response than intraamniotic infection with other microorganisms in patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2010;203:211 e1-8.
91. Estrada-Gutierrez G, Gomez-Lopez N, Zaga-Clavellina V, Giono-Cerezo S, Espejel-Nunez A, Gonzalez-Jimenez MA, et al. Interaction between pathogenic bacteria and intrauterine leukocytes triggers alternative molecular signaling cascades leading to labor in women. *Infect Immun* 2010;78:4792-9.

92. Newton ER, Piper JM, Shain RN, Perdue ST, Peairs W. Predictors of the vaginal microflora. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:845-53.
93. Silva MG, Peracoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Peracoli MT. Cervical Lactobacillus and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynaecol Obstet* 2003;81:175-82.
94. Horowitz S, Mazor M, Romero R, Horowitz J, Glezerman M. Infection of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* in the midtrimester of pregnancy. *J Reprod Med* 1995;40:375-9.
95. Yoon BH, Chang JW, Romero R. Isolation of *Ureaplasma urealyticum* from the amniotic cavity and adverse outcome in preterm labor. *Obstet Gynecol* 1998;92:77-82.
96. Shimada M, Kotani T, Sameshima H, Nagamine Y, Kodama Y, Ikenoue T, et al. Two patients with premature labour associated with *Mycoplasma hominis* infection. *J Med Microbiol* 1998;47:179-82.
97. Gerber S, Vial Y, Hohlfeld P, Witkin SS. Detection of *Ureaplasma urealyticum* in second-trimester amniotic fluid by polymerase chain reaction correlates with subsequent preterm labor and delivery. *J Infect Dis* 2003;187:518-21.
98. McCormack WM. Genital mycoplasmal infections: their relation to prematurity and other abnormalities of reproduction. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*. 1976;10:95-8.
99. Novy MJ, Duffy L, Axthelm MK, Sadowsky DW, Witkin SS, Gravett MG, et al. *Ureaplasma parvum* or *Mycoplasma hominis* as sole pathogens cause chorioamnionitis, preterm delivery, and fetal pneumonia in rhesus macaques. *Reprod Sci* 2009;16:56-70.

Capítulo II – Artigo Científico

Association between presence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* and pro and anti-inflammatory cytokines levels in amniotic fluid at term pregnancies

Bruna Ribeiro de Andrade Ramos¹, Camila Marconi¹, Dionizio Chiaratto Filho², Márcia Guimarães da Silva¹✉.

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

² Hospital Bom Jesus, Ariquemes, Rondônia, Brazil.

✉ **Corresponding author**

Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University.
Distrito de Rubião Júnior, CEP: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil.
Telephone: +55 (14) 3811-6238 Fax: +55 (14) 3815-2348
E-mail: mgsilva@fmb.unesp.br

Abstract

Introduction: Microbial invasion of the amniotic cavity has been described in term deliveries and its role on the immune modulation is of interest to the better understanding of the underlying labor processes. **Objective:** The aim of this study was to determine the prevalence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in the amniotic fluid of term pregnancies and to evaluate its influence on cytokines production at the end of pregnancy. **Patients and Methods:** A cross sectional study was conducted with fifty five pregnant women out of labor with intact membranes and gestational age between 37 and 41 weeks seen at the Bom Jesus hospital in Ariquemes, Rondônia, between June 2009 and May 2010. Amniotic fluid samples and fragments of chorioamniotic membranes were collected at cesarean section. *M. hominis* and *U. urealyticum* detection was performed by PCR and Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and Tumor Necrosis Factor (TNF)- α levels were determined by ELISA. Chorioamniotic membranes were submitted to histopatological analyses. **Results:** Presence of *M. hominis* was detected in 36.4% of amniotic fluid samples and any of them was positive for *U. urealyticum*. Regarding cytokines levels, 63.6% and 90.9% of samples have not shown detectable concentrations of TNF- α and IL-1 β . The median concentration of IL-6 and IL-8 were 107.9 pg/mL (0-517.1) and 208.1 pg/mL (0-1897.4), respectively. Interleukin-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α concentrations were not associated with the presence of *M. hominis* in amniotic fluid, regardless the gestational age. No sample had detectable IL-10 levels. The histopatological analyses have shown no chorioamnionitis in any of the membranes, only a discreet mononuclear infiltration in the decidua could be observed in 40.4% of the samples. **Conclusion:** The amniotic cavity can be colonized by *M. hominis* and the IL-6 and IL-8 production was not modulated by amniotic presence of this microorganism, in term pregnancies, regardless the gestational age.

Key words: Term pregnancies, Amniotic fluid, *Mycoplasma hominis*, Pro-inflammatory cytokines.

Introduction

Amniotic cavity in physiological conditions is thought to be a sterile environment (1, 2). As a matter of fact, intra-amniotic infection has long been linked with important obstetrical conditions such as preterm labor (PL) and preterm premature rupture of membranes (PPROM) (3-5). However, some evidence of bacterial presence in amniotic cavity in term pregnancies raises the possibility that the mere presence of microorganisms inside the intra-uterine compartment may not necessarily predispose the pregnancy to adverse outcomes (6, 7). Out of question is the fact that higher rate of bacterial infection is associated with complicated pregnancies when compared to healthy pregnancies (8, 9).

Many bacterial species have already been described in amniotic cavity infection. Onderdonk et al. (8) have isolated *Prevotella bivia*, *Staphylococcus* sp. and *Gardnerella vaginalis* from chorion parenchyma and placentas delivered prematurely. In amniotic fluid (AF) of pregnant women with PPRM, Oh et al. (10) have detected *Mycoplasma hominis*, *Streptococcus* sp, among others microorganisms. Of the bacteria already isolated from amniotic cavity, the micoplasmas species, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*, are the more constantly implied in PL and PROM cases (11-15). Indeed, Marconi et al. (11) have observed high prevalence of *M. hominis* in pregnant women with PL when compared with women without PL. Another study performed with 181 AF samples from PL patients and intact membranes has shown that presence of *U. urealyticum* is associated with increased risk for perinatal morbidities and neonatal mortality in comparison to the presence of other microorganisms detected by culture techniques (13). Additionally, Novy et al. (16) have demonstrated that *M. hominis* and another specie of *Ureaplasma*, *U. parvum*, itselfs are able to induce PL when inoculated in the amniotic cavity of *Rhesus* macaques. However more information is needed on bacterial status of the amniotic cavity in term pregnancies. According to Lee et al. (7), only 1% of term pregnancies are culture-positives for several species and that rate rises to 7% in term pregnant women in labor. Romero et al. (9) have found an even

greater rate of 18% intraamniotic microorganisms in term pregnant women at labor with intact membranes.

Microorganisms in the amniotic cavity can be recognized by Toll-like receptors (TLRs) present in chorioamniotic membranes (17). The activation of TLR leads to intracellular signaling through nuclear factor- κ B (NF- κ B) that will induce the production of pro-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8 and Tumor Necrosis Factor (TNF- α). These cytokines stimulate the secretion of additional cytokines and others mediators including uterotonic compounds, such as prostaglandins E₂ (18) and metalloproteinases (MMPs) (19) which participate in fetal membranes weakening and the consequent rupture (20, 21). Nevertheless, the exact influence of each microorganism in the production of these biochemical mediators is still poorly understood and factors such as pathogen virulence, bacterial load, nutritional and stress status and genetics differences should be taken into account.

Estrada-Gutierrez et al. (22) studied the influence of intrauterine leukocytes in triggering differential secretion of mediators depending on the infecting microorganism. According to these authors, group B streptococci induce degradation of the amniochorion as a result of MMP-9 production, probably via TNF- α , whereas *U. urealyticum* stimulates the secretion of PGE₂, probably via IL-1 β , potentially stimulating myometrial contraction. This study provided novel evidence that the immunological cells circulating within the uterine microenvironment respond differentially to infectious agent, triggering alternative molecular signaling pathway leading to labor.

Hanna et al. (23) demonstrated that there is a gestational age-dependent expression of IL-10 in the human placenta and that this cytokine production is significantly attenuated at term. These data suggest that labor is associated with withdrawal of anti-inflammatory mediators as part of an evolutionary adaptation to accelerate inflammatory process necessary for successful labor and delivery.

To better understand the meaning of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in healthy pregnancies, this study evaluated the association between presence of these bacteria and pro and anti-inflammatory cytokines levels in amniotic fluid at term pregnancies.

Patients and Methods

Study Population

A cross-sectional study was carried out to determine the presence of *M. hominis* and *U. urealyticum* and pro and anti-inflammatory cytokines levels in AF in term pregnancies. The study group consisted of 55 pregnant women who underwent elective cesarean section (CS) performed in Obstetrics Unit of the Bom Jesus Hospital, in Rondônia State, Brazil. Sample size of at least 10 pregnant women in each group was determined assuming $\alpha = 0.05$ and $\beta = 0.10$ and considering the cytokines mean and standard deviation.

According to the gestational age at delivery, patients were included in the following groups:

- G1: CS at 37th week gestation (n=11)
- G2: CS at 38th week gestation (n=24)
- G3: CS at 39th week gestation or later (n=20)

Gestational age was calculated from the first day of the last menstruation and/or from the first trimester ultrasound. Exclusion criteria were multiple pregnancies, diabetes, fetal anomalies and placenta previa. The Institution Human Research Ethics Committee approved the study (Protocol 3032/2008), and written informed consent was obtained from all participants.

AF and chorioamniotic membranes collection

AF collection was performed at CS through the membranes using sterile syringe and samples were immediately frozen at -20°C. Samples of the membranes were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin and eosin for histopathological analyses.

Detection of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in AF

AF samples were transported to the laboratory, centrifuged and supernatants and pellets were stored separately at -80°C. Bacterial DNA was extracted from the pellets with QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen®) and Polymerase Chain Reactions (PCRs) were performed with GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) for the detection of intra-amniotic bacteria. Detection of *U.urealyticum* was performed with primers for a 429-bp region of urease gene (forward primer 5'-CAA TCT GCT CGT GAA GTA TTA C-3' and reverse primer 5'-ACG ACG TCC ATA AGC AAC T-3'). For *M.hominis*, primers (forward primer 5'-CAA TGG CTA ATG CCG GAT ACG C-3' and reverse primer 5'-GGT ACC GTC AGT CTG CAA T-3') were used for the detection of a 334 bp sequence of 16S rRNA gene. The incubation parameters for the amplifications were 40 cycles 98°C for 30s, 61°C for 60s and 72°C for 60s. PCR products were visualized under UV transillumination after electrophoresis gel-red staining gel. Positive (*U. urealyticum* ATCC 27813 and *M. hominis* ATCC 19095) and negative (sterile water) controls were included in all reactions.

Measurement of Cytokines in AF

The pro and anti-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α were measured in the AF supernatants by ELISA using DuoSet Kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to manufacturer's instructions. All the samples were tested in duplicates. Inter-assay variability was 10.0% for IL-1 β , 0.2% for IL-6, 4.5% for IL-8 and 23.0% for TNF- α .

Sensitivity of the assays for IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α were, respectively, 0.1, 0.3, 10.2, 1.0 and 0.4 pg/mL.

Statistical Analysis

Sociodemographic data herein are presented in median (range). Non-parametric Mann–Whitney test and Kruskal-Wallis test was used for continuous values not normally distributed (i.e. cytokines levels). $p < 0.05$ was considered significant. All tests were performed using SigmaStat 9.0 (Jandel Scientific Corp., San Rafael, CA, USA).

Results

Sociodemographic and obstetric characteristics of the study population are summarized in Table 1. Median maternal age was 24 years and 81.8% of patients reported to be married. The median gestational age at delivery was 38w2d and the parity ranged from 1 to 4 deliveries.

Table 1. Sociodemographic and obstetric characteristics

Maternal characteristics	
Materna age	24.0 (17 - 42)
Marital status	
Married	45 (81.8)
Single	8 (14.6)
NA	2 (3.6)
Gestacional age	38w2d (37w – 40w5d)
Parity	1 (1 - 4)

Overall, 20 samples (36.4%) were positive for *M. hominis* and none for *U. urealyticum*. Pro-inflammatory cytokines levels are presented in Figure 1. Only 9.1% and 39.7% of samples had detectable levels of IL-1 β and TNF- α . The data on pro-inflammatory cytokines

measurement are shown in Table 2. IL-10 levels could not be detected in any of analyzed samples.

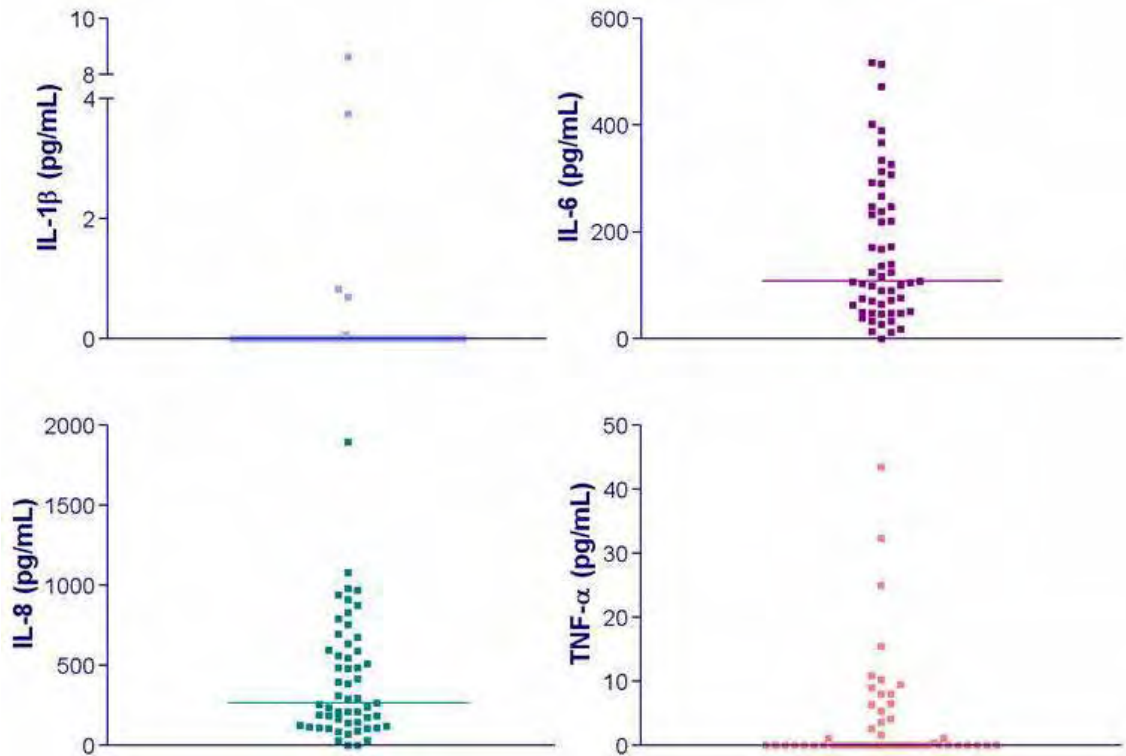


Figure 1. IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α levels (pg/mL) in 55 AF samples of term pregnancies.

Table 2. Concentration of IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α in amniotic fluid of term pregnancies.

Cytokines	Concentration (pg/mL)	Detection rate (%)
IL-1 β	0 (0 – 8.7)	9,1
IL-6	107.9 (0 – 517.1)	98.2
IL-8	208.1 (0 – 1897.9)	96.4
TNF- α	0 (0 – 43.5)	39.7

IL-6 and IL-8 levels were not associated with gestational age at delivery or with the presence of *M.hominis*, regardless the gestational age (Figure 2). A slightly increase in these levels throughout the 37th to 40th week gestation could be observed though (Figure 3).

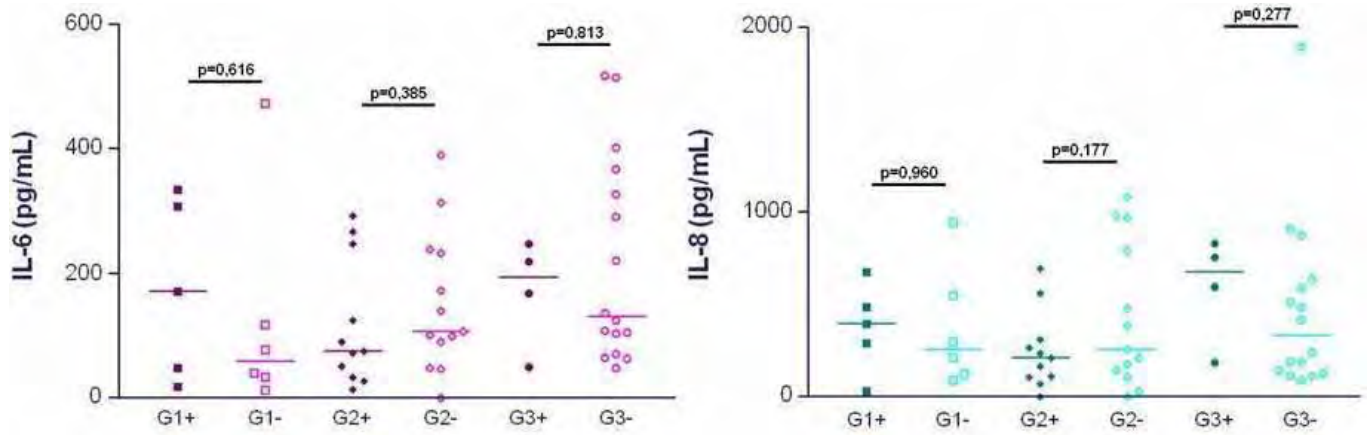


Figure 2. IL-6 and IL-8 concentrations (pg/mL) in the groups G1 to G3 in the presence (G+ groups) or absence (G- groups) of *Mycoplasma hominis*.

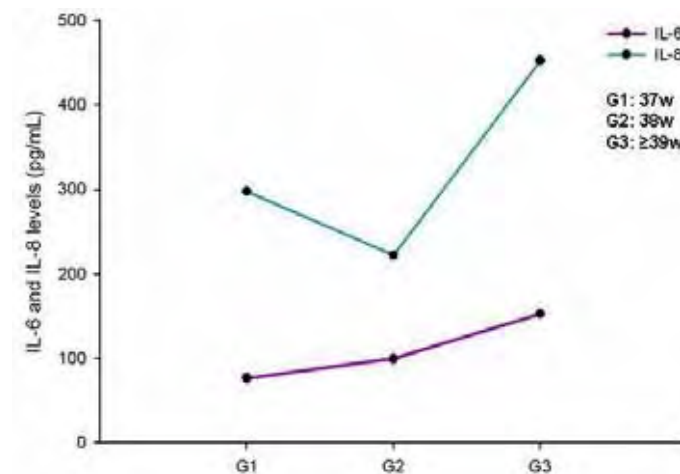


Figure 3. IL-6 and IL-8 median levels (pg/mL) in AF from term pregnancies according to the groups.

The histopathological analyses have shown no chorioamnionitis in any of the studied membranes. Only a discreet mononuclear infiltration in the decidua could be observed in 40.4% of the samples.

Discussion

Bacterial status of amniotic cavity in term pregnancies is still a controversial subject. In a recent study, Steel et al. (6) have demonstrated a large proportion of bacteria in chorioamniotic membranes in both term and preterm deliveries, even when histologic chorioamnionitis is absent. Bearfield et al. (24) have detected bacterial presence by the

amplification of a conserved region of the bacterial 16S rRNA gene in 70.8% of the amniotic fluid samples from pregnant women with intact membranes undergoing cesarean section. Microorganisms detected in this work included *Streptococcus* spp. and *Fusobacterium nucleatum* species. Still, there is little information on frequency and significance of presence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in term gestation. In the present study we have observed absence of *U. urealyticum* and a high prevalence of *M. hominis* in AF of term pregnancies. It is of knowledge that these microorganisms are able to cause PL and PPROM (16). Several studies suggest that, among genital micoplasmas, *Ureaplasma* species present higher pathogenic value and therefore it would make sense to be absent in AF of healthy pregnancies (25-27). Nonetheless, *Mycoplasma hominis* is also reported as a major contributor in obstetrical complications. The high prevalence of this microorganism may though be partially explained by its relatively lower virulence, the high sensitivity of the technique employed and by the characteristics of the studied population. At the same time, some authors believe that it have been given so much importance to this bacteria as etiologic factor of pregnancy complications (26).

Regarding cytokines concentrations, we have observed no detectable levels of IL-10 in term AF, which corroborates with literature, once this cytokine is known to play an important role in mid trimester pregnancy. Simultaneously, our results have shown high levels of IL-6 and IL-8 in AF of term pregnancies and a not statistically significant, but progressive rising in those levels throughout the last weeks of gestation. This observation is also consistent with the current literature, Hebisch et al. (28) have detected rising levels of those cytokines at the end of gestation towards parturition. As for IL-1 β and TNF- α levels, we have observed low detection rates. This may be indicative that IL-6 and IL-8 downregulates IL-1 β and TNF- α production by choriomniotic membranes. Other authors have reported similar results regarding TNF- α detection (11, 29).

Cytokines have been implied in the onset of labor in physiological and pathological conditions. These mediators play a role in important events such as cervical ripening, rupture

of membranes and miometrial contractility that ultimately lead to parturition (30-32). The presence of microorganisms in uterine compartment can induce a pro-inflammatory cascade and thus provoking the above-mentioned events before the term of gestation. Oh et al. (33) have demonstrated that micoplasmas can elicit host inflammatory response. The authors reported higher intensity of inflammatory response in pregnant women with PPRM and positive micoplasmas AF culture when compared to pregnant women with PPRM and AF culture positive for others microorganisms. Furthermore, in a preview study of our work group it was demonstrated the correlation between presence of *M. hominis* and IL-1 β and IL-6 levels in pregnant women with PL (11). In this work, however, the presence of *M. hominis* had no influence on immune response or on the gestational outcome; oppositely, IL-6 and IL-8 levels seem to be due to the pre-labor period itself. In the same way, the discreet mononuclear infiltrate observed in almost half of the samples is compatible with the biological event of leukocytes influx that precedes the initiation of parturition (34, 35). Still a new concept, some authors have been suggesting that the sole presence of bacteria in amniotic cavity not always necessarily elicit inflammatory reaction (6).

According to Bearfield et al. (24) mean levels of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α , and prostaglandin E2 in amniotic fluid samples, taken at the time of cesarean section, did not differ between women with and without PCR evidence of infection. These authors believe that it remains elusive whether elevated levels of these mediators are found in cases when infection can only be determined using sensitive molecular methods.

In this study it was not possible to quantify bacterial load, but we could consider that this load was not enough to elicits an important inflammatory response. Another limitation of our study so far is the lack of other species assessment. Recent studies have demonstrated that the detection of 16S rRNA gene that is highly conserved among bacteria is a useful technique to evaluate microbiological status in AF, especially in mixed infections (36, 37). In a recent work, Kim et al. (2) have used fluorescent staining and fluorescent *in situ* hybridization for real-time 16S rRNA to detect microbial invasion. Usage of such sensitive and specific

techniques will not only confirm previous results but also provide solid evidence that bacteria are present in AF of pregnant women at term.

Therefore, the high rates of *M. hominis* presence in AF of uncomplicated term pregnancies along with the absence of immunomodulation observed in those women suggest a state of bacterial colonization of amniotic cavity and that individuals may have different predisposition to infection and subsequent complications during pregnancy. In that way, the preliminary data herein corroborate the prevalence of the inflammatory state of amniotic cavity near delivery and suggest that the presence of *Mycoplasma hominis* in amniotic cavity of term pregnancies may have different clinical relevance when compared to preterm deliveries. Additionally, this study provides normative data for pro-inflammatory cytokines in AF at term and is a valuable tool for future diagnostic and comparative studies.

References

1. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. BJOG 2006;113:17-42.
2. Kim MJ, Romero R, Gervasi MT, Kim JS, Yoo W, Lee DC, et al. Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection. Lab Invest 2009;89:924-36.
3. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. Lancet 2008;371:75-84.
4. Gibbs RS, Romero R, Hillier SL, Eschenbach DA, Sweet RL. A review of premature birth and subclinical infection. Am J Obstet Gynecol 1992;166:1515-28.
5. Strevens H, Allen K, Thornton JG. Management of premature prelabor rupture of the membranes. Ann N Y Acad Sci 2010;1205:123-9.
6. Steel JH, Malatos S, Kennea N, Edwards AD, Miles L, Duggan P, et al. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. Pediatr Res 2005;57:404-11.
7. Lee SE, Romero R, Kim CJ, Shim SS, Yoon BH. Funisitis in term pregnancy is associated with microbial invasion of the amniotic cavity and intra-amniotic inflammation. J Matern Fetal Neonatal Med 2006;19:693-7.

*References elaborated according to the International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal. Ann Intern Med 1997;126:36-47.

8. Onderdonk AB, Hecht JL, McElrath TF, Delaney ML, Allred EN, Leviton A. Colonization of second-trimester placenta parenchyma. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:52 e1- e10.
9. Romero R, Nores J, Mazor M, Sepulveda W, Oyarzun E, Parra M, et al. Microbial invasion of the amniotic cavity during term labor. Prevalence and clinical significance. *J Reprod Med* 1993;38:543-8.
10. Oh KJ, Lee SE, Jung H, Kim G, Romero R, Yoon BH. Detection of ureaplasmas by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with cervical insufficiency. *J Perinat Med* 2010;38:261-8.
11. Marconi C, de Andrade Ramos BR, Peracoli JC, Donders GG, Silva MG. Amniotic fluid interleukin-1 beta and interleukin-6, but not interleukin-8 correlate with microbial invasion of the amniotic cavity in preterm labor. *Am J Reprod Immunol* 2010. DOI:10.1111/j.1600-0897.2010.00940.x.
12. Horowitz S, Mazor M, Romero R, Horowitz J, Glezerman M. Infection of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* in the midtrimester of pregnancy. *J Reprod Med* 1995;40:375-9.13. Yoon BH, Chang JW, Romero R. Isolation of *Ureaplasma urealyticum* from the amniotic cavity and adverse outcome in preterm labor. *Obstet Gynecol* 1998;92:77-82.
14. Shimada M, Kotani T, Sameshima H, Nagamine Y, Kodama Y, Ikenoue T, et al. Two patients with premature labour associated with *Mycoplasma hominis* infection. *J Med Microbiol* 1998;47:179-82.
15. Gerber S, Vial Y, Hohlfeld P, Witkin SS. Detection of *Ureaplasma urealyticum* in second-trimester amniotic fluid by polymerase chain reaction correlates with subsequent preterm labor and delivery. *J Infect Dis* 2003;187:518-21.
16. Novy MJ, Duffy L, Axthelm MK, Sadowsky DW, Witkin SS, Gravett MG, et al. *Ureaplasma parvum* or *Mycoplasma hominis* as sole pathogens cause chorioamnionitis, preterm delivery, and fetal pneumonia in rhesus macaques. *Reprod Sci* 2009;16:56-70.
17. Koga K, Mor G. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:587-600.
18. Sato TA, Keelan JA, Mitchell MD. Critical paracrine interactions between TNF-alpha and IL-10 regulate lipopolysaccharide-stimulated human choriondecidual cytokine and prostaglandin E2 production. *J Immunol* 2003;170:158-66.
19. Arechavaleta-Velasco F, Ogando D, Parry S, Vadillo-Ortega F. Production of matrix metalloproteinase-9 in lipopolysaccharide-stimulated human amnion occurs through an autocrine and paracrine proinflammatory cytokine-dependent system. *Biol Reprod* 2002;67:1952-8.

20. Romero R, Mazor M, Wu YK, Sirtori M, Oyarzun E, Mitchell MD, et al. Infection in the pathogenesis of preterm labor. *Semin Perinatol* 1988;12:262-79.
21. Vadillo Ortega F, Hernandez Miranda A, Bermejo Martinez L, Beltran Montoya J, Gonzalez Avila G. Transition from the latent to the active enzymatic form as a model of regulation of extracellular matrix degradation in the chorioamnion during human labor. *Ginecol Obstet Mex* 1995;63:166-72.
22. Estrada-Gutierrez G, Gomez-Lopez N, Zaga-Clavellina V, Giono-Cerezo S, Espejel-Nunez A, Gonzalez-Jimenez MA, et al. Interaction between pathogenic bacteria and intrauterine leukocytes triggers alternative molecular signaling cascades leading to labor in women. *Infect Immun* 2010;78:4792-9.
23. Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, et al. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J Immunol* 2000;164:5721-8.
24. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG* 2002;109:527-33.
25. Perni SC, Vardhana S, Korneeva I, Tuttle SL, Paraskevas LR, Chasen ST, et al. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in midtrimester amniotic fluid: association with amniotic fluid cytokine levels and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:1382-6.
26. Larsen B, Hwang J. *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2010. DOI:10.1155/2010/521921.
27. Kacerovsky M, Pavlovsky M, Tosner J. Preterm premature rupture of the membranes and genital mycoplasmas. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2009;52:117-20.
28. Hebisch G, Grauaug AA, Neumaier-Wagner PM, Stallmach T, Huch A, Huch R. The relationship between cervical dilatation, interleukin-6 and interleukin-8 during term labor. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;80:840-8.
29. Houben ML, Nikkels PG, van Bleek GM, Visser GH, Rovers MM, Kessel H, et al. The association between intrauterine inflammation and spontaneous vaginal delivery at term: a cross-sectional study. *PLoS One* 2009;4:e6572.
30. Sennstrom MB, Ekman G, Westergren-Thorsson G, Malmstrom A, Bystrom B, Endresen U, et al. Human cervical ripening, an inflammatory process mediated by cytokines. *Mol Hum Reprod* 2000;6:375-81.

31. Young A, Thomson AJ, Ledingham M, Jordan F, Greer IA, Norman JE. Immunolocalization of proinflammatory cytokines in myometrium, cervix, and fetal membranes during human parturition at term. *Biol Reprod* 2002;66:445-9.
32. Slater DM, Dennes WJ, Campa JS, Poston L, Bennett PR. Expression of cyclo-oxygenase types-1 and -2 in human myometrium throughout pregnancy. *Mol Hum Reprod* 1999;5:880-4.
33. Oh KJ, Lee KA, Sohn YK, Park CW, Hong JS, Romero R, et al. Intraamniotic infection with genital mycoplasmas exhibits a more intense inflammatory response than intraamniotic infection with other microorganisms in patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2010;203:211 e1-8.
34. Gomez-Lopez N, Guilbert LJ, Olson DM. Invasion of the leukocytes into the fetal-maternal interface during pregnancy. *J Leukoc Biol* 2010;88:625-33.
35. Thomson AJ, Telfer JF, Young A, Campbell S, Stewart CJ, Cameron IT, et al. Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process. *Hum Reprod* 1999;14:229-36.
36. Miralles R, Hodge R, McParland PC, Field DJ, Bell SC, Taylor DJ, et al. Relationship between antenatal inflammation and antenatal infection identified by detection of microbial genes by polymerase chain reaction. *Pediatr Res* 2005;57:570-7.
37. Markenson GR, Martin RK, Tillotson-Criss M, Foley KS, Stewart RS, Jr., Yancey M. The use of the polymerase chain reaction to detect bacteria in amniotic fluid in pregnancies complicated by preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:1471-7.

Anexos

Assinatura dos Pesquisadores

Bruna Ribeiro de Andrade Ramos

Endereço: Rua Salim Kahil, 501 - Vila Santana - CEP 18606-802, Botucatu, SP

Telefones (14) 3882-9055 / (11) 7326-6600

CPF: 367225748-65, RG: 48697764-X

Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Endereço: Rua Izidoro Bertaglia, 746 - Jardim Chácara dos Pinheiros - CEP 18610-140, Botucatu, SP

Telefones (14) 3815-2551/ 3815-2417 / 9741-2496

CRB 26376/01-D, CPF: 141279738-11, RG: 22827398-5

Dr. Dionísio Chiaratto Filho

Endereço: Av. Marabá, 3566 - CEP 78933-015, Ariquemes-RO

Telefones (69) 3536-6080 / 3536-4899 / 9988-068

CRM 1781/ RO, CPF: 779576609-91, RG: 4171474-3 SSP - PR



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 coordenação: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 01 de dezembro de 2008

Of. 513/08-CEP

Ilustríssima Senhora
Prof^a. Dr^a. Márcia Guimarães da Silva
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Prof^a Márcia,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Pesquisa de Mycoplasma hominis e Ureaplasma urealyticum na cavidade amniótica de gestantes em trabalho de parto prematuro: associação com níveis de citocinas", que será conduzida por Bruna Ribeiro de Andrade Ramos, orientada por Vossa Senhoria com a colaboração do Prof. Dr. José Carlos Peraçoli, Camila Marconi, Jossimara Polettini e Juliana Poiatti, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 01/12/2008.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Apresentar Relatório Final de Atividades ao final da execução deste projeto.

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.