

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 17/02/2022.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Giovana Fernanda Cosi Bento

**Estudo *in vitro* de infecção polibacteriana das membranas
corioamnióticas: modulação da resposta imune na
interface materno-fetal.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Jossimara Poletini

**Botucatu
2020**

Giovana Fernanda Cosi Bento

Estudo *in vitro* de infecção polibacteriana das
membranas corioamnióticas: modulação da resposta
imune na interface materno-fetal.

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

Orientadora: Profa.Dra. Márcia Guimarães da Silva
Coorientadora: Profa. Dra. Jossimara Poletini

Botucatu
2020

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Bento, Giovana Fernanda Cosi.

Estudo in vitro de infecção polibacteriana das membranas corioamnióticas : modulação da resposta imune na interface materno-fetal / Giovana Fernanda Cosi Bento. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Márcia Guimarães da Silva
Coorientador: Jossimara Polettini
Capes: 40103005

1. Streptococcus. 2. Técnicas in vitro. 3. Micoplasma.
4. *Fusobacterium nucleatum*. 5. Resposta imune.

Palavras-chave: Estudo in vitro; Infecção polimicrobiana;
Membranas corioamnióticas; Micoplasmas genitais;
Streptococcus agalactiae.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Claudia e Enzo, que são meus exemplos de vida e
minha inspiração.

Às minhas avós, Neusa e Maria, por sempre me apoiarem e confiarem em mim.
Aos meus avôs, Altino e Elzo, por quem eu guardo ótimas lembranças, que mesmo na ausência
física estiveram ao meu lado esse tempo todo.

Agradecimentos

A **Deus** e à **Nossa Senhora**,

Por me iluminarem e me ampararem em todos os momentos da caminhada.

Aos **meus pais**, Enzo e Claudia, e à minha **família**,

Por se fazerem presentes mesmo com a distância, por sempre me apoiarem nos momentos difíceis e por serem minha base e porto seguro.

À minha orientadora, **Márcia Guimarães da Silva**,

Pela oportunidade de trilhar um caminho na carreira acadêmica, por sempre estar presente aconselhando e orientando, não só no aspecto profissional, mas pessoal também. Por ter me recebido de volta ao laboratório e por ter me dado todo o suporte em um capítulo difícil da minha vida.

À minha coorientadora, **Jossimara Polettini**,

Por não ter medido esforços, apesar da distância, para ajudar no que fosse preciso.

Ao meu namorado, **Thales Hilário Húngaro**,

Por ser meu companheiro em todo momento, por ter me apoiado, entendido minhas ausências e por ter tornado essa caminhada mais leve. Obrigada por essa parceria de amor.

À **Mariana de Castro Silva**,

Pela parceria e amizade que se fortaleceu ainda mais durante esse período. Sem você eu não teria chego aqui hoje. Obrigada por todos os conselhos, momentos e aprendizados que tivemos juntas. À você serei sempre gratidão.

Aos **meus filhos científicos**, Geovanna, Carolina e Guilherme,

Que felicidade foi ter vocês como iniciações científicas nesse projeto. Ter criado essa família (junto com a Mariana) do time das membranas me ajudou a passar por todos os momentos difíceis. Obrigada pelas noites em família regada a filmes e pipoca. Vocês são luz.

À **Júlia Andrade de Pessoa Morales**,

Que desde o início da faculdade me acompanha nos momentos bons e ruins e que há 8 anos eu tenho o prazer de dividir o teto e um pedacinho da vida. Obrigada por tanto.

Aos **meus amigos**, seja em São Paulo, Botucatu, Ribeirão Preto ou Arkansas, Agradeço a todos que não mediram esforços para estarem ao meu lado e me ajudarem, seja ouvindo minhas angústias ou me ajudando a não desanimar frente às dificuldades. Em especial à Julia Liv, Fernanda, Aline, Laís, Larissa H. e Larissa B., por me mostrarem que amizade vai além de qualquer tempo e distância.

À minha psicóloga, **Raquel Bertani**,
Por ter me ajudado a encontrar o equilíbrio nessa fase e a me manter tranquila e confiante diante de todas os obstáculos e dificuldades.

A todos do **Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal**, Bruna, Laura, Rosana, Juliano, Gabriel, por estarem presentes no meu dia-a-dia durante toda essa trajetória.

Aos meus companheiros de mestrado e amigos, **Jeniffer, Júlia A. e Rafael**,
Pela parceira nessa caminhada que, por muitas vezes difícil, ficou melhor com a companhia de vocês. Obrigada pelas confras e refeições em família.

Aos alunos e Professores do **Departamento de Imunologia e Microbiologia**, em especial à Ivana e à Professora Vera, pelos ensinamentos e suporte sem medir esforços junto a tantos desafios e questionamentos. Obrigada pela disponibilidade e auxílio.

Às enfermeiras do centro obstétrico do **Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu**, pela ajuda, paciência e disponibilidade em meio à correria do dia-a-dia.

Aos funcionários do **Programa de Pós-Graduação em Patologia**, em especial à Vânia, por ser sempre solícita e ter tido paciência frente às tantas dúvidas e pedidos.

Ao **Dr. Marcus Guazelli**,
Por ter aceitado nos ajudar com as coletas das amostras e ser sempre solícito aos nossos pedidos.

Às **gestantes**, por terem aceitado participar desse estudo.

À **CAPES**, pela bolsa concedida nesse período.

Resumo

Introdução: O parto pré-termo (PP) é considerado um dos principais problemas da clínica obstétrica que ocorre em quase 10% de todas as gestações no mundo. A invasão polibacteriana e a inflamação da cavidade amniótica são um cenário comum no PP que resulta em resposta inflamatória do hospedeiro. O objetivo do estudo foi avaliar a produção e cinética de mediadores inflamatórios em modelos *in vitro* de coinfecção da membrana fetal com micoplasmas genitais e outras espécies bacterianas.

Materiais e Métodos: Membranas corioamnióticas coletadas de gestações saudáveis por cesariana foram estimuladas com micoplasmas genitais (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*), *Streptococcus agalactiae* e *Fusobacterium nucleatum*, isoladamente ou em combinação. Os sobrenadantes da cultura foram coletados em cinco momentos diferentes: 0h, 6h, 12h, 18h e 24h. As Interleucinas (IL) -6, IL-8, IL-10 e fator de necrose tumoral α (TNF- α) foram dosadas no meio de cultura por ensaio imunoenzimático (ELISA).

Resultados: A estimulação por micoplasmas genitais, isoladamente ou em combinação, aumentou os níveis de citocinas pró-inflamatórias em relação ao grupo controle, enquanto *F. nucleatum* e *S. agalactiae* não tiveram diferenças significativas. Os níveis mais altos de TNF- α foram detectados nos momentos 6h e 12h, em contraste com a IL-10, cujos pico de produção ocorreu após 18h de estimulação.

Conclusão: *M. hominis* e *U. parvum* sustentam uma resposta pró-inflamatória nas membranas corioamnióticas *in vitro*, isoladamente ou em combinação, mas não responderam da mesma maneira na presença de outras bactérias. Portanto, a infecção polimicrobiana resulta em um padrão pró-inflamatório e em um equilíbrio da resposta anti-inflamatória.

Palavras-chave: Membranas corioamnióticas, estudo *in vitro*, infecção polimicrobiana, micoplasmas genitais, *Streptococcus agalactiae*, *Fusobacterium nucleatum*.

Abstract

Abstract

Problem: Preterm labor (PTL) is considered one of the main obstetric clinic problems that occurs in almost 10% of all pregnancies in the world. Polybacterial invasion and inflammation of the amniotic cavity is a common scenario in PTL that results in host inflammatory response. We aimed to evaluate the production and kinetics of inflammatory mediators in *in vitro* models of fetal membrane coinfection with mycoplasmas and other bacteria species.

Method of Study: Fetal membranes collected from healthy pregnancies by c-section were stimulated with heat-killed genital micoplasmas (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*), *Streptococcus agalactiae* and *Fusobacterium nucleatum*, alone or in combination. Culture supernatants were collected at five different time-points: 0h, 6h, 12h, 18h, and 24h. Interleukin (IL) -6, IL-8, IL-10 and Factor Necrosis Tumoral alpha (TNF- α) were measured in the culture medium by immunoenzymatic assay (ELISA).

Results: Stimulation by genital mycoplasmas, alone or in combination, increased the levels of proinflammatory cytokines in relation to control group, whereas *F. nucleatum* and *S. agalactiae* did not produce significant differences. Highest levels of TNF- α were detected at time-point 6 and 12, in contrast to IL-10, which peaks appeared at time-point 18h.

Conclusions: *M. hominis* and *U. parvum* sustain a proinflammatory response in the fetal membranes *in vitro* alone or in combination, but did not respond in the same way in the presence of other bacteria. Therefore, the polymicrobial infection results in a proinflammatory pattern and a balance of anti-inflammatory response.

Sumário

Capítulo I -----	15
Revisão de Literatura -----	16
1. Aspectos imunológicos da gravidez -----	17
1.1. Estrutura das membranas corioamnióticas -----	19
1.2. Mediadores da resposta imune inata e trabalho de parto pré-termo -----	20
1.3. Invasão microbiana da cavidade amniótica e parto pré-termo -----	22
1.3.1. Micoplasmas genitais e outros patógenos oportunistas -----	24
1.4. Cultura das membranas corioamnióticas <i>in vitro</i> -----	25
2. Referências -----	27
Capítulo II -----	35
Artigo Científico -----	36
1. Abstract -----	38
2. Introduction -----	39
3. Material and methods -----	41
3.1. Patients and fetal membranes collection -----	42
3.2. Stimulation of fetal membrane cultures -----	42
3.3. Immunoassays -----	43
3.4. Statistical analysis -----	44
4. Results -----	44
5. Discussion -----	46
6. Conclusion -----	49
7. References -----	49
Anexos -----	61

Capítulo I

Revisão de Literatura

1. Aspectos imunológicos da gravidez

O estudo e conhecimento dos mecanismos biológicos e imunológicos que ocorrem durante a gravidez contribuem para compreender a sobrevivência do feto e a dinâmica na interface materno-fetal. A combinação de fatores imunológicos fetais e maternos, tais como a mudança do perfil imunológico materno ao longo da gravidez e a imaturidade antigênica do feto, permitem o estabelecimento de uma interface que possibilita o sucesso gestacional.

Uma questão muito discutida é se o sistema imune materno age em favor ou contra a gravidez (1). No entanto, evidências mostram que a interface materno-fetal não se enquadra em um ambiente de supressão imunológica mas em um cenário de modulação (2), de modo que a presença de células imunes no momento da implantação não está associada à uma resposta ao feto, mas à facilitação e proteção da gestação (1). Dessa maneira, a imunologia da gravidez é resultado da combinação de sinais e respostas originados do sistema imune materno e do sistema imune fetal/placentário (3).

Por muitos anos o sucesso da gestação foi creditado ao predomínio de resposta imune mediada por linfócitos T *helper* tipo 2 (Th2) em detrimento da resposta imune de perfil Th1, que era associada a resultados gestacionais adversos (4, 5). Na atualidade, estudos demonstram que é um dinâmico balanço entre citocinas, que se modifica ao longo da gestação, está associado ao desfecho gestacional favorável (6, 7).

O primeiro trimestre gestacional é caracterizado pelo predomínio da resposta imune de perfil Th1, no qual o microambiente inflamatório é importante tanto para permitir o reparo do endométrio dos danos advindos da implantação do feto, quanto para remoção de *debris* celulares. Já o segundo trimestre é caracterizado pela resposta imune de perfil Th2 (4), tendo como objetivo a manutenção da gestação, com consequente aumento de citocinas com atividade anti-inflamatória. No terceiro trimestre e no momento do parto, o predomínio da resposta imune volta a ser de perfil Th1. Esse tipo de resposta ocorre tanto no tecido placentário (8) e líquido amniótico (9), quanto sistematicamente (10). Desse modo, o trabalho de parto é reconhecido como uma síndrome inflamatória (11).

Na espécie humana, uma complexa rede de eventos regulados por mediadores e mecanismos dos sistemas endócrino, imune e nervoso resultam no trabalho de parto a termo. Três processos distintos e interdependentes caracterizam o momento em que a gestação atinge

o desfecho: o remodelamento cervical, o enfraquecimento e rotura das membranas corioamnióticas, e a contratilidade miometrial, que, juntos, viabilizam a expulsão do feto após a 37ª semana de gestação (12, 13). Considerando o papel do sistema imune nesse contexto, as citocinas, polipeptídeos secretados por células da imunidade inata e adaptativa, permeiam e possibilitam esses mecanismos envolvidos no desencadeamento do parto (12).

Apesar do aumento no número de trabalhos ao longo dos anos e das tecnologias existentes, os mecanismos envolvidos no desencadeamento do trabalho de parto a termo ainda não estão completamente elucidados (14). A maior consequência desse incompleto conhecimento é a dificuldade em prevenir o trabalho de parto pré-termo (TPP), considerado um dos principais problemas da clínica obstétrica. O TPP é uma importante intercorrência caracterizada pela presença de um ou mais contrações de ritmo e frequências regulares a cada 10 minutos, acompanhadas de dilatação cervical superior a 2cm e/ou esvaecimento cervical igual ou superior a 50%, entre 22 e 37 semanas de gestação (15).

O parto pré-termo (PP) pode ser classificado em 3 categorias: os que ocorrem espontaneamente, sendo esta categoria mais prevalente (50%); por indicação médica (25%); ou por desfecho da rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT) (25%) (16). Nas últimas décadas, a prevalência do PP tem aumentado em nível mundial, sendo que nos Estados Unidos esteve presente em mais de 12% das gestações (17), sendo essa prevalência similar na África e Ásia (17, 18). Sua etiologia é multifatorial, e apesar de cerca de 40% dos casos serem idiopáticos (19), fatores associados à ocorrência de PP já são conhecidos, como sua ocorrência em gestações anteriores, abortos anteriores, idade materna inferior a 20 anos (20), rotura prematura de membranas (RPM), corioamnionite (19, 20), gestação múltipla, hipertensão gestacional, sangramento vaginal (19), pequeno ganho de peso materno durante a gestação, diabetes gestacional (21) e vaginose bacteriana (22).

O aumento da prevalência nos últimos anos demonstra cada vez mais uma complexidade dos fatores de risco e do papel que desempenham nos desfechos gestacionais adversos como, por exemplo, ao induzir alterações morfológicas, inflamatórias, bioquímicas e oxidativas, culminando em uma rede complexa que dificulta o entendimento dos mecanismos envolvidos. Além da mortalidade neonatal, as comorbidades associadas ao parto pré-termo geralmente levam a diversas consequências na vida do neonato resultando em custos econômicos, físicos e psicológicos (23). As primeiras manifestações de hipertensão e problemas cardiovasculares como consequência do parto pré-termo acontecem logo na infância (24). Além disso, neonatos

que sobrevivem ao PP têm comprometimento das funções pulmonares ao longo de toda a vida, condição que é caracterizada por uma limitação do fluxo aéreo (25).

A rotura das membranas corioamnióticas é um acontecimento normal que ocorre durante o trabalho de parto a termo. Quando precede do início do trabalho de parto é intitulada rotura prematura de membranas (26). Já a rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT) é definida pela rotura espontânea das membranas corioamnióticas que ocorre em idade gestacional inferior a 37 semanas, e é presente em 30% das gestações pré-termo (27). Essa intercorrência tem sido alvo de estudos, uma vez que tem sido associada à morbidade materna e morbimortalidade perinatal (28). A RPM-PT é uma das maiores causas de prematuridade (29), e a frequência e severidade das complicações neonatais variam de acordo com a idade gestacional, sendo aumentadas em casos de infecção perinatal (30, 31).

1.1. Estrutura das membranas corioamnióticas

As membranas corioamnióticas, que constituem a bolsa das águas que abriga o feto, formam uma estrutura de extrema importância para o desenvolvimento fetal, pois elas possuem importantes funções como a de proteção do feto contra traumas, de manutenção do volume do líquido amniótico e de proteção dos vasos do cordão umbilical contra compressão, além de atuarem como barreira contra infecções vindas do trato genital inferior (32).

Apesar da grande quantidade de microrganismos que colonizam o trato genital inferior, a visão que se tem da cavidade amniótica é a de um ambiente estéril (33). Além de revestir a superfície da placenta e constituir o saco amniótico, as membranas corioamnióticas também possuem o papel de manter as condições ideais de esterilidade do líquido amniótico e de ser barreira imunológica. A expressão dos receptores *Toll-like 2* (TLR-2) e *Toll-like 4* (TLR-4) pelo epitélio amniótico, sugere que esse epitélio não funciona apenas como barreira mecânica aos microrganismos, mas que também é fundamental na ativação do sistema imune inato.

Histologicamente, as membranas corioamnióticas são constituídas de diferentes camadas celulares e por componentes da matriz extracelular (MEC). O cório, camada mais externa, a qual mantém proximidade com a cavidade amniótica, é constituído pelas camadas celular e reticular e pela membrana basal (34). Já a camada celular mais interna é o âmnio, de origem ectodérmica, o qual é constituído por monocamada de células epiteliais cuboides ou colunares e camada de tecido conectivo rico em colágeno, intercalada por células mesenquimais (35). Várias microvilosidades são encontradas entre as células do epitélio amniótico, tanto na

porção apical quanto nas bordas laterais, as quais contribuem para a comunicação intercelular e atuam como barreira mecânica contra possível invasão de patógenos. Por fim, a camada decidual é associada externamente ao corio-âmnio e localiza-se internamente à parede uterina, desempenhando papel hormonal e imunológico (36).

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

O sistema imune e seus processos inflamatórios estão associados à vários mecanismos associados à reprodução, como ovulação, implantação e desencadeamento do parto (37). Estudos mostram que mediadores da resposta inflamatória são sintetizados por células das membranas corioamnióticas mesmo na ausência de infecção neste microambiente (38). Desse modo, é possível confirmar que até mesmo o parto a termo é caracterizado por um perfil inflamatório.

Reconhecendo o parto como um processo inflamatório, entende-se que estímulos patogênicos podem estimular mais ainda a imunidade nesse ambiente. Em casos de infecção, ocorre recrutamento neutrofílico para as membranas corioamnióticas (39), resultando em amplificação da resposta inflamatória e corioamnionite histológica, esta última sendo considerada um indicador de invasão microbiana da cavidade amniótica (40).

O reconhecimento dos patógenos pelo sistema imune inato envolve moléculas de reconhecimento de padrões, conhecidos como TLRs, que pertencem à família dos receptores de reconhecimento de padrões (RRP) (41), sendo que cada tipo já descrito na literatura é específico para diferentes padrões de reconhecimento de patógenos (PAMPS) (42). A primeira linha de defesa contra infecções durante a gestação é constituída principalmente pelo TLR-2 e TLR-4 (43), visto que eles são expressos tanto no epitélio amniótico, quanto nas células coriônicas e deciduais (44, 45), porém já se sabe que ao longo da gestação, todos os tipos de TLRs são expressos na interface materno-fetal de uma maneira espaço-temporal específica (46). O TLR-2 reconhece PAMPS como lipoproteínas associadas à micobactérias, peptidoglicano e bactérias Gram-positivas (47, 48); já o TLR-4 medeia a resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) (49). Segundo Kim et al. (45), a expressão proteica desses dois receptores é significativamente maior no epitélio amniótico na presença de corioamnionite histológica, tanto em partos pré-termo quanto a termo. Isso sugere que a expressão aumentada dos TLRs nos tecidos

gestacionais no momento do trabalho de parto pode aumentar a proteção do hospedeiro contra invasão polimicrobiana da cavidade amniótica.

Em casos de infecção da cavidade amniótica no segundo trimestre de gestação, as próprias bactérias e seus produtos estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos gestacionais (12), perturbando o perfil anti-inflamatório da gestação nesse momento (5). A produção de Interleucina (IL)-6, IL-8, IL-10 e Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), em casos de estimulação bacteriana, revelou que as bactérias estimulam a expressão de RNAm de citocinas pró e anti-inflamatórias (50) e potencializando a indução do parto.

Além disso, a IL-6 já foi descrita como o principal biomarcador de inflamação e como preditor do parto pré-termo (37), sendo que níveis elevados no líquido amniótico de gestantes no segundo trimestre associados com maior risco (51). A identificação de IL-8 no líquido amniótico foi associada tanto à presença de RPM-PT quanto de TPP (52).

Ainda nessa linha, níveis elevados de TNF- α foram descritos no líquido amniótico na presença de PP e de infecção intra-amniótica (53). Em um estudo com diferentes modelos de estimulação, os resultados com *Escherichia coli in vitro* demonstraram que a produção de TNF- α estava significativamente aumentada no modelo em que ambos os lados da membrana (cório e âmnio) foram estimulados com a bactéria (54). Esse resultado sugere que, pelas propriedades imunotóxicas dessa citocina, sua produção e secreção ocorra em casos de infecção mais complicados, como foi mimetizado no estudo pela estimulação de ambos os lados da membrana. Nos tecidos gestacionais foram observados que a presença de IL-6 (55), IL-10 (56) e TNF- α (53) induz a produção de prostaglandina E2 (PGE2), que está intimamente relacionada com o início e a progressão do trabalho de parto.

Já no cenário anti-inflamatório, a IL-10 já teve sua função associada com a regulação das complicações gestacionais que tem como causa o processo inflamatório(57). Em gestações acometidas por TPP e infecção intra-amniótica foi observada concentrações aumentadas de IL-10 no líquido amniótico, quando comparado à pacientes sem infecção (58).

Ainda em relação aos mediadores da resposta imune inata, os antimicrobianos naturais secretados por células epiteliais desempenham funções importantes na mucosa do trato genital inferior, incluindo a manutenção do micro-ambiente interno, controle da inflamação e prevenção da invasão de microrganismos nas células do hospedeiro (59). Estudos mostraram

que alguns deles, como a *human beta defensin* (HBD) 2, têm uma estimulação aumentada por citocinas inflamatórias em tecidos gestacionais (60). Estudo demonstrou aumento de HBD-2 no líquido amniótico na presença de infecção e/ou inflamação na cavidade amniótica em pacientes em TPP e RPM-PT, demonstrando que essa defensina é constituinte do líquido amniótico e participa da resposta antimicrobiana (61).

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

Embora a etiologia do parto pré-termo seja multifatorial, vários microrganismos têm sido associados à sua patogênese, especialmente através da ascensão do trato genital inferior (37), com subsequente instalação de corioamnionite. A corioamnionite histológica é definida como inflamação das membranas corioamnióticas, sendo que pode estar presente em mais de 20% das gestações de termo e em mais de 50% dos partos pré-termo, e a maioria dos casos ocorrem na ausência de sinais clínicos e de sintomas de infecção (62-64). Marconi et al.(65), em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, demonstraram infecção da cavidade amniótica em gestantes que apresentaram essa intercorrência gestacional. O estudo demonstrou que tal infecção é de natureza polibacteriana e que, na maioria dos casos, há combinação de microrganismos aeróbios e anaeróbios.

Kim et al. (66) propuseram modelo de invasão microbiana intra-amniótica, no qual o estágio inicial ocorre por uma invasão intra-amniótica através de uma discreta região das membranas corioamnióticas, após ascensão do microrganismo pelo trato genital inferior feminino, seguido por uma proliferação bacteriana no líquido amniótico e, posteriormente, a extensão e espraiamento dessa infecção por toda a região das membranas. Nesse sentido, os patógenos mais frequentemente isolados no líquido amniótico de pacientes com infecção intra-amniótica são comumente encontrados na microbiota vaginal, incluindo *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Leptotrichia amnionii*, *Bacterioides fragilis*, *Prevotella bivia*, *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* (67, 68). Quando existe a predominância dessas espécies bacterianas em relação aos lactobacilos, caracteriza-se a alteração da microbiota vaginal.

Esse tipo de alteração está associada ao risco de parto pré-termo (22), já que espécies bacterianas em elevada concentração podem ascender à cavidade amniótica e suscitar resposta inflamatória nos tecidos gestacionais com subsequente deflagração do trabalho de parto, uma vez que ocorre o desbalanço do perfil inflamatório previamente estabelecido. Evidências desse

processo são as observações de que citocinas inflamatórias estão aumentadas no líquido amniótico de gestantes com infecção intra-amniótica, especialmente aquelas causadas por *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* (69, 70).

Considerando o cenário polibacteriano, as principais espécies bacterianas detectadas no líquido amniótico tanto no TPP como na RPM-PT são *U. urealyticum* e *M. hominis*. Em outros tipos de amostras, a prevalência de *U. urealyticum* e *M. hominis* durante a gravidez tem uma grande variabilidade que depende primariamente das características demográficas como localização geográfica, nível socioeconômico e número de parceiros sexuais, e secundariamente ao tipo de estudo e método diagnóstico (71). Nesse sentido, revisão feita por Capoccia et al. (71) mostrou que a prevalência de *U. urealyticum* e *M. hominis* pode variar no líquido amniótico de 3.3% a 63.0% e 1.4% a 35.5%, e no conteúdo vaginal de 3.7% a 89.7% e 2.5% a 55.0%, respectivamente.

Estudos têm associado à infecção por *U. urealyticum* tanto no TPP quanto na RPM-PT em conteúdos vaginais (72, 73), de líquido amniótico (74, 75) e secreção cervical (76), enquanto o *M. hominis* foi associado ao TPP em conteúdos vaginais (77) e de líquido amniótico (78) e com RPM-PT somente em conteúdos vaginais (73). Ainda que *U. urealyticum* seja mais prevalente na RPM-PT comparado ao *M. hominis* (73, 78), a coocorrência dessas bactérias no conteúdo vaginal suscita resultado adverso gestacional mais severo comparado à infecção simples por *U. urealyticum* (79).

Nos estudos relacionados à pesquisa e associação de *M. hominis* e desfechos gestacionais adversos, Harada et al. (77) demonstraram associação significativa de TPP e *M. hominis* em amostras de conteúdo vaginal e Lamont et al. (80) confirmaram essa associação quando rastrearam a colonização/infecção em líquido amniótico pelo método de biologia molecular.

Uma vez que a infecção polibacteriana envolve interações complexas entre as espécies, a presença na cavidade amniótica de diversas combinações de espécies bacterianas, sua carga e patogenicidade podem modificar o efeito causado pelos micoplasmas genitais. Além disso, essas interações podem resultar na modulação da expressão gênica dos fatores de virulência de algumas cepas, aumentando sua patogenicidade (81).

1.3.1. Micoplasmas genitais e outros patógenos oportunistas

O termo Mollicutes se tornou uma denominação genérica para todos os microrganismos da classe (82), que são caracterizados pela ausência da parede celular de peptidoglicano. Por isso, podem assumir formas cocóides ou filamentosas e são pouco coradas pela tradicional coloração do Gram, dificultando sua identificação direta em amostras clínicas.

Devido a sua capacidade de adesão, *Ureaplasma* e *Mycoplasma* são os dois gêneros da classe Mycoplasmataceae que podem colonizar o trato genitourinário humano. A presença de proteínas da superfície na membrana celular possibilitam sua ligação às células do hospedeiro. Oh et al. (83) descreveram que gestações complicadas por RPM-PT com infecção intra-amniótica por micoplasmas genitais, houve indução de resposta inflamatória mais intensa no líquido amniótico quando comparado à infecções por outras espécies bacterianas. A espécie *M. hominis* tem como característica a formação de colônias em forma de "ovo frito" (84) e utiliza a arginina como substrato no seu metabolismo (85). Em 1924, pela característica única entre os micoplasmas de utilizar como substrato a ureia e não a arginina ou glicose, foi designada a espécie *U. urealyticum* (86).

Os serotipos existentes de *Ureaplasma* spp. foram agrupados em duas espécies distintas, *U. parvum* e *U. urealyticum* (87), e sua patogenicidade está associada a capacidade de adesão à superfícies de mucosa. O antígeno de múltiplas bandas (AMB) é a principal lipoproteína de superfície e considerado o principal fator de virulência dessa espécie (88), sendo reconhecida pelo sistema imune através de TLR-1, TLR-2 e TLR-6 (89). Além disso, estudos já mostraram a capacidade de *Ureaplasma* spp. de formar biofilmes (90) e produzir protease IgA que funciona como mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro, resultando na colonização da espécie (91).

Na era da determinação do microbioma placentário, Aagaard et al. (92) observaram que esse órgão possui um nicho composto por uma microbiota comensal não patogênica composta por espécies dos filos Firmicutes, Tenericutes e Fusobacteria. Em discordância com esses resultados, estudo recente mostrou ausência de bactérias em amostras de placentas coletadas antes do início do trabalho de parto, exceto pelo fato da presença de *S. agalactiae* em 5% das amostras (93).

As espécies *M. hominis* e *U. urealyticum* são constituintes do *core* patológico da vaginose bacteriana, principal alteração da microbiota vaginal, na qual ocorre a substituição do predomínio de *Lactobacillus* spp. por outras espécies, predominantemente anaeróbias (94). De forma interessante, Rosenstein et al. (94) demonstraram uma correlação positiva entre o aumento do escore da vaginose bacteriana e o número de amostras em que se detectava a presença de *M. hominis*.

Além das bactérias encontradas na microbiota vaginal, no cenário da infecção no parto pré-termo, *Streptococcus agalactiae* (GBS) tem papel importante. Aproximadamente 6,8% dos recém-nascidos com infecção precoce por GBS evoluem para o óbito (95). Estudos vêm mostrando associação significativa da prevalência de colonização por GBS com parto pré-termo (96), assim como com sepse neonatal (97). Além disso, GBS foi a espécie bacteriana mais comumente isolada em tecidos maternos e fetais em mulheres com aborto espontâneo (98).

Adicionalmente, *Fusobacterium nucleatum*, que é um patógeno oral, está sendo frequentemente identificado em culturas de placenta e de membranas corioamnióticas em gestantes com TPP e RPM-PT assim como em óbito neonatal (99, 100) e sua abundância relativa na placenta suporta a ideia de propagação hematogênica da cavidade oral para a placenta (92, 101), o que é reforçada pela sua presença no cordão umbilical de gestantes normais (102).

1.4. Cultura das membranas corioamnióticas *in vitro*

Os trabalhos *in vitro* que mimetizam a infecção intra-amniótica são importantes para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na interface materno-fetal que levam ao desfecho gestacional adverso, uma vez que revelam que os tecidos gestacionais, respondem ao estímulo bacteriano com o aumento da produção de citocinas (54).

Fortunato et al. (103) desenvolveram uma técnica de cultura de membranas corioamnióticas que mantém a integridade do tecido, assim como suas funções autócrinas e parácrinas. Desde então foram desenvolvidos diversos trabalhos utilizando essa técnica, visando o melhor entendimento da relação materno-fetal, assim como o funcionamento e resposta dos diferentes sistemas do organismo (104, 105). Menon et al. (40) demonstraram que a produção de citocinas inflamatórias e expressão de receptores Toll-like, em membranas corioamnióticas *in vitro*, dependem da espécie bacteriana envolvida na infecção. Utilizando-se

uma outra técnica, mas com o mesmo princípio e objetivos, Zaga-Clavellina et al. (54) identificaram aumento significativo na produção de citocinas pró- e anti-inflamatória IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IL-10 nas membranas fetais *in vitro* na presença de *Escherichia coli*.

Nesse mesmo sentido, trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (106) foi observado que a produção de citocinas e o perfil inflamatório de membranas corioamnióticas *in vitro* varia de acordo com a carga bacteriana e as interações entre espécies. Além disso, observou-se que a estimulação das membranas corioamnióticas *in vitro* com micoplasmas genitais isolados ou em combinação levaram a resposta inflamatória moderada que pode ser regulada por marcadores anti-inflamatórios como IL-10, IL-13 e receptor solúvel TNFR-2. Outro estudo identificou que a estimulação das membranas corioamnióticas *in vitro* com *Gardnerella vaginalis* aumentou a produção tanto de IL-1 β e IL-6 como de peptídeos antimicrobianos, HBD-1, HBD-2 e HBD-3 (107).

Nos últimos anos, com a evolução das tecnologias e métodos de pesquisa, uma nova técnica de cultura começou a ser utilizada. Foi desenvolvido o método *organ-on-chip* para membranas corioamnióticas, onde é possível observar as interações e transições celulares em um sistema *transwell* (108, 109). Desse modo, diferentemente do método de cultura utilizado antes, é possível observar a comunicação entre as diversas camadas das membranas corioamnióticas frente a inúmeros estímulos e eventos, sendo um grande avanço para os estudos na área. Considerando os achados, se torna fundamental o papel dos estudos *in vitro* com membranas corioamnióticas para elucidar os mecanismos e a patogênese de eventos que contribuem para o desfecho gestacional adverso.

2. Referências

1. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1221:80-7.
2. Sarafana S, Coelho R, Neves A, Trindade J. Aspectos da imunologia da gravidez. *Acta Med Port* 2007;355-8.
3. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:425-33.
4. Raghupathy R. Maternal anti-placental cell-mediated reactivity and spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 1997;37:478-84.
5. 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.
6. Chaouat G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol* 2007;29:95-113.
7. Denney JM, Nelson EL, Wadhwa PD, et al. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. *Cytokine* 2011;53:170-7.
8. 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.
9. von Dadelszen P, Watson RW, Noorwali F, et al. Maternal neutrophil apoptosis in normal pregnancy, preeclampsia, and normotensive intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:408-14.
10. 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.
11. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG* 2006;113 Suppl 3:17-42.
12. Peltier MR. Immunology of term and preterm labor. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:122.
13. Orsi NM. Cytokine networks in the establishment and maintenance of pregnancy. *Hum Fertil (Camb)* 2008;11:222-30.
14. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci* 2009;16:206-15.
15. Jacinto S, Pamplona K, Soares M. Manual Técnico de Gestação de Alto Risco. *MS, editor* 2012. p. 302.

16. Menon R, Nicolau NN, Bredson S, Polettini J. Fetal Membranes: Potential Source of Preterm Birth Biomarkers. *General Methods in Biomarker Research and their Applications. Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications*. Springer, Dordrecht 2015.
17. Crump C, Sundquist K, Sundquist J, Winkleby MA. Gestational age at birth and mortality in young adulthood. *JAMA* 2011;306:1233-40.
18. Beck S, Wojdyla D, Say L, et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ* 2010;88:31-8.
19. Slattery MM, Geary M, Morrison JJ. Obstetric antecedents for preterm delivery. *J Perinat Med* 2008;3:306-9.
20. 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.
21. Jensen DM, Damm P, Moelsted-Pedersen L, et al. Outcomes in type 1 diabetic pregnancies: a nationwide, population-based study. *Diabetes Care* 2004;27:2819-23.
22. Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, et al. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG* 2009;116:1315-24.
23. Behrman RE, Butler AS, Institute of Medicine (US) Committee on Understanding Premature Birth and Assuring Healthy Outcomes. Preterm birth: Causes, Consequences, and Prevention. *The National Academic press*. 2007; 313-429.
24. Luu TM, Rehman Mian MO, Nuyt AM. Long-Term Impact of Preterm Birth: Neurodevelopmental and Physical Health Outcomes. *Clin Perinatol*. 2017;44:305-14.
25. Baraldi E, Carraro S, Filippone M. Bronchopulmonary dysplasia: definitions and long-term respiratory outcome. *Early Hum Dev* 2009;85(10 Suppl):S1-3.
26. Lee T, Silver H. Etiology and epidemiology of preterm premature rupture of the membranes. *Clin Perinatol* 2001;28:721-34.
27. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 2003;101:178-93.
28. Bulletins-Obstetrics ACoP. ACOG Practice Bulletin No. 80: premature rupture of membranes. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. *Obstet Gynecol* 2007;109:1007-19.
29. Corchia C, Ferrante P, Da Frè M, et al. Cause-specific mortality of very preterm infants and antenatal events. *J Pediatr* 2013;162:1125-32, 32.e1-4.

30. Storness-Bliss C, Metcalfe A, Simrose R, Wilson RD, Cooper SL. Correlation of residual amniotic fluid and perinatal outcomes in periviable preterm premature rupture of membranes. *J Obstet Gynaecol Can* 2012;34:154-8.
31. Goldenberg RL. The management of preterm labor. *Obstet Gynecol* 2002;100:1020-37.
32. Parry S, Strauss JF, 3rd. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998;338:663-70.
33. Romero R, Gotsch F, Pineles B, Kusanovic JP. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. *Nutr Rev* 2007;65:S194-202.
34. French JI, McGregor JA. The pathobiology of premature rupture of membranes. *Semin Perinatol* 1996;20:344-68.
35. Kendal-Wright CE. Stretching, mechanotransduction, and proinflammatory cytokines in the fetal membranes. *Reprod Sci* 2007;14:35-41.
36. Calvin SE, Oyen ML. Microstructure and mechanics of the chorioamnion membrane with an emphasis on fracture properties. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1101:166-85.
37. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11:317-26.
38. Haddad R, Gould BR, Romero R, et al. Uterine transcriptomes of bacteria-induced and ovariectomy-induced preterm labor in mice are characterized by differential expression of arachidonate metabolism genes. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:822-8.
39. Andrews WW, Goldenberg RL, Faye-Petersen O, Cliver S, Goepfert AR, Hauth JC. The Alabama Preterm Birth study: polymorphonuclear and mononuclear cell placental infiltrations, other markers of inflammation, and outcomes in 23- to 32-week preterm newborn infants. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:803-8.
40. Menon R, Peltier MR, Eckardt J, Fortunato SJ. Diversity in cytokine response to bacteria associated with preterm birth by fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2009;201:306.e1-6.
41. Olmos-Ortiz A, Flores-Espinosa P, Mancilla-Herrera I, Vega-Sánchez R, Díaz L, Zaga-Clavellina V. Innate Immune Cells and Toll-like Receptor-Dependent Responses at the Maternal-Fetal Interface. *Int J Mol Sci* 2019;20(.
42. Bauer S, Müller T, Hamm S. Pattern recognition by Toll-like receptors. *Adv Exp Med Biol* 2009;653:15-34.
43. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
44. Leroy MJ, Dallot E, Czerkiewicz I, Schmitz T, Breuiller-Fouché M. Inflammation of choriodecidua induces tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of human myometrial cells. *Biol Reprod* 2007;76:769-76.

45. Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, et al. Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:1346-55.
46. 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.
47. Patni S, Flynn P, Wynen 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.
48. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
49. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990;249:1431-3.
50. Griesinger G, Saleh L, Bauer S, Husslein P, Knofler M. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines of human placental trophoblasts in response to pathogenic bacteria. *J Soc Gynecol Investig* 2001;8:334-40.
51. Goepfert AR, Goldenberg RL, Andrews WW, et al. The Preterm Prediction Study: association between cervical interleukin 6 concentration and spontaneous preterm birth. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:483-8.
52. Jia X. Value of amniotic fluid IL-8 and Annexin A2 in prediction of preterm delivery in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *J Reprod Med* 2014;59:154-60.
53. Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, et al. Infection and labor. IV. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:336-41.
54. Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera H, et al. In vitro secretion profiles of interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF alpha after selective infection with *Escherichia coli* in human fetal membranes. *Reprod Biol Endocrinol* 2007;5:46.
55. 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.
56. Mitchell MD, Simpson KL, Keelan JA. Paradoxical proinflammatory actions of interleukin-10 in human amnion: potential roles in term and preterm labour. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4149-52.
57. Hanna N, Hanna I, Hleb M, 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.
58. Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, et al. The anti-inflammatory limb of the immune response in preterm labor, intra-amniotic infection/inflammation, and spontaneous parturition at term: a role for interleukin-10. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008;21:529-47.

59. Yarbrough VL, Winkle S, Herbst-Kralovetz MM. Antimicrobial peptides in the female reproductive tract: a critical component of the mucosal immune barrier with physiological and clinical implications. *Hum Reprod Update* 2015;21:353-77.
60. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta* 2007;28:161-9.
61. Soto E, Espinoza J, Nien JK, et al. Human beta-defensin-2: a natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007;20:15-22.
62. Polettini J, Peraçoli JC, Candeias JM, Araújo Júnior JP, Silva MG. Inflammatory cytokine mRNA detection by real time PCR in chorioamniotic membranes from pregnant women with preterm premature rupture of membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;144:27-31.
63. Edwards RK. Chorioamnionitis and labor. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2005;32:287-96.
64. Silva MG, Peraçoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Peraçoli MT. Cervical Lactobacillus and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynaecol Obstet* 2003;81:175-82.
65. Marconi C, de Andrade Ramos BR, Peraçoli JC, Donders GG, da 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* 2011;65:549-56.
66. Kim MJ, Romero R, Gervasi MT, et al. Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection. *Lab Invest* 2009;89:924-36.
67. Sherman DJ, Tovbin J, Lazarovich T, et al. Chorioamnionitis caused by gram-negative bacteria as an etiologic factor in preterm birth. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:417-23.
68. DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. *Semin Fetal Neonatal Med* 2012;17:2-11.
69. Perni SC, Vardhana S, Korneeva I, et al. Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in midtrimester amniotic fluid: association with amniotic fluid cytokine levels and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:1382-6.
70. Lee SM, Park KH, Jung EY, Kook SY, Park H, Jeon SJ. Inflammatory proteins in maternal plasma, cervicovaginal and amniotic fluids as predictors of intra-amniotic infection in preterm premature rupture of membranes. *PLoS One* 2018;13:e0200311.
71. Capoccia R, Greub G, Baud D. Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis and adverse pregnancy outcomes. *Curr Opin Infect Dis* 2013;26:231-40.

72. Abele-Horn M, Scholz M, Wolff C, Kolben M. High-density vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization as a risk factor for chorioamnionitis and preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000;79(9):973-8.
73. Kacerovský M, Drahosová M, Hornychová H, et al. [Amniotic fluid interleukin 6 levels in preterm premature rupture of membranes]. *Ceska Gynekol* 2009;74:403-10.
74. 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.
75. Witt A, Berger A, Gruber CJ, et al. Increased intrauterine frequency of *Ureaplasma urealyticum* in women with preterm labor and preterm premature rupture of the membranes and subsequent cesarean delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:1663-9.
76. Aaltone R, Jalava J, Laurikainen E, Kärkkäinen U, Alanen A. Cervical *ureaplasma urealyticum* colonization: comparison of PCR and culture for its detection and association with preterm birth. *Scand J Infect Dis* 2002;34:35-40.
77. Harada K, Tanaka H, Komori S, et al. Vaginal infection with *Ureaplasma urealyticum* accounts for preterm delivery via induction of inflammatory responses. *Microbiol Immunol* 2008;52:297-304.
78. 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.
79. Larsen B, Hwang J. *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2010;2010.
80. Lamont RF, Taylor-Robinson D, Wigglesworth JS, Furr PM, Evans RT, Elder MG. The role of mycoplasmas, ureaplasmas and chlamydiae in the genital tract of women presenting in spontaneous early preterm labour. *J Med Microbiol* 1987;24:253-7.
81. Sibley CD, Duan K, Fischer C, et al. Discerning the complexity of community interactions using a *Drosophila* model of polymicrobial infections. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000184.
82. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1094-156.
83. Oh KJ, Lee KA, Sohn YK, 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.
84. Taylor-Robinson D, Furr PM. Recovery and identification of human genital tract mycoplasmas. *Isr J Med Sci* 1981;17:648-53.
85. Edward D. A suggested classification and nomenclature for organisms of the pleuropneumonia. *Int J Syst Evol Microbiol* 1955;85-93.

86. Shepard MC, Lunceford CD. Occurrence of urease in T strains of Mycoplasma. *J Bacteriol* 1967;93:1513-20.
87. Kong F, Ma Z, James G, Gordon S, Gilbert GL. Molecular genotyping of human Ureaplasma species based on multiple-banded antigen (MBA) gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1921-9.
88. Zheng X, Teng LJ, Watson HL, Glass JI, Blanchard A, Cassell GH. Small repeating units within the Ureaplasma urealyticum MB antigen gene encode serovar specificity and are associated with antigen size variation. *Infect Immun* 1995;63:891-8.
89. Shimizu T, Kida Y, Kuwano K. Ureaplasma parvum lipoproteins, including MB antigen, activate NF- κ B through TLR1, TLR2 and TLR6. *Microbiology* 2008;154:1318-25.
90. Pandelidis K, McCarthy A, Chesko KL, Viscardi RM. Role of biofilm formation in Ureaplasma antibiotic susceptibility and development of bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates. *Pediatr Infect Dis* 2013;32:394-8.
91. Tantengco OAG, Yanagihara I. Current understanding and treatment of intra-amniotic infection with Ureaplasma spp. *J Obstet Gynaecol Res* 2019;45:1796-808.
92. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 2014;6:237ra65.
93. de Goffau MC, Lager S, Sovio U, et al. Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens. *Nature* 2019;572:329-34.
94. Rosenstein IJ, Morgan DJ, Sheehan M, Lamont RF, Taylor-Robinson D. Bacterial vaginosis in pregnancy: distribution of bacterial species in different gram-stain categories of the vaginal flora. *J Med Microbiol* 1996;45:120-6.
95. Phares CR, Lynfield R, Farley MM, et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA* 2008;299:2056-65.
96. Valkenburg-vandenBerg AW, Sprij AJ, Dekker FW, Dörr PJ, Kanhai HH. Association between colonization with Group B Streptococcus and preterm delivery: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009;88:958-67.
97. Park HR, Harris SM, Boldenow E, et al. Group B streptococcus activates transcriptomic pathways related to premature birth in human extraplacental membranes in vitro. *Biol Reprod* 2018;98:396-407.
98. Hooper K, McDonald TA. The PBDEs: an emerging environmental challenge and another reason for breast-milk monitoring programs. *Environ Health Perspect* 2000;108:387-92.
99. Cahill RJ, Tan S, Dougan G, et al. Universal DNA primers amplify bacterial DNA from human fetal membranes and link Fusobacterium nucleatum with prolonged preterm membrane rupture. *Mol Hum Reprod* 2005;11:761-6.

100. Han YW, Fardini Y, Chen C, et al. Term stillbirth caused by oral *Fusobacterium nucleatum*. *Obstet Gynecol* 2010;115:442-5.
101. 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.
102. Jiménez E, Fernández L, Marín ML, et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 2005;51:270-4.
103. Fortunato SJ, Menon R, Swan KF, Lyden TW. Organ culture of amniochorionic membrane in vitro. *Am J Reprod Immunol* 1994;32:184-7.
104. Menon R, Swan KF, Lyden TW, Rote NS, Fortunato SJ. Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1 beta and interleukin-6) in amniochorionic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:493-500.
105. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Presence of four tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3 and -4) in human fetal membranes. *Am J Reprod Immunol* 1998;40:395-400.
106. Noda-Nicolau NM, Poletini J, Peltier MR, da Silva MG, Menon R. Combinations and loads of bacteria affect the cytokine production by fetal membranes: An in vitro study. *Am J Reprod Immunol* 2016;76:504-11.
107. Zaga-Clavellina V, Martha RV, Flores-Espinosa P. In vitro secretion profile of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6, and of human beta-defensins (HBD)-1, HBD-2, and HBD-3 from human chorioamniotic membranes after selective stimulation with *Gardnerella vaginalis*. *Am J Reprod Immunol* 2012;67:34-43.
108. Richardson L, Jeong S, Kim S, Han A, Menon R. Amnion membrane organ-on-chip: an innovative approach to study cellular interactions. *FASEB J* 2019;33:8945-60.
109. Richardson L, Gnecco J, Ding T, et al. Fetal Membrane Organ-On-Chip: An Innovative Approach to Study Cellular Interactions. *Reprod Sci* 2019:1933719119828084.