

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Medicina  
Campus de Botucatu

**Correlação entre presença de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* e níveis de IL-6 e IL-10 no líquido amniótico de gestantes com trabalho de parto prematuro.**

Bruna Ribeiro de Andrade Ramos

**Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva**

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Unesp, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica.

**Botucatu  
2008**

Bruna Ribeiro de Andrade Ramos

**Correlação entre presença de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* e níveis IL-6 e IL-10 no líquido amniótico de gestantes com trabalho de parto prematuro.**

**Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva**

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Unesp, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica.

**Botucatu  
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Ramos, Bruna Ribeiro de Andrade.

Correlação entre presença de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* e níveis IL-6 e IL-10 no líquido amniótico de gestantes com trabalho de parto prematuro / Bruna Ribeiro de Andrade Ramos. - Botucatu [s.n], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientadora: Marcia Guimarães da Silva

1. Micoplasma - Diagnóstico 2. Biologia molecular 3. Parto prematuro - Complicações e seqüelas

Palavras-chave: Gestantes; Líquido amniótico; *Mycoplasma hominis*; Trabalho de Parto Prematuro; *Ureaplasma urealyticum*

# *Dedicatória*

Aos meus pais, Laïse e Paulo Octavio, sem os quais eu nada seria, pela dedicação constante e amor incondicional.

Aos meus irmãos, Bárbara e Túlio, meus amores e meus grandes amigos. Sinto muito a falta de vocês.

Aos meus avós, Maria Leony e Pedro Paulo (em memória), que mesmo não estando fisicamente entre nós, estão sempre em minha memória como uma doce lembrança e me guiando em minha jornada.

Aos meus avós, Maria Helena e Antônio Octavio, tão queridos, sempre presentes em minha vida me apoiando.

À minha orientadora, Márcia Guimarães da Silva, que é mais do que uma professora, uma verdadeira mestre a quem muito admiro.

# *Agradecimentos*

A Deus, por me guiar em todos os momentos e ter posto minha família ao meu lado.

Às amigas, Janaina, Érika, Viviane e Luciana, pelos momentos de risadas, descontração e confidências.

Aos meus amigos Karollyne, Imara, Rodrigo e Mariana, de quem sinto muita falta.

Ao Bruno, por ter estado ao meu lado por muito tempo em momentos importantes da minha vida.

À minha família, que mesmo longe, está em meu coração.

À minha turma, biomed XLI, com quem tive o prazer de conviver por um período mais breve do que gostaria.

Às meninas do laboratório, Camila, Ana Carolina, Eliane, Larissa, Laura e Natália, pelo ótimo ambiente de trabalho, pela amizade e por poder contar com vocês.

À Jossimara, nossa “subchefe”, pela paciência de ouvir minhas infindáveis perguntas mesmo que se queixando, pelos ensinamentos passados e pela amizade.

À Dra. Andréia da Rocha Tristão, uma ótima profissional.

Às pacientes, que possibilitaram a realização deste trabalho mesmo estando em um momento tão delicado.

Ao Instituto de Biociências e à Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pela minha formação e oportunidade de realizar este estágio.

Ao Departamento de Patologia e funcionários, pela atenção e disponibilidade.

*“Concedei-nos Senhor, Serenidade necessária para aceitar as coisas não podemos modificar, Coragem para modificar aquelas que podemos e Sabedoria para distinguir umas das outras.”*

## Sumário

<b>1. Resumo.....</b>	<b>2</b>
<b>2. Introdução.....</b>	<b>04</b>
<b>3. Objetivo.....</b>	<b>13</b>
<b>4. Material e Métodos.....</b>	<b>13</b>
4.1. Desenho do estudo.....	13
4.2. Pacientes.....	13
4.3. Colheita de líquido amniótico.....	15
4.4. Pesquisa de invasão microbiana na cavidade amniótica.....	15
4.4.1. Detecção de <i>Ureaplasma urealyticum</i> e <i>Mycoplasma hominis</i> no LA.....	15
4.4.2. Pesquisa de infecção do LA por outras espécies bacterianas através da detecção do gene RNAr 16S.....	17
4.4.3. Seqüenciamento do gene bacteriano RNAr 16S.....	19
4.5. Determinação de IL-6 e IL-10 no LA por ELISA.....	21
4.6. Análise estatística.....	22
<b>5. Resultados.....</b>	<b>23</b>
5.1. Incidência de TPP e características das gestantes.....	23
5.2. Detecção de invasão microbiana na cavidade amniótica.....	24
5.2.1. Detecção de <i>Mycoplasma hominis</i> e <i>Ureaplasma urealyticum</i> no LA.....	24
5.2.2. Detecção de infecção do LA por outras espécies bacterianas.....	25
5.2.3. Identificação das espécies bacterianas no LA pelo seqüenciamento do gene RNAr 16S.....	25
5.3. Análise de citocinas no LA.....	26
5.4. Análise de citocinas no LA em relação à presença de infecção da cavidade amniótica.....	27
<b>6. Discussão.....</b>	<b>27</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>32</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>41</b>

## 1. Resumo

**Introdução:** O trabalho de parto prematuro (TPP) é uma intercorrência obstétrica com etiologia multifatorial, que tem como principal complicação a prematuridade. A infecção da cavidade amniótica (CA) é um fator associado ao TPP e, nos últimos anos, inúmeros trabalhos têm demonstrado a presença de diferentes espécies bacterianas no líquido amniótico (LA) de pacientes em TPP. Dentre essas, destacam-se duas espécies de micoplasmas genitais, *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*, que embora sejam freqüentemente detectadas no LA ainda são pouco estudadas quanto à sua relação com essa complicação obstétrica. **Objetivo:** Avaliar a infecção na cavidade amniótica por *M. hominis* e *U. urealyticum* bem como determinar os níveis de IL-6 e IL-10 no líquido amniótico de gestantes com trabalho de parto prematuro. **Pacientes e Métodos:** Foi realizado estudo prospectivo com 20 gestantes em TPP, atendidas no Serviço de Obstetria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. O grupo controle foi constituído de 20 gestantes com indicação para amniocentese transabdominal para avaliação da maturidade fetal. Foram obtidas amostras do líquido amniótico e das membranas corioamnióticas de todas as pacientes incluídas no estudo. A pesquisa de *M.hominis* e *U.urealyticum* no LA foi realizada empregando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e os níveis de IL-6 e IL-10 quantificados por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os dados obtidos referentes às características maternas, infecção da cavidade amniótica e concentração de citocinas no LA foram submetidos ao teste z de proporção e ao teste de Mann-Whitney e o nível de significância adotado foi de 5%. **Resultados:** A incidência de TPP no período do estudo foi de 5,8%. No grupo TPP, a pesquisa de invasão microbiana da CA foi positiva para *M. hominis* (35,0%), *U. urealyticum* (10,0%) e gene RNAr 16S (30,0%), sendo todas as freqüências superiores às encontradas no grupo fora de trabalho de parto ( $p < 0,05$ ). Quanto às citocinas, níveis aumentados de IL-6 ( $p < 0,001$ ) foram detectados no LA das pacientes em TPP em relação às gestantes fora de

trabalho de parto. Além disso, amostras de LA, com presença de infecção, apresentaram níveis significativamente aumentados de IL-6 ( $p=0,03$ ). A IL-10 foi detectada em apenas uma amostra do grupo TPP. **Conclusão:** Gestantes em TPP apresentaram alta frequência de infecção no LA, incluindo infecção por *M. hominis* e *U. urealyticum* quando comparadas às gestantes fora de trabalho de parto e existe correlação entre essa infecção e níveis aumentados de IL-6 no LA.

## 2. Introdução

O Trabalho de Parto Prematuro (TPP) é uma importante intercorrência obstétrica que acomete de 5 a 10% das gestações<sup>1-3</sup> e, apesar dos novos tratamentos e estratégias de prevenção, sua incidência não tem diminuído nos últimos anos<sup>4</sup>. O TPP é caracterizado pela presença de uma ou mais contrações a cada 10 minutos, com ritmo e frequência regulares, acompanhadas de esvaecimento cervical igual ou superior a 50% e/ou dilatação cervical igual ou superior a 2 cm, no período em que a idade gestacional encontra-se entre 22 e 37 semanas<sup>5</sup>. A principal complicação relacionada aos episódios de TPP é a prematuridade, que é responsável por 70% dos índices de morbidade e mortalidade perinatal<sup>6</sup>.

A etiologia do TPP é multifatorial, já que muitos fatores de risco podem estar envolvidos e atuando conjuntamente até a instalação deste processo. Muitos fatores associados à ocorrência de TPP são conhecidos, como a ocorrência de TPP em gestações prévias, múltiplas gestações, polidramnia, sangramento vaginal durante a gestação, rotura prematura de membranas (RPM), vaginose bacteriana (VB), entre outros<sup>5,7-9</sup>. A diversidade de fatores potencialmente envolvidos na etiologia do TPP é, sem dúvida, uma dificuldade para o desenvolvimento de medidas efetivas para sua prevenção<sup>10</sup>.

Atualmente, inúmeros estudos têm buscado elucidar as causas e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do TPP. No entanto, apesar das várias contribuições realizadas, a patogênese do TPP ainda não é completamente conhecida<sup>1, 11,12</sup>.

Entre os fatores que são conhecidamente relacionados ao desenvolvimento do TPP, a infecção da cavidade amniótica (CA) merece destaque por estar freqüentemente associada a episódios de TPP<sup>1,13,14</sup>. Define-se como infecção da CA a presença de microrganismos no líquido amniótico (LA), na presença ou ausência de sinais clínicos de infecção<sup>15</sup>.

Trabalhos da literatura relatam diferentes taxas de cultura positiva do líquido amniótico, variando de 10 a 40% dos casos de TPP<sup>14,16-18</sup>. Somado a isso, já foi demonstrado que pacientes com infecção da CA, no segundo trimestre de gestação, têm risco aumentado para o desenvolvimento dessa complicação<sup>19</sup>. Segundo Goldenberg et al.<sup>14</sup>, a infecção da cavidade amniótica está relacionada a 80% dos casos de TPP com idade gestacional inferior a 30 semanas, comparado com apenas 30% das gestantes, em trabalho de parto, com idade superior a 37 semanas. Outros estudos, porém, têm relatado a presença de vírus<sup>20</sup> e inúmeras espécies de bactérias<sup>21</sup> no líquido amniótico de pacientes assintomáticas.

Acredita-se que as taxas de infecção do LA relatadas por estudos que utilizam métodos de culturas convencionais podem ser subestimadas, visto a inexistência de métodos capazes de suprir todas as exigências dos inúmeros microrganismos potencialmente presentes no LA<sup>22</sup>. No entanto, a introdução de novas metodologias moleculares, que possibilitam a pesquisa de seqüências conservadas inter-espécies, como o gene RNA ribossômico 16S, têm se mostrado muito eficiente para a determinação das freqüências reais de positividade de infecção do LA<sup>23-25</sup>.

Os microrganismos podem ter acesso às membranas corioamnióticas e ao LA por algumas vias: ascendente transcervical, hematogênica através da placenta, iatrogênica no momento da amniocentese e outros procedimentos invasivos ou oriundo da cavidade peritoneal por meio das tubas uterinas<sup>1</sup>.

O conceito que a invasão microbiana da cavidade amniótica segue a via ascendente é apoiado pela observação de que, em geral, os microrganismos isolados do líquido amniótico de gestantes com RPM, são similares aos encontrados no trato genital inferior (TGI)<sup>26</sup>. Sustentando esse conceito, Galask et al.<sup>27</sup> descreveram que os microrganismos presentes no TGI apresentam capacidade de atingir as membranas e infectar a cavidade

amniótica. A importância da infecção, por via ascendente, também pode ser demonstrada pelos resultados que revelam presença de bactéria nas membranas corioamnióticas, associadas à resposta inflamatória, em 80% de gestantes em TPP que tiveram a resolução da gestação por cesárea<sup>28</sup>.

Gyr et al.<sup>29</sup> demonstraram que as espécies bacterianas que colonizam o TGI apresentam diferença quanto à capacidade de invasão das membranas corioamnióticas. Somado a isso, já é conhecido que algumas espécies bacterianas encontradas colonizando o TGI, principalmente aquelas associadas à VB, liberam sialidases e prolidases. As sialidases são enzimas que clivam o ácido siálico de glicoproteínas, dentre elas a IgA, mucinas e receptores celulares e, dessa forma, está associada à evasão da imunidade inata e adquirida, pela degradação da IgA cervical e alteração de receptores da membrana celular, respectivamente<sup>30</sup>. As prolidases são enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular, facilitam a infiltração celular e, portanto, contribuem para a quebra da barreira de proteção das mucosas<sup>31</sup>. Segundo Cauci et al.<sup>32</sup>, mulheres, no segundo trimestre de gestação, com maiores atividades de sialidase e prolidase, acompanhadas de aumento de pH vaginal, apresentam maior risco de desenvolver parto prematuro. Ainda segundo esses autores, as inter-relações sinérgicas entre os fatores de virulência produzidos por bactérias, presentes na microbiota vaginal alterada, estiveram associados ao risco elevado de resultados gestacionais adversos.

Inúmeras espécies bacterianas são encontradas colonizando o TGI como: *Lactobacillus* sp, *Gardnerella vaginalis*, *Bacterioides* sp., *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, entre outros<sup>33,34</sup>. Dentre os microrganismos citados, as espécies *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*, merecem destaque por serem freqüentemente encontrados no líquido amniótico e associados aos casos de TPP<sup>19,35-37</sup>.

Estudos recentes têm detectado a presença de micoplasmas em líquido amniótico pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), que além de ser mais rápida, apresenta aumento da sensibilidade quando comparada com as técnicas de culturas convencionais<sup>38,39</sup>. Diferentes espécies de micoplasmas podem ser isoladas do TGI, porém apenas as espécies *M. hominis* e *U. urealyticum* são consideradas importantes patógenos humanos<sup>40</sup>. Esses microrganismos estão associados ao desenvolvimento de inúmeras complicações como cervicite, doença inflamatória pélvica, RPM, corioamnionite, parto prematuro, além de infecções em recém-nascidos<sup>41</sup>.

A presença de microrganismos na CA leva a ativação do sistema imune inato, que constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos. Nesse sentido, os componentes bacterianos são reconhecidos pelos receptores *toll-like* (TLR) presentes na superfície celular de leucócitos e trofoblastos, que emitem, para o interior destas, sinais celulares para produção e liberação de citocinas, proteases e outros fatores<sup>42</sup>. Assim, a presença de microrganismos no LA, reconhecidos pelos TLR presentes nas membranas corioamnióticas, pode ser considerada a base patológica de muitos casos de TPP e/ou RPM associados à infecção.

Já é aceito na literatura que os microrganismos e seus produtos podem ascender do trato genital inferior para a cavidade amniótica<sup>15</sup> e suscitar resposta inflamatória local, levando ao TPP e ao parto prematuro<sup>16,43</sup>. Em concordância com esses achados, estudo recente demonstrou que 80% das gestantes em TPP apresentavam presença de bactéria nas membranas corioamnióticas associada à resposta inflamatória no LA<sup>28</sup>.

Na presença de infecção do LA, células amnióticas, coriônicas e deciduais secretam citocinas inflamatórias que podem atuar indiretamente, induzindo aumento da atividade uterina. Níveis elevados de citocinas inflamatórias no LA dessas gestantes, também sugerem presença de infecção,

mesmo quando sinais clínicos estão ausentes, havendo correlação entre infecção intra-amniótica e corioamnionite histológica<sup>16</sup>. Portanto, a presença de microrganismos na cavidade amniótica leva à ativação da imunidade inata, mediada por células, que se caracteriza pela produção de citocinas e, portanto, o estudo de mediadores inflamatórios tem mostrado desempenhar importante papel para a compreensão da fisiopatologia do TPP.

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular secretadas por leucócitos e outras inúmeras células do organismo em resposta a diferentes estímulos, atuando como mediadoras das células do sistema imune<sup>44</sup>.

A interleucina (IL) 1 $\beta$  foi a primeira citocina implicada no início do TPP associado à infecção<sup>45</sup>. A evidência que sustenta a participação de IL-1 nessa complicação gestacional é que essa citocina é produzida por células decíduais em resposta a produtos bacterianos<sup>46,47</sup>. Além disso, a IL-1 pode estimular produção de prostaglandina pelo epitélio amniótico e pelas células decíduais<sup>48</sup> e estimular contratilidade miometrial<sup>49</sup>. Já é conhecido que a administração de IL-1 em animais prenhes induz TPP<sup>46</sup>, fenômeno este que pode ser bloqueado através da administração de seu receptor antagonista<sup>50</sup>. Em pacientes com corioamnionite histológica a IL-1 $\beta$  é expressa em células inflamatórias do cório e da decídua, sendo os macrófagos a principal fonte dessa citocina nesses tecidos<sup>51</sup>.

A IL-6, a exemplo da IL-1 $\beta$ , também é secretada por vários tipos celulares dentre eles células endometriais, decíduais e macrófagos. Lockwood et al.<sup>52</sup>, determinando a concentração de IL-6 na secreção cervical de pacientes com parto prematuro, concluíram que níveis aumentados dessa citocina, quantificados entre a 24<sup>a</sup> e 36<sup>a</sup> semanas de gestação, estão relacionados com RPM, sendo que, em metade dos casos, níveis maiores que 250 pg/mL estão relacionados a RPM. Estudos<sup>13,53,54</sup> têm sugerido que a IL-6 é a citocina mais envolvida na fisiopatologia do TPP associado a infecção da cavidade amniótica.

Concentrações acima de 1,5 ng/mL foram detectadas no líquido amniótico de 88% das mulheres com parto prematuro em idade gestacional inferior a 34 semanas, quando comparadas com 12% das mulheres com parto prematuro após 34 semanas de gestação<sup>12</sup>.

De acordo com Jacobsson et al.<sup>55</sup>, pacientes com invasão microbiana da cavidade amniótica apresentaram níveis significativamente elevados de IL-6 em relação às aquelas sem infecção do LA. Ainda segundo esses autores, as pacientes que tiveram resolução da gestação em até sete dias do início do TPP apresentaram níveis superiores de IL-6 no LA em comparação às gestantes com período superior a sete dias entre o início do TPP e o parto. Em conjunto, esses dados sugerem que a concentração IL-6, cervical ou no LA, é um dos melhores preditores de parto prematuro.

A IL-8 é uma citocina que induz quimiotaxia neutrofílica, tendo função importante no mecanismo de defesa do hospedeiro. É produzida pela placenta humana durante a gestação<sup>56</sup> e detectada no líquido amniótico, a partir do segundo trimestre da gestação normal<sup>57</sup>. Níveis elevados de IL-8 são observados no líquido amniótico, durante infecções por microrganismos presentes nos tecidos materno-fetais<sup>58</sup>, havendo correlação entre a concentração dessa citocina e o número de neutrófilos presentes no líquido amniótico<sup>57</sup>. Segundo Jacobsson et al.<sup>18</sup>, níveis elevados de IL-8 são detectados no LA de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT), mas essa detecção apresenta baixa sensibilidade e especificidade no grupo de gestantes com TPP. Para Fortunato et al.<sup>59</sup>, essa diferença no valor preditivo entre TPP e RPM-PT não é surpreendente, pois mecanismos diferentes parecem estar envolvidos na patogênese dessas complicações gestacionais.

O TNF- $\alpha$  tem sido detectado nas células de Hofbauer e deciduais, atuando como regulador da proliferação celular na unidade feto-placentária, já

que o papel dessa citocina no aumento de apoptose está bem documentado<sup>60</sup>. O TNF- $\alpha$  tem propriedades similares a IL-1 $\beta$ , sendo secretado por macrófagos ativados. A identificação de TNF- $\alpha$  na decídua humana e de seus receptores nas células placentárias sugere que o TNF- $\alpha$  desempenha papel fundamental na rede de citocinas produzidas na gestação<sup>61</sup>. No líquido amniótico de gestantes com infecção intra-amniótica, os níveis dessa citocina encontram-se mais elevados do que em gestantes sem infecção<sup>62</sup>. Além disso, a presença de TNF- $\alpha$  na secreção cervical de mulheres com contrações uterinas é fator preditivo de parto prematuro<sup>63</sup>.

Trabalhos recentes têm mostrado que a administração de antibióticos não tem prevenido com sucesso muitos casos de TPP<sup>64,65</sup>. O parto prematuro, assim como a injúria fetal no contexto da infecção, pode requerer não somente a administração de antimicrobianos, como também a administração de mediadores modificadores da resposta inflamatória como IL-10<sup>66,67</sup>, fator inibidor da migração de macrófagos<sup>68</sup>, anti-oxidantes<sup>69</sup> e bloqueadores de TNF- $\alpha$ <sup>70</sup>.

Já é conhecido que a IL-10 inibe a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, agindo na resolução do processo inflamatório. Neste sentido, Dudley et al.<sup>71</sup> usando modelo murino, relatam que administração de IL-10 em ratas prenhes, antes e após a inoculação de LPS, previne o nascimento prematuro.

A IL-10 é uma citocina de 26kDa multifuncional que é produzida por vários tipos celulares em humanos, incluindo monócitos, macrófagos, linfócitos B, células Th2, células decíduais<sup>72</sup> e membranas corioamnióticas<sup>72</sup>. Além de inibir a produção de citocinas, incluindo IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e fator estimulador de colônia de macrófago e granulócito (GM-CSF)<sup>73</sup>, a IL-10 reduz apresentação de antígeno por monócitos<sup>74</sup> e portanto, a literatura sugere seu papel imuno-inibidor *in vivo*.

Maksheed et al.<sup>75</sup> e Wu et al.<sup>76</sup> relataram alta produção de IL-10 na gestação de sucesso quando comparado com abortos espontâneos, atribuindo papel importante da IL-10 na manutenção da gestação normal. Holmes et al.<sup>77</sup> relataram níveis aumentados de IL-10 no plasma, em gestantes normais, incluindo o 3º dia pós-parto, em relação às mulheres não grávidas. Segundo Benian et al.<sup>78</sup> níveis aumentados de IL-10, no plasma e placenta, de gestantes com pré-eclâmpsia são necessários para auxiliar no balanço Th1/Th2 de citocinas. Juntos, esses estudos propõem papel importante da IL-10 no sucesso da gestação.

É conhecido que alta porcentagem de gestantes em trabalho de parto prematuro apresenta corioamnionite ou, pelo menos, evidências de infecção subclínica. Segundo Menon et al.<sup>79</sup>, as membranas corioamnióticas são locais de produção de citocinas inflamatórias. Ainda segundo estes autores, a detecção de RNA mensageiro de IL-1 e IL-6 está aumentada em membranas infectadas ou estimuladas com endotoxinas. Nesta mesma linha, Fortunato et al.<sup>80</sup> descrevem que o LPS induz produção de TNF- $\alpha$  em membranas corioamnióticas. Porém, quando há associação de estímulo com LPS e imunorregulação com IL-10, ocorre diminuição dose-dependente da produção de RNA mensageiro de TNF- $\alpha$ .

Portanto, a presença de citocinas produzidas nos tecidos gestacionais, sugere que mecanismos de imunidade, importantes na defesa contra infecções, estejam agindo na interface materno-fetal. Muitas dessas citocinas estão envolvidas na indução da síntese de prostaglandina e/ou expressão do receptor para ocitocina, desencadeando o TPP<sup>57</sup>.

Inúmeros autores têm relatado que pacientes que apresentam infecção da CA são menos responsivas à terapia de tocolise, devido à resposta inflamatória<sup>16,81</sup>. Logo, devido à ausência de um tratamento efetivo ao TPP, há a necessidade de esclarecer as causas e os mecanismos envolvidos nesta

intercorrência, para que se possa definir os grupos de risco, permitindo, desta forma, tomar medidas preventivas efetivas.

Apesar dos avanços obtidos na Neonatologia, a morbidade e mortalidade resultantes das altas taxas de nascimentos prematuros têm permanecido constantes nas últimas décadas<sup>4</sup>. São muitas as complicações perinatais resultantes da prematuridade, os recém-nascidos prematuros têm maiores riscos para morbidades neurológicas, complicações respiratórias e gastro-intestinais<sup>82</sup>. Além disso, há um conseqüente aumento do período de hospitalização e internação em Unidade de Terapia Intensiva, bem como o aumento de utilização de medicamentos de alto custo que, em conjunto, resultam na elevação dos gastos do serviço de saúde nessas situações.

Assim, a comparação da freqüência de infecção na cavidade amniótica entre gestantes em TPP e fora de trabalho de parto, e a correlação com os níveis de citocinas são conhecimentos importantes para compreensão dos mecanismos envolvidos no TPP.

### **3. Objetivo**

O objetivo desse trabalho foi avaliar a infecção na cavidade amniótica por *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* bem como determinar os níveis de IL-6 e IL-10 no líquido amniótico em gestantes com trabalho de parto prematuro.

### **4. Material e Métodos**

#### **4.1. Desenho do estudo**

Foi realizado estudo prospectivo. Para o cálculo do tamanho amostral, fixando-se  $\alpha=0,05$  e  $\beta=0,10$  e a menor variação da concentração de citocinas no líquido amniótico que apresenta diferença estatisticamente significativa entre os grupos de gestantes em trabalho de parto prematuro (TPP) e fora de trabalho de parto (Grupo controle), além da variabilidade das dosagens de citocinas em cada um dos grupos, que não segue distribuição normal, o tamanho calculado da amostra foi de, no mínimo, 20 gestantes por grupo.

#### **4.2. Pacientes**

Foram incluídas no estudo 20 pacientes em TPP, com idade gestacional entre 26 e 36 semanas, atendidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. A idade gestacional foi estabelecida pela data da última menstruação ou por exame ultrassonográfico precoce (até 20 semanas).

O diagnóstico de TPP foi confirmado pela presença de uma ou mais contrações a cada 10 minutos com ritmo e frequência regulares e esvaecimento cervical igual ou superior a 50% e/ou dilatação cervical igual ou superior a 2 cm<sup>5</sup>.

As pacientes com diagnóstico de TPP foram internadas na Enfermaria de Obstetrícia, sendo controladas clinicamente por meio de avaliação da

freqüência cardíaca e temperatura a cada 6 horas. Foram excluídas deste estudo, pacientes com gestação múltipla, rotura prematura de membranas, placenta prévia, incompetência istmo-cervical, fertilização *in vitro*, presença de corioamnionite histológica ou presença de sangue no líquido amniótico.

Cinco pacientes em TPP, que tiveram indicação de avaliação de maturidade pulmonar fetal, foram puncionadas através da amniocentese transabdominal guiada por ultra-sonografia, seguindo o protocolo estabelecido pelo Serviço de Obstetrícia. Nas 15 pacientes em TPP, que não havia indicação para amniocentese, o LA foi coletado no momento da resolução da gestação por cesárea ou punção transvaginal. As pacientes em que as amostras de LA foram coletadas durante o parto, somente foram incluídas no estudo, se a resolução da gestação ocorreu em intervalo de tempo de, no máximo, sete dias do início do trabalho de parto. Todas as pacientes em trabalho de parto prematuro, incluídas nesse estudo, apresentaram parto prematuro, como desfecho gestacional.

Como grupo controle, foram incluídas no estudo 20 gestantes com idade gestacional inferior a 37 semanas, pareadas em relação à idade gestacional das pacientes com TPP, que tiveram indicação de amniocentese transabdominal para avaliação da maturidade pulmonar fetal, por apresentarem diabetes e/ou hipertensão arterial.

Todas as gestantes envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexos 1 e 2), tendo sido o projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, sob o protocolo 448/2005 (Anexo 3).

### **4.3. Coleta de líquido amniótico**

As amostras de líquido amniótico obtidas no momento da resolução da gestação ou por amniocentese guiada por ultra-sonografia foram imediatamente transportadas ao Laboratório de Patologia Placentária no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. As amostras coletadas foram fracionadas em alíquotas de 1,0mL e centrifugadas a 15.000g à temperatura ambiente. Os sobrenadantes e os *pellets* obtidos foram armazenados separadamente a -80°C até o momento do processamento.

### **4.4. Pesquisa de invasão microbiana na cavidade amniótica**

A pesquisa de invasão microbiana da cavidade amniótica foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para *M.hominis*, *U. urealyticum* e para o gene bacteriano RNAr 16S.

#### **4.4.1. Detecção de *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* no líquido amniótico**

##### *4.4.1.1. Extração do ácido nucléico*

O *pellet* do LA obtido por centrifugação foi ressuscitado em 1,0mL de Tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline Solution*) e centrifugado por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado, e adicionado 20,0μL de água Milli-Q. Em seguida, a solução foi levada à ebulição por 10 minutos sendo, imediatamente resfriada em gelo<sup>38</sup>.

##### *4.4.1.2. Controles positivos das PCR*

Como controles positivos, foram utilizadas as linhagens padrão adquiridas de *Ureaplasma urealyticum* (ATCC 27813) e *Mycoplasma hominis* (ATCC 15488). Essas cepas foram cultivadas utilizando, respectivamente, os meios de cultura B-10 e Hayflick modificado<sup>83</sup>. Após o período de incubação, de aproximadamente seis dias, alíquotas de 1,0mL das culturas foram

centrifugadas a 15.000g por 60 minutos à 4°C. Após o procedimento de descarte dos sobrenadantes, os *pellets* foram ressuspensos em PBS e submetidos à incubação por 10 minutos a 95°C, com posterior resfriamento para liberação do ácido nucléico.

#### 4.4.1.3. Amplificação da seqüência de 429bp do gene da urease de *Ureaplasma urealyticum*

As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2mL em volumes totais de 25,0µL, contendo 1,0µL de cada *primer* (25µM) (Tabela 1), 12,5µL de *GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega)* e 5,0µL de amostra. Controles positivos (*U. urealyticum* ATCC 27813) e negativos (água Milli-Q) foram utilizados em todas as reações. A incubação foi realizada em termociclador (*Eppendorf Mastercycler Personal*), com um ciclo inicial de desnaturação a 98°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 98° C por 30 segundos, anelamento a 61°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, além de um ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos.

#### 4.4.1.4. Amplificação da seqüência de 334bp do gene RNA ribossômico 16S de *Mycoplasma hominis*

As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2mL em volumes totais de 25,0µL, contendo 1,0µL de cada *primer* (25µM) (Tabela 1), 12,5µL de *GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega)* e 5,0µL da amostra. Controles positivos (*M. hominis* ATCC 15488) e negativos (água Milli-Q) foram utilizados em todas as reações. A incubação foi realizada em termociclador (*Eppendorf Mastercycler Personal*), com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 61°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos, além de um ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos.

#### 4.4.1.5. Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações do gene da urease de *U. urealyticum* e RNAr 16S de *M. hominis* foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5% preparado em tampão 1X TBE (0,09M Tris-Borato; 0,002 EDTA) e corado com Brometo de Etídeo (0,1µg/mL), em 100 V por 30 minutos. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100bp, e posteriormente, fotografado sob transiluminação UV.

#### **4.4.2. Pesquisa de infecção do LA por outras espécies bacterianas através da detecção do gene RNAr 16S**

##### 4.4.2.1. Extração do ácido nucléico com solução de CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)

Os *pellets* de LA obtidos por centrifugação foram submetidos à etapa prévia de digestão com 5µL de proteinase K (400,0µg/mL) por 3 horas a 56°C. Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 96°C para inativação da enzima. Foram adicionados aos produtos digeridos 100 µL de solução de NaCl 5M e 100µL da solução CTAB/NaCl pré-aquecida a 56°C. As amostras foram incubadas a 56°C por 10 minutos e, em seguida, foram adicionados 750µL de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1. O material foi agitado por 10 segundos e centrifugado por 5 minutos a 15.700g a 4°C. Posteriormente, os sobrenadantes foram transferidos para novo microtubo e adicionados 450,0µL de etanol absoluto a -20°C, seguido de uma incubação por 10 minutos a -20°C. Após essa incubação, as amostras foram novamente centrifugadas, o álcool eliminado e adicionados 450,0µL de etanol a 70%. Seguido de nova centrifugação, o álcool foi eliminado e os microtubos transferidos para o

concentrador (*Concentrator 5301, Eppendorf*) por 30 minutos. Nesse momento, as amostras foram ressuspensas em 50,0 $\mu$ L de tampão TE (Tris/EDTA).

O protocolo de extração utilizado foi padronizado no Laboratório de Patologia Placentária e a eficiência das extrações realizadas foi confirmada através da detecção, por PCR, do gene da  $\beta$ -globina de todas as amostras avaliadas.

#### 4.4.2.2. Amplificação da seqüência de aproximadamente 1500bp do gene bacteriano rRNA 16S

As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2mL em volumes totais de 25,0 $\mu$ L, contendo 1 $\mu$ L de cada *primer* (25,0 $\mu$ M) (Tabela 1), 12,5 $\mu$ L de *GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega)* e 5 $\mu$ L da amostra. Controles positivos (*Staphylococcus aureus* ATCC 19095) e negativos (água Milli-Q) foram utilizados em todas as reações. A incubação foi realizada em termociclador (*Eppendorf Mastercycler Personal*), com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, além de um ciclo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

#### 4.4.2.3. Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5% preparado em tampão 1X TBE (0,09M Tris-Borato; 0,002 EDTA) e corado com Brometo de Etídeo (0,1 $\mu$ g/mL), em 100 V por 40 minutos. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 250bp, e posteriormente, fotografado sob transiluminação UV.

**Tabela 1.** Seqüências iniciadoras para a detecção do gene da urease de *Ureaplasma urealyticum*<sup>84</sup>, do gene rRNA 16S de *Mycoplasma hominis*<sup>85</sup> e do gene bacteriano RNAr 16S<sup>25</sup>.

GENES	MICROORGANISMOS	SEQÜÊNCIAS INICIADORAS	PRODUTOS
Uréase	<b><i>U. urealyticum</i></b>	<b>U5</b> 5'-CAA TCT GCT CGT GAA GTA TTA C-3'	429bp
		<b>U4</b> 5'-ACG ACG TCC ATA AGC AAC T-3'	429bp
RNAr 16S	<b><i>M. hominis</i></b>	<b>M1</b> 5'-CAA TGG CTA ATG CCG GAT ACG C-3'	334bp
		<b>M2</b> 5'-GGT ACC GTC AGT CTG CAA T-3'	334bp
RNAr 16S	Várias spp.	<b>FD1</b> 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	~1.500bp
		<b>RP1</b> 5'-ACG GHT ACC TTG TTA CGA CTT-3'	~1.500bp

#### 4.4.3. Seqüenciamento do gene bacteriano RNAr 16S

##### 4.4.3.1. Reação de seqüenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o *ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)* que contém iniciadores que flanqueiam nas direções *foward* (5'- 3') e *reverse* (3'- 5').

As reações foram realizadas em microtubos de 0,2mL com volumes totais de 10,0µL, contendo 2,0µL de *ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)*, 0,5µL do *primer foward* (10,0µM) e 2,0µL do produto obtido na PCR. As mesmas reações foram repetidas utilizando o *primer reverse* (10,0µM). A incubação foi realizada em termociclador (*PTC 200, MJ Research*), com um ciclo inicial de desnaturação a 96°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 96°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 60 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

##### 4.4.3.2. Reação de precipitação

Os produtos obtidos na reação de seqüenciamento foram submetidos à precipitação. Inicialmente foram adicionados 80,0mL de isopropanol 80% nos microtubos contendo os produtos da reação. Em seguida, as amostras foram

centrifugadas a 16.100g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Após a adição de 150,0mL de etanol 70%, foi realizada nova centrifugação e descarte do sobrenadante. A eliminação do álcool excedente foi realizada no concentrador (*Concentrator 5301, Eppendorf*).

#### 4.4.3.3. Seqüenciamento

As amostras foram diluídas em 2,2 $\mu$ L de Blue Dextran acrescido de 5 $^{\circ}$  Dye (*Applied Biosystems*) em concentração 1:8 para posterior aplicação em gel desnaturante de uréia-poliacrilamida 5% (*Long Ranger Singel Packs/BMA*).

O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático de DNA, *DNA Sequencer ABI Prism 377 (Applied Biosystems)*, com voltagem fixada em 300V e o intervalo de tempo para a coleta de sinais fluorescentes em 2400 scans por hora. A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 1X (0,09M Tris-Borato; 0,002 EDTA) por 3 horas e 30 minutos a 200W com temperatura aproximada de 51 $^{\circ}$ C.

Durante a eletroforese, a fluorescência detectada na região do *laser scanner* foi coletada e estocada pelo *software Data Collection 2.6 (Applied Biosystems)*. Posteriormente, os dados foram analisados pelo *software Sequencing Analysis 3.4 (Applied Biosystems)*, através da transformação da intensidade de fluorescência em picos correspondentes aos nucleotídeos (cromatograma).

As seqüências obtidas foram analisadas utilizando o BLAST (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para avaliação da porcentagem de identidade e determinação da espécie bacteriana referente ao gene RNAr 16S analisado. Para a identificação de espécies foi adotada uma identidade mínima de 90% entre a seqüência submetida à análise e as existentes no banco de dados.

#### **4.5. Determinação de IL-6 e IL-10 no LA por ensaio imunoenzimático (ELISA)**

Inicialmente, placas de poliestireno com 96 orifícios e fundo plano de alta afinidade (*MaxSorp, Nunc, Life Tech. Inc. Maryland, USA*) foram sensibilizadas por 18 horas a 4°C, em câmara úmida, com anticorpo de captura: IL-6 (Lote HD 3207023) e IL-10 (Lote DY217B) *R&D Systems, DuoSet, (Minneapolis, MN)* diluído em tampão PBS, pH 7,2. Após incubação, foram realizadas 3 lavagens da placa com solução de PBS pH 7,2 contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T). Esse procedimento foi repetido em todas as etapas de lavagem até a fase anterior à adição do substrato. O bloqueio dos sítios livres da placa foi realizado com solução de PBS-T contendo leite desnatado (Molico-Nestlé) na concentração de 5,0% (PBST-M) durante três horas à temperatura ambiente. Após a lavagem da placa, foram adicionados na primeira coluna 100,0µL das citocinas recombinantes humanas: IL-6 (Lote HD 1069976) e IL-10 (Lote 1099492) em concentrações indicadas pelo fabricante para obtenção da curva padrão. Nos demais orifícios foram distribuídos 100,0µL do líquido amniótico com posterior incubação por quatro horas à temperatura ambiente. Após esse período e lavagem, foram adicionados 100,0µL de anticorpo de detecção: IL-6 (Lote SV 1407022) e IL-10 (Lote SW1507092) e as placas foram mantidas por três horas à temperatura ambiente. Em seguida à lavagem, foram adicionados 100µL de streptoavidina (Lote AEM 4907032) na diluição 1:200 em cada orifício da placa e a reação incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o procedimento de lavagem, foram adicionados 100,0µL do substrato constituído de 12,5mL de tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0, 10,0mg de ortofenilenodiamina (*Sigma, Chemical Co, USA*) e a reação incubada por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara escura. A reação foi interrompida por adição de 50,0µL de solução de ácido sulfúrico 2N e as densidades ópticas avaliadas em leitor automático de ELISA (*Titertek Multiskan*), em comprimento

de onda de 492nm. As concentrações das citocinas no líquido amniótico foram calculadas sobre a curva padrão obtida com diferentes concentrações das citocinas recombinantes humanas IL-6 e IL-10.

Os coeficientes de variação intra-ensaio foram de 0,15% para IL-6 e 10,2% para IL-10. O limite de detecção dos ensaios para IL-6 e IL-10 foram, respectivamente, 0,3 pg/mL e 15,0 pg/mL.

#### **4.6. Análise estatística**

Os dados relativos às características das gestantes em relação às variáveis sócio-demográficas e gestacionais foram submetidos ao teste z de comparação entre proporções. A idade materna, a idade gestacional no momento da obtenção do líquido amniótico e as concentrações de IL-6 e IL-10 foram submetidas ao teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre os grupos controle e TPP. O nível de significância adotado para os testes empregados foi de 5,0%<sup>86</sup>. O software utilizado para as análises foi o Sigma Stat 3.1 (Jandel Corporation).

## **5. Resultados**

### **5.1. Incidência de TPP e características das gestantes**

No período do estudo, foram realizados 1785 partos no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Nesse período, a incidência de TPP com bolsa íntegra foi de 5,8%. Os dados referentes às variáveis sócio-demográficas, à gestação atual e aos antecedentes obstétricos foram avaliados em todas as gestantes incluídas no estudo. Os dados relativos aos antecedentes obstétricos revelaram que as pacientes do grupo TPP apresentaram maior frequência de episódios de TPP em gestações prévias. Quanto às demais variáveis avaliadas não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos estudados (Tabela 2).

Em relação à idade gestacional no momento da inclusão no estudo, a mediana do grupo controle foi de 34s2d (30s2d-36s2d) e no grupo TPP foi de 33s1d (26s2d-36s), não apresentando diferença significativa entre os grupos.

**Tabela 2.** Variáveis sócio-demográficas e obstétricas de gestantes dos grupos controle e TPP.

Variáveis	Controle (N=20)	TPP (N=20)	p
<b>Idade (anos)*</b>	30 (20-43)	25 (14-39)	0,09
<b>Estado civil</b>			
<b>Solteira</b>	3 (15,0%)	4 (20,0%)	1,00
<b>União Estável</b>	17 (75,0%)	16 (80,0%)	1,00
<b>Etnia</b>			
<b>Branca</b>	17 (85,0%)	17 (85,0%)	0,66
<b>Não branca</b>	3 (15,0%)	3 (15,0%)	0,66
<b>Tabagismo</b>	2/18 (11,1%)	3/14 (21,4%)	0,78
<b>Paridade</b>			
<b>Primigesta</b>	5 (25,0%)	7 (35,0%)	0,73
<b>Multigesta</b>	15 (75,0%)	13 (65,0%)	0,73
<b>Intercorrências gestacionais anteriores</b>			
<b>RPM</b>	-	-	-
<b>Abortos</b>	3/15 (20,0%)	3/13 (23,1%)	0,73
<b>TPP</b>	2/15 (13,3%)	8/13 (61,5%)	0,02

\*valores expressos em mediana e (valores mínimos e máximos)

## 5.2. Detecção de invasão microbiana na cavidade amniótica

### 5.2.1. Detecção de *M. hominis* e *U. urealyticum* no líquido amniótico

A pesquisa de *M. hominis* foi positiva em sete amostras de líquido amniótico de gestantes pertencentes ao grupo TPP (35,0%) e em apenas uma amostra do grupo controle (5,0%) (p=0,04). Em relação à detecção de *U. urealyticum*, foram observadas duas amostras positivas (10,0%), sendo que ambas foram provenientes de gestantes do grupo TPP e apresentaram co-infecção por *M. hominis* (Figura 1), não havendo diferença de positividade entre os grupos estudados (p=0,33).

### 5.2.2. Detecção de infecção do líquido amniótico por outras espécies bacterianas

A presença do gene bacteriano RNAr 16S foi observada em 30,0% das amostras de LA das gestantes do grupo TPP. Dentre as seis amostras positivas para o RNAr 16S, cinco (83,3%) foram positivas para, pelo menos, uma espécie de micoplasma (Tabela 3). Os resultados obtidos nessa análise não revelaram positividade dentre as amostras de LA grupo controle ( $p=0,03$ ).

### 5.2.3. Identificação das espécies bacterianas no líquido amniótico pelo seqüenciamento do gene RNAr 16S

A avaliação das seqüências do gene RNAr 16S detectados nas amostras de LA somente possibilitou a determinação do gênero *Bacterioides* em única amostra que não apresentou infecção por mais de uma espécie bacteriana. Nas demais amostras avaliadas não foi possível a determinação das espécies relacionadas ao gene de interesse.

Sendo assim, considerando os resultados da detecção de todos os genes bacterianos pesquisados, foram observadas oito amostras de LA de pacientes em TPP positivas para um ou mais dos genes bacterianos pesquisados (Tabela 3). Portanto, a freqüência de infecção da CA em pacientes em TPP foi de 40,0%, enquanto que apenas uma amostra (5,0%) do grupo controle apresentou positividade para infecção ( $p<0,05$ ).

**Tabela 3.** Microrganismos identificados no líquido amniótico de gestantes em TPP pela técnica da PCR para pesquisa de *M. hominis* e *U. urealyticum* e do gene bacteriano RNAr 16S.

LA de pacientes em TPP	Pesquisa de micoplasma	Pesquisa de RNAr 16S bacteriano	Sequenciamento do RNAr 16S bacteriano
<b>Amostra 1</b>	Mh, Uu	Positiva	Nd
Amostra 2	Mh, Uu	Positiva	Nd
<b>Amostra 3</b>	Mh	Positiva	Nd
Amostra 4	Negativa	Positiva	<i>Bacterioides</i> sp.
<b>Amostra 5</b>	Mh	Negativa	Nd
Amostra 6	Mh	Positiva	Nd
<b>Amostra 7</b>	Mh	Negativa	Nd
Amostra 8	Mh	Positiva	Nd

Mh= *Mycoplasma hominis* , Uu= *Ureaplasma urealyticum*, Nd= Não determinada até o momento.

### 5.3. Análise de citocinas no líquido amniótico

Os níveis de IL-6 e IL-10 no líquido amniótico das gestantes do grupo controle e TPP estão representados na Tabela 4. Gestantes do grupo TPP apresentaram níveis significativamente mais elevados de IL-6 ( $p < 0,001$ ) em comparação às gestantes do grupo controle.

Em relação às dosagens de IL-10, por quantidade reduzida de LA obtida, 12 de 20 amostras do grupo controle e 13 de 20 do grupo TPP foram avaliadas. Desse total, 92,3% das amostras de LA de gestantes do grupo TPP e 100% das amostras do grupo controle apresentaram concentrações inferiores ao limite de detecção do ensaio (Tabela 4).

**Tabela 4.** Medianas das concentrações de IL-6 e de IL-10 (pg/mL) e valores mínimos e máximos no líquido amniótico de gestantes do grupo controle e TPP.

Citocinas	Controle	TPP	p
IL-6	43,8 (1,1-84,3)	135,0 (27,6-182,3)	<0,001
IL-10*	0 (0-0)	0 (0-78,3)	0,719

\* Para essa avaliação foram processadas 12 amostras de LA do grupo controle e 13 amostras de LA do grupo TPP.

#### 5.4. Análise de citocinas no líquido amniótico em relação à presença de infecção da cavidade amniótica

Com relação IL-6, a mediana da concentração foi de 166,4pg/mL (34,6-182,3) nas amostras de LA positivas para infecção microbiana e de 112,6pg/mL (27,6-159,7) nas amostras com ausência de infecção, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,03). Para a IL-10, apenas em uma amostra de LA do grupo TPP, com presença de infecção da cavidade amniótica por *M. hominis* e *U. urealyticum*, foi detectada a citocina na concentração de 78,3pg/mL

### 6. Discussão

O TPP é uma grave intercorrência obstétrica, em cuja etiologia multifatorial pode-se destacar a infecção da cavidade amniótica e a inflamação intra-amniótica<sup>14</sup>. Microrganismos presentes na microbiota vaginal ascendem transcervicalmente atingindo e infectando a CA. A morbidade perinatal resultante da liberação de endotoxinas e exotoxinas desses microrganismos e da estimulação da produção de citocinas inflamatórias, prostaglandinas e metaloproteinases incluem, principalmente, a prematuridade com aumento da suscetibilidade a complicações cerebrais<sup>87</sup> e pulmonares<sup>88</sup>. Apesar das novas terapias farmacológicas e dos programas de prevenção, a incidência de TPP não tem diminuído nas últimas décadas.

No período do estudo, foram realizados 1785 partos no Serviço de Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, e a prevalência de

TPP foi de 5,8%. Essa incidência é similar à encontrada na literatura, que relata incidência variando entre 5 e 10% do total de gestações<sup>1-3</sup>.

Quanto às variáveis sócio-demográficas, a análise estatística não revelou diferença significativa entre os grupos TPP e controle para os dados referentes à idade, estado civil, etnia, tabagismo, paridade e ocorrência de aborto ou rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT) em gestações anteriores. No entanto, houve maior frequência de episódios prévios de TPP nas gestantes do grupo TPP, dado já bem estabelecido na literatura<sup>8,89</sup>. Somado a isso, a ocorrência de episódios de TPP em gestações subseqüentes está relacionada com a infecção intrauterina persistente ou recorrente<sup>89</sup>.

Embora múltiplos fatores estejam associados ao desenvolvimento de TPP, o papel da infecção da CA tem se tornado cada vez mais importante na sua etiologia, à medida que são realizados trabalhos com excelência metodológica e análise precisa dos resultados. Nesse sentido, a realização de estudos com técnicas de biologia molecular para detecção de microrganismos no LA tem contribuído para consolidar o papel da infecção no desenvolvimento do TPP, especialmente quando se trata de espécies conhecidamente fastidiosas como os micoplasmas<sup>38,39</sup>. Embora as espécies *M. hominis* e *U. urealyticum* sejam freqüentemente detectadas no LA de gestantes<sup>39,90</sup>, seu papel no desenvolvimento do TPP ainda tem sido pouco estudado.

Nesse estudo, a positividade de *M. hominis* no LA de gestantes em TPP foi de 35,0%, sendo sete vezes superior à frequência encontrada em gestantes do grupo controle. Considerando o total de pacientes incluídas neste estudo, houve detecção de *M. hominis* em 20,0% das amostras de LA, frequência superior à encontrada em outros estudos, que empregaram a técnica de PCR para detecção desse microrganismo em LA, obtido através de amniocentese, em segundo trimestre de gestação<sup>14,91</sup> e em amostras de LA de pacientes em TPP<sup>92,93</sup>.

Em relação à infecção por *U. urealyticum*, 10,0% das pacientes em TPP apresentaram presença deste microrganismo no LA. Esta taxa de infecção é superior a maioria dos relatos encontrados da literatura<sup>25,39,94</sup>, embora Witt et al.<sup>95</sup> tenham encontrado positividade de 43,6% em LA de pacientes em TPP e bolsa íntegra.

A pesquisa de microrganismos no LA através da pesquisa do gene bacteriano RNAr 16S revelou positividade de uma amostra de LA pertencente à gestante do grupo TPP, além daquelas positivas para *M. hominis* e/ou *U. urealyticum*. Através do seqüenciamento do produto do gene RNAr 16S amplificado pela PCR, pôde-se identificar esse microrganismos como *Bacterioides* sp. Espécies do gênero *Bacterioides* são associadas com vaginose bacteriana<sup>96</sup> e são freqüentemente isoladas no LA de pacientes em TPP<sup>9,13</sup>.

O seqüenciamento dos demais produtos do gene RNAr 16S amplificados, referentes às amostras positivas para *M. hominis* e/ou *U. urealyticum*, não permitiu a identificação ou confirmação das espécies presentes nas amostras de LA. Esse resultado sugere que a infecção nessas amostras seja polimicrobiana e por limitação metodológica, até o momento, as espécies não foram determinadas. Estudos já demonstraram que a infecção por mais de uma espécie bacteriana é freqüentemente encontrada no LA<sup>95</sup> e em membranas corioamnióticas<sup>97</sup> de pacientes em TPP. Assim, é objetivo da etapa seguinte desse estudo a caracterização das espécies bacterianas presentes nas amostras de líquido amniótico.

Em relação à concentração de citocinas, os níveis de IL-6 no LA de gestantes em TPP estiveram aumentados cerca de três vezes em relação ao grupo controle. Níveis aumentados de IL-6 no LA de gestantes com TPP já foram descritos na literatura<sup>25,55</sup>. Com relação aos ensaios de IL-10, essas concentrações não se mostraram diferentes nos grupos estudados e resultados similares estão descritos na literatura. Segundo Menon et al.<sup>98</sup>, níveis de IL-10

não estão associados com TPP, entretanto os níveis detectados dessa citocina foram superiores aos encontrados no presente estudo. Por outro lado, em estudo realizado com cultura de membranas corioamnióticas e indução de IL-10 por LPS ou antígeno de *U. urealyticum*, Aaltonem et al.<sup>99</sup> descrevem que a resposta à produção dessa citocina foi similar apenas entre o LPS e a maior concentração do antígeno de *U. urealyticum* utilizada. Em decorrência desses resultados, podemos sugerir que a infecção pelos micoplasmas no presente estudo, não atingiu unidades de colônias suficientes para estimular a produção detectável de IL-10 no LA na maioria das amostras infectadas, com o kit utilizado. É importante salientar ainda que a sensibilidade do kit empregado nesse estudo pode não ser adequado para as dosagens de IL-10 no LA de gestantes, já que a literatura é concordante no relato que a IL-10 se encontra elevada no plasma e LA nas gestações de sucesso<sup>75,76</sup> e mais elevados nos casos de infecção da CA, mas esses níveis não foram detectados no presente estudo.

Atualmente, inúmeros trabalhos<sup>23,25,92</sup> têm sido realizados empregando a técnica de PCR para pesquisa de genes bacterianos altamente conservados entre as espécies, como o gene RNAr 16S, para detecção da infecção da CA. Este método, além de permitir a detecção de qualquer espécie bacteriana potencialmente presente nas amostras, possibilita a identificação das espécies através de uma etapa posterior de seqüenciamento desse gene. Portanto, a utilização dessa técnica para detecção de infecção na CA permite de forma confiável avaliar os níveis de citocinas em relação à presença dessa infecção.

Quanto às concentrações de citocinas em relação à infecção da CA, níveis significativamente superiores de IL-6 foram detectados entre as amostras positivas para infecção. Esses dados corroboram com estudos<sup>9,55</sup> em que os níveis de IL-6 no LA de gestantes em TPP estiveram significativamente aumentados na presença de cultura positiva do LA. Recentemente, as novas

metodologias para detecção de infecção na CA, como a pesquisa do gene bacteriano RNAr 16S, têm demonstrado, não apenas maiores frequências de infecção da CA, mas a preservação da correlação entre essa infecção e níveis aumentados de IL-6<sup>24,25</sup>. De fato, a IL-6 é considerada a citocina mais envolvida nos casos de TPP associados a infecção da CA<sup>54</sup> e pode ser considerada excelente preditora de partos prematuros, na presença de infecção da CA.

Considerando a metodologia empregada e os resultados obtidos, podemos concluir que a frequência de infecção na cavidade amniótica de gestantes em TPP é maior que em gestantes fora de trabalho de parto e que existe correlação entre essa infecção e níveis aumentados de IL-6.

Assim, o estudo de correlação entre a presença de *U. urealyticum* e *M. hominis* e de outros microrganismos no LA e níveis de citocinas inflamatórias contribui para a compreensão da fisiopatologia do TPP. Somado a isso, a demonstração do papel importante e central das citocinas na indução do TPP deverá encorajar o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento em gestantes em TPP.

---

## 7. Referências Bibliográficas

1. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008; 371:75-84.
2. Tracy SK, Tracy MB, Dean J, Laws P, Sullivan E. Spontaneous preterm birth of liveborn infants in women at low risk in Australia over 10 years: a population-based study. *BJOG* 2007; 114:731-5.
3. McPheeters ML, Miller WC, Hartmann KE, Savitz DA, Kaufman JS, Garrett JM, et al. The epidemiology of threatened preterm labor: A prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:1325-30.
4. Martin JA, Kochanek KD, Strobino DM, Guyer B, MacDorman MF. Annual summary of vital statistics-2003. *Pediatrics* 2005; 115:619-34.
5. Gestação de Alto Risco / Secretaria de Políticas, Área Técnica da Saúde da Mulher. Brasília: Ministério da Saúde, 2000. 164 p.
6. McCormik MC. The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity. *N Engl J Med* 1985;312:82-90.
7. Hitti J, Nugent R, Boutain D, Gardella C, Hillier SL, Eschenbach DA. Racial disparity in risk of preterm birth associated with lower genital tract infection. *Pediatr and Perinat Epidemiol* 2007; 21:330-7.
8. Lo CC, Hsu JJ, Hsieh CC, Hsieh TT, Hung TH. Risk factors for spontaneous preterm delivery before 34 weeks of gestation among Taiwanese women. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2007; 46:389-94.
9. Varma R, Gupta JK, James DK, Kilby MD. Do screening-preventative interventions in asymptomatic pregnancies reduce the risk of preterm delivery – A critical appraisal of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 127:145-59.
10. Ancel PY. Perspectives in the prevention of premature birth. *Eur J Obstet Gynecol and Reprod Biol* 2004;117S:S2-5.
11. McNamara HM. Problems and challenges in the management of preterm labor. *BJOG* 2003;110:79-85.
12. Hirsch E, Wang H. The molecular pathophysiology of bacterially induced preterm labor: insights from the murine model. *J Soc Gynecol Investig* 2005;12:145-55.

---

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

13. Gibbs RS, Romero R, Hillier SL, Eschenbach DA, Sweet RL. A review of premature birth and subclinical infection. *Am J Obst Gynecol* 1992;166:1515-28.
14. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000;342:1500-7.
15. Romero R, Marzor M. Infection and preterm labor. *Clin Obstet Gynecol* 1988;31:553-84.
16. Hillier SL, Witkin SS, Krohn MA, Watts H, Kiviat NB, Eschenbach DA. The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnion infection. *Obst Gynecol* 1993;81:941-8.
17. Gonçalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002; 8:3-13.
18. Jacobsson B, Mattsby-Baltzer I, Andersch B, Bokstrom H, Holst RM, Wennerholm IB, et al. Microbial invasion and cytokine response in amniotic fluid in a Swedish population of women in preterm labor. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82:120-8.
19. 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.
20. Wenstrom KD, Andrews WW, Bowles NE, Towbin JA, Hauth JC, Goldenberg RL. Intrauterine viral infection at time of second-trimester genetic amniocentesis. *Obstet Gynecol* 1998;92:420-4.
21. 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.
22. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel MD, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med* 2007;25:21-39.
23. Jalava J, Mäntymaa ML, Ekblad U, Toivanen P, Skurnik M, Lassila O, et al. Bacterial 16S rDNA polymerase chain reaction in the detection of intra-amniotic infection. *Br J Obstet Gynecol* 1996;103:664-9.
24. Gardella C, Riley DE, Hitti J, Agnew K, Krieger JN, Eschenbach D. Identification and sequencing of bacterial rDNA in culture-negative amniotic fluid from woman in preterm labor. *Am J Perinatol* 2004; 21:319-23.
25. 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.
26. Romero R, Hanaoka S, Mazor M, Athanassiadis AP, Callahan R, Hsu YC, et al. Meconium-stained amniotic-fluid: a risk factor for microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:859-62.
  27. Galaski RP, Varner MW, Petzold CR, Wilbur SL. Bacterial attachment to the chorioamniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1984;148:915-28.
  28. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 2006;113:17-42.
  29. Gyr TN, Malek A, Mathez Loic F, Altermatt HJ, Bodmer T, Nicolaidis K, et al. Permeation of human chorioamniotic membranes by *Escherichia coli* in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:223-7.
  30. Cauci S, Monte R, Driussi S, Lanzafame P, Quadrifoglio F. Impairment of the mucosal immune system: IgA and IgM cleavage detected in vaginal washings of a subgroup of patients with bacterial vaginosis. *J Infect Dis* 1998;178:1698-706.
  31. McGregor JA, French JI, Jones W, Milligan K, McKinney PJ, Patterson E, et al. Bacterial vaginosis is associated with prematurity and vaginal fluid mucinase and sialidase: results of a controlled trial of topical clindamicyn cream. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:1048-59.
  32. Cauci S, McGregor J, Thorsen P, Grove J, Guaschino S. Combination of vaginal sialidase and prolidase activities for prediction of low birth weight and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192:489-96.
  33. Newton ER, Piper JM, Shain RN, Perdue ST, Pears W. Predictors of the vaginal microflora. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:845-55.
  34. Silva MG, Peraçoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Peraçoli MTS. Cervical *Lactobacillus* and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynecol Obstet* 2003;81:175-82.
  35. 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.
  36. Shimada M, Kotani T, Sameshima H, Nagamine Y, Kodama Y, Ikenoue T, et al. Two patients with premature labor associated with *Mycoplasma hominis* infection. *J Med Microbiol* 1998;47:179-82.
  37. Gerber S, Vial Y, Hohlfeld P, Wikin 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.
38. Yoon BH, Romero R, Kim M, Kim EC, Kim T, Park JS, et al. Clinical implications of detection of *Ureaplasma urealyticum* in the amniotic cavity with the polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1130-7.
39. Yoon BH, Romero R, Lim JH, Shim SS, Hong JS, Shim JY, et al. The clinical significance of detecting *Ureaplasma urealyticum* by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:919-24.
40. Cassel GH, Cole BC. Mycoplasmas as agents of human disease. *N Engl J Med* 1981;304:80-3.
41. Taylor-Robinson D. Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: an update. *Clin Infect Dis* 1996;23:671-84.
42. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-76.
43. Dudley DJ. Immunoendocrinology of preterm labor: The link between corticotrophin-releasing hormone and inflammation. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:251-6.
44. Laham N, Brennecke SP, Rice GE. Interleukin-8 release from human gestational tissue explants: effect of gestation, labor, chorioamnionitis. *Biol Reprod* 1999;61:823-7.
45. Romero R, Brody DT, Oyarzun E, Mazor M, Wu YK, Hobbins JC, et al. Infection and labor. III. Interleukin-1: A signal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:1117-23.
46. Romero R, Wu YK, Brody DT, Oyarzun E, Duff GW, Durum SK. Human decidua: A source of interleukin-1. *Obstet Gynecol* 1989;73:31-4.
47. Axemo P, Brauner A, Petterson M, Erikson L, Rwamushaija E, Bergström A. Amniotic fluid interleukins in Swedish and Mozambican pregnant women. *Gynecol Obstet Invest* 1996;41:113-7.
48. Romero R, Durum SK, Dinarello CA, Oyarzun E, Hobin JC, Mitchell MD. Interleukin-1 stimulates prostaglandin biosynthesis by human amnion. *Prostaglandins* 1989;37:13-22.
49. Sadowsky DW, Novy MS, Witkin SS, Gravett MG. Dexamethasone or interleukin-10 blocks interleukin-1 beta-induced uterine contractions in pregnancy rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:252-63.
50. Romero R, Tartakovsky B. The natural interleukin-1 receptor antagonist

- prevents interleukin-1 induced preterm delivery in mice. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:1041-5.
51. Kauma SW, Johnson DE. The expression and localization of IL-1 $\beta$  mRNA in chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 1994;163:1430-7.
  52. Lockwood CJ, Ghidini A, Wein R, Lapinski R, Casae D, Berkowitz RL. Increased interleukin-6 concentrations in cervical secretions are associated with preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:1097-102.
  53. Saito S, Kasahara T, Kato Y, Ishihara Y, Ichijo M. Elevation of amniotic fluid interleukin 6 (IL-6), IL-8, and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in term and preterm parturition. *Cytokine* 1993;5:81-8.
  54. El-Bastawissi AY, Williams MA, Riley DE, Hitti J, Krieger JN. Amniotic fluid interleukin-6 and preterm delivery: a review. *Obstet Gynecol* 2000;95:1056-64.
  55. Jacobsson B, Mattsby-Baltzer I, Andersch B, Bokstrom H, Holst RM, Nikolaitchouk N, et al. Microbial invasion and cytokine response in amniotic fluid in a Swedish population of women with premature prelabor rupture of membranes. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82:423-31.
  56. Shimoya K, Moriyama A, Matsuzaki N, Ogata I, Koyama M, Azuma C, et al. Human placental cells show enhanced production of interleukin (IL) 8 in response to lipopolysaccharide (LPS), IL-1 and tumor necrosis factor (TNF-alpha), but not to IL-6. *Mol Hum Reprod* 1999;5:885-91.
  57. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T. Cytokine production in chorioamnionitis. *J Reprod Immunol* 2000;47:185-96.
  58. Hsu CD, Meaddough E, Aversa K, Copel JA. The role of amniotic L-secreatin, GRO- $\alpha$ , and interleukin-8 in the pathogenesis of intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:428-32.
  59. Fortunato SJ, Menon R. Distinct molecular events suggest different pathways for preterm labor and premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:1399-405.
  60. 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.
  61. Eades DK, Corneium P, Pekala PH. Characterization of tumor necrosis factor receptor in human placenta. *Placenta* 1988;9:247-51.
  62. Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, Wu YK, Oyarzun E, Hobbins JC, et al. Infection and labor. IV. Cachetin-tumor necrosis factor in the amniotic

- fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:336-41.
63. Inglis SR, Jeremias J, Kuno K, Lescale K, Peeper Q, Ehervenk FA, et al. Detection of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 6 and fetal fibronectin in the lower genital tract during pregnancy: relation to outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:5-10.
64. Romero R, Espinoza J, Chaiworapongsa T, Kalache K. Infection and prematurity and the role of preventive strategies. *Semin Neonatol* 2002;7:259-74.
65. Romero R, Chaiworapongsa T, Kuivaniemi H, Tromp G. Bacterial vaginosis, the inflammatory response and the risk for preterm birth: A role for genetic epidemiology in the prevention of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:1509-19.
66. Terrone DA, Rinehart BK, Granger JP, Barrilleaux OS, Martin JN Jr, Bennett WA. Interleukin-10 administration and bacterial endotoxin-induced preterm birth in a rat model. *Obstet Gynecol* 2001;98:476-80.
67. Rodts-Palenik S, Yi P, Barrilleaux P, Thigpen B, Cai Z, Rhodes P, et al. Maternal interleukin-10 /antibiotic therapy suppresses the fetal brain inflammation response. *Am J Obstet Gynecol* 2002;S55.
68. Chaiworapongsa T, Espinoza J, Kim YM. A novel mediator of septic shock, macrophage migration inhibitory factor, is increased in intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:S73.
69. Beloosesky R, Gayle D, Amidi F, Babu J, Desai M, Ross M. N-acetylcysteine (NAC) protects the fetal brain from inflammatory cytokine responses to lipopolysaccharide (LPS). *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:S10.
70. Silver RM, Hamblin S, LaCoursier Y, Peltier M, Esplin MS, Molenda MR. Prophylactic administration of TNF alpha antibodies reduces the morbidity of LPS-induced preterm birth in a murine model. *J Soc Gynecol Invest* 2005;301A.
71. Dudley DJ, Dangerfield A, Edwin SS. Interleukin-10 (IL-10) prevents preterm birth in a mouse model of infection-mediated preterm labor. *J Soc Gynecol Invest* 1996; 3:67A.
72. Trautman MS, Collmer D, Edwin SS, White W, Mitchell MD, Duley DJ. Expression of interleukin-10 in human gestational tissues. *J Soc Gynecol Invest* 1997;4:247-253.
73. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Ann Rev Immunol* 2001;19:683-765.

74. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, *et al.* Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991;174:915-924.
75. Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Farhat R, Hassan N, Bandar A. Circulating cytokines and CD30 in normal human pregnancy and recurrent spontaneous abortions. *Hum Reprod* 2000;15:2011-2017.
76. Wu MY, Chen HF, Chen SU, Chao KH, Yang YS, Ho HN. Increase in production of IL-10 early after implantation is related to the success of pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2001;46:386-392.
77. Holmes VA, Wallace JMW, Gilmore WS, McFaul P, Alexander HD. Plasma levels of the immunomodulatory cytokine interleukin-10 during normal human pregnancy: a longitudinal study. *Cytokine* 2003;21:265-269.
78. Benian A, Madazh R, Aksu F, Uzun H, Aydin S. Plasma and placental levels of Interleukin-10, Transforming Growth Factor-b1, and Epithelial-Cadherin in Preeclampsia. 2002; 100:327-331.
79. Menon R, Swan KF, Lyden TW, Rote NS, Fortunato S. Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6) in amniochorionic membranes. *Am J Gynecol* 1995;172:493-500.
80. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. The effect of transforming growth factor and interleukin-10 on interleukin-8 release by human amniochorion may regulate histologic chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:794-9.
81. Wesdrom KD, Andrews WW, Haugh JC, Goldenberg RL, DuBard MB, Cliver SP. Elevated second-trimester amniotic fluid interleukin-6 levels predict preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:546-50.
82. Saigal S, Doyle LW. Na overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. *Lancet (in press)*.
83. Shmuel R, Tully JG. *Methods in mycoplasmaology*. New York: Academic Press Inc, 1983.
84. Blanchard A, Hentschel J, Duffy L, Baldus K. Detection of *Ureaplasma urealyticum* by polymerase chain reaction in the urogenital tract of adults, in amniotic fluid, and in the respiratory tract of newborns. *Clin Infect Dis* 1993;17:148-53.
85. Blanchard A, Yáñez A, Dybvig K, Watson HL, Griffiths G, Cassell GH. Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16S rRNA gene of

- Mycoplasma hominis* and detection by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993;31:1358-61.
86. Berquó ES, Souza JMP, Gotlieb SLD. Bioestatística. E.P.U. Editora, 1981.
87. Hagberg B, Hagberg G, Beckung E, Uvebrant P. Changing panorama of cerebral palsy in Sweden. VIII. Prevalence and origin in the birth year period 1991-94. Acta Paediatr 2001;90:271-7.
88. Hitti J, Hillier SL, Agnew KJ, Krohn MA, Reisner D, Eschenbach DA. Vaginal indicators of amniotic fluid infection in preterm labor. Obstet Gynecol 2001;97:211-9.
89. Goldenberg RL, Andrews WW, Faye-Petersen O, Cliver BA, Goepfert AR, Hauth JC. The Alabama Preterm Birth Project: Placental histology in recurrent spontaneous and indicated preterm birth. Am J Obstet Gynecol 2006;195:792-6.
90. 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.
91. Nguyen DP, Gerber S, Hohlfeld P, Sandrine G, Witkin SS. *Mycoplasma hominis* in mid-trimester amniotic fluid: relation to pregnancy outcome. J Perinat Med 2004;32:323-6.
92. Markenson GR, Martin RK, Tillotson-Criss M, Foley KS, Stewart Jr RS, Yancey M. The use of the polymerase chain reaction to detect bacteria in amniotic fluid in pregnancy complicated by preterm labor. Am J Obstet Gynecol 1997;177:1471-7.
93. Holst RM, Mattsby-Baltzer I, Wennerholm UB, Hagberg H, Jacobsson B. Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical fluid in a population of Swedish women in preterm labor: relationship to microbial invasion of the amniotic fluid, intra-amniotic inflammation, and preterm delivery. Acta Obstet Gynecol Scan 2005;84:551-557.
94. Watts H, Krohn MA, Hiller SL, Eschenbach DA. The association of occult amniotic fluid infection with gestational age and neonatal outcome among women in preterm labor. Obst Gynecol 1992;79:351-7.
95. Witt A, Berger A, Gruber CJ, Petricevic L, Apfalter P, Worda C, et al. Increased intrauterine frequency of *Ureaplasma urealyticum* in women with preterm labor and preterm premature rupture of membranes and subsequent cesarean delivery. Am J Obstet Gynecol 2005;193:1663-9.
96. Martius J, Eschenbach DA. The role of bacterial vaginosis as a cause of

- amniotic fluid infection, chorioamnionitis and prematurity – a review. Arch Gynecol Obstet 1990;247:1-13.
97. Hillier SL, Martius J, Krohn M, Kiviat N, Holmes KK, Eschenbach DA. A case-control study of chorioamnionic infection and histologic chorioamnionitis in prematurity. N Engl J Med 1988;319:972-80.
98. Menon R, Camargo C, Thorsen P, Lombardi SJ, Fortunato SJ. Amniotic fluid interleukin-6 increase is an indicator of spontaneous preterm birth in white but no black americans. Am J Obstet Gynecol 2008; 198: 77.e1-e7.
99. Aaltonen R, Heikkinen J, Vahlberg T, Jensen JS, Alanen A. Local inflammatory response in choriodecidua induced by *Ureaplasma urealyticum*. BJOG 2007; 114:1432-5.



### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

A pesquisa intitulada “**Correlação entre presença de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* e níveis de IL-6 e IL-10 no líquido amniótico de gestantes em trabalho de parto prematuro**” tem como objetivo entender os mecanismos responsáveis pelo trabalho de parto prematuro, uma complicação gestacional muito importante que está presente em cerca de 10% das gestações.

Fui informada que estarei constituindo o grupo controle do estudo e que momento da resolução da gestação por cesárea, na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, serão colhidos líquido amniótico, placenta, membranas ovulares e cordão umbilical, de acordo com as técnicas de rotina padronizadas no serviço.

Eu, .....,RG....., após ser devidamente esclarecida, aceito participar do projeto de pesquisa, podendo a qualquer momento esclarecer dúvidas e desistir de participar do mesmo, sem prejuízo do atendimento que necessitar. Também fui informada que meu nome não aparecerá quando os resultados forem divulgados.

**Botucatu, ..... de ..... de 2007.**

**Assinatura do Paciente:** \_\_\_\_\_.

#### **Assinatura do Pesquisador**

*Bruna Ribeiro de Andrade Ramos*

Endereço: Rua Salim Kahil, 501 Apto 21, Botucatu  
Telefone (14) 3882-9055

*Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva*

Endereço do Pesquisador: Rua Izidoro Bertaglia, 746 – Jardim Chácara dos Pinheiros  
Telefone (14) 3815 -2551/ 3815 -2417

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

A pesquisa intitulada “**Correlação entre presença de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* e níveis de IL-6 e IL-10 no líquido amniótico de gestantes em trabalho de parto prematuro e corioamnionite**” tem como objetivo entender os mecanismos responsáveis pelo trabalho de parto prematuro, uma complicação gestacional muito importante que está presente em cerca de 10% das gestações.

Fui informada que, por estar com trabalho de parto prematuro, estarei constituindo o grupo estudo da pesquisa e que momento da resolução da gestação por cesárea, na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, serão colhidos líquido amniótico, placenta, membranas ovulares e cordão umbilical, de acordo com as técnicas de rotina padronizadas no serviço.

Eu, .....RG....., após ser devidamente esclarecida, aceito participar do projeto de pesquisa, podendo a qualquer momento esclarecer dúvidas e desistir de participar do mesmo, sem prejuízo do atendimento que necessitar. Também fui informada que meu nome não aparecerá quando os resultados forem divulgados.

**Botucatu, ..... de ..... de 2007.**

**Assinatura do Paciente:** \_\_\_\_\_.

**Assinatura do Pesquisador**

*Bruna Ribeiro de Andrade Ramos*

Endereço: Rua Salim Kahil, 501 Apto 21, Botucatu  
*Telefone (14) 3882-9055*

*Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva*

Endereço do Pesquisador: Rua Izidoro Bertaglia, 746 – Jardim Chácara dos Pinheiros  
Telefone (14) 3815 -2551/ 3815 -2417



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



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de  
abril de 1997

Botucatu, 28 de fevereiro de 2.007

OF. 005/2007-CEP

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

*Prezada Drª Márcia,*

*Com referência ao Projeto de Pesquisa "Correlação entre a presença de Mycoplasma hominis e Ureaplasma urealyticum e níveis de citocinas inflamatórias no líquido amniótico de gestantes em trabalho de parto prematuro", de autoria de Camila Marconi, orientada por Vossa Senhoria, (aprovado pelo CEP em 05/12/2005), informo que foi autorizada modificação na seguinte conformidade:*

*Inclusão da aluna de graduação como colaboradora ao Projeto: Bruna Ribeiro de Andrade Ramos.*

*Inclusão da dose IL-10 do Projeto que passa a denominar-se Correlação entre a presença de Mycoplasma hominis e Ureaplasma urealyticum e níveis de IL-6 e IL-10 no líquido amniótico de gestantes em trabalho de parto prematuro e corioamnionite"*

*Atenciosamente,*



*Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP*