UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA VIA INFLAMATÓRIA DO NF-κB EM CÉLULAS AMNIÓTICAS EPITELIAIS NA PRESENÇA DE ESTÍMULO POLIMICROBIANO

Avaliação *in vitro* da via inflamatória do nf-κb em células amnióticas epiteliais na presença de estímulo polimicrobiano

ANA CAROLINA SPROCATTI DOS SANTOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

BOTUCATU

2023

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Santos, Ana Carolina Sprocatti dos.
Avaliação *in vitro* da via inflamatória do NF-kB em células amnióticas epiteliais na presença de estímulo polimicrobiano / Ana Carolina Sprocatti dos Santos. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Márcia Guimarães da Silva

Coorientador: Mariana Castro Silva

Capes: 40103005

1. Células epiteliais. 2. Técnicas de cultura de Células. 3. NF-kappa B. 4. Trabalho de parto prematuro.

Palavras-chave: Células amnióticas epiteliais; Cultura *in vitro*; NF-kB; Parto pré termo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Elaine Cristina Sprocatti e Isaias Teixeira dos Santos, por todo o apoio, carinho, paciência e confiança. Sem eles, nada disso seria possível.

Agradeço a toda minha família por todo o suporte fornecido em especial minha avó, Maria Judite Sprocatti, que sempre me acolheu com muito carinho e meu namorado Erick Guilherme Stoppa que me auxiliou muito na minha jornada acadêmica e por ser meu companheiro nos melhores e piores momentos

A todos os professores que me deparei ao longo do curso, em especial, a minha orientadora, Márcia Guimarães da Silva e coorientadora, Mariana Castro Silva por todos os conselhos e ensinamentos.

Agradeço aos doutorandos, Giovana Fernanda Cosi Bento e Rafael Belleti, pelo apoio e suporte durante todo o desenvolvimento desse trabalho, por conceder conhecimento, por se disporem a contribuir com a pesquisa e pela amizade construída ao longo desse tempo

Agradeço aos meus companheiros de laboratório que se tornaram amigos, por todo suporte, apoio em momentos de dificuldades e pelas risadas sinceras.

Aos meus amigos, que se tornaram família, por todos os momentos compartilhados e por tornar a graduação leve e satisfatória.

Aos meus colegas de turma por todos os momentos compartilhados, responsáveis por tornar a jornada mais construtiva.

Por último, gostaria de agradecer à Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe UNESP) pelo financiamento do estudo por meio da bolsa de estudos (núm.10464)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 7
2. OBJETIVOS 9
3. METODOLOGIA 9
3.1. Cultura de células amnióticas epiteliais imortalizadas 9
3.2. Estimulação polibacteriana das células amnióticas epiteliais 10
3.3. Ressuspensão das espécies anaeróbias Fusobacterium nucleatum, Bacterioides fragilis e Peptostreptococcus anaerobius 10
3.4. Ressuspensão da espécie Streptococcus agalactiae 11
3.5. Avaliação da viabilidade das bactérias 12
3.6. Concentração de Bactérias 12
3.7. Desafio das Células Epiteliais Amnióticas com as espécies bacterianas 13
3.8. Extração de RNA e obtenção de cDNA 13
3.9. Expressão Gênica do NF-κB 14
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA 14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 14
6. CONCLUSÃO 16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 17

RESUMO

Introdução: O Trabalho de Parto Pré-Termo (TPP) e a Rotura Prematura de Membranas (RPM-PT) acarretam altas taxas de morbidade e mortalidade neonatais. Nestas síndromes inflamatórias há produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que leva ao dano oxidativo e à senescência das membranas fetais. Nesse contexto, a principal via intracelular induzida é o fator nuclear-κB (NF-κB). As células amnióticas que compõe as membranas fetais são importantes fontes de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e ácido araquidônico, que juntos se apresentam como componentes importantes para o início do trabalho de parto. Embora a via inflamatória do NF-κB seja de grande relevância para o desfecho gestacional, a literatura carece de informações associando essa via inflamatória na presença de cenário de infecção amniótica e como a expressão de NF-κB pode estar associada no TPP e na RPM-PT. **Objetivo:** Avaliar a via inflamatória do NF-κB e suas subunidades em cultura de células amnióticas epiteliais imortalizadas (hFM-AECs) no cenário de infecção polibacteriana. **Metodologia:** Células amnióticas epiteliais imortalizadas foram desafiadas com diferentes espécies bacterianas. Culturas celulares sem estímulo foram usadas como controle negativo e, como controle positivo, foi utilizado lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. As células cultivadas e desafiadas com as cepas ATCC foram submetidas à extração de RNA total e o cDNA foi obtido utilizando-se o High Capacity. A expressão gênica da subunidade do NF-κB, Rel-A (p65) foi avaliada por PCR em tempo real utilizando-se Sybr Green. **Resultado:** A expressão gênica da subunidade p65 não apresentou correlação com o processo infeccioso e inflamatório provocado por estímulos bacterianos. **Conclusão:** Os resultados aqui apresentados ainda são preliminares e a investigação de outras moléculas envolvidas nesta via, além da determinação da expressão proteica das moléculas efetoras é essencial para melhor compreensão dos mecanismos implicados na infecção polimicrobiana associada à prematuridade.

1. INTRODUÇÃO

A gestação humana compreende uma complexa rede de fenômenos fisiológicos que dependem da homeostasia materno-fetal estabelecida por uma série de mediadores endócrinos, imunológicos e bioquímicos que culminam no trabalho de parto a termo, definido como o trabalho de parto que ocorre a partir da 37ª semanas de gestação. Os tecidos materno-fetais tal como a decídua, cérvix, placenta e membrana corioamniótica conferem a homeostase necessária para o sucesso gestacional, bem como o seu desfecho (DASKALAKIS; PSARRIS; KOUTRAS; FASOULAKIS *et al.*, 2023) Quando o desfecho gestacional ocorre antes das 37 semanas, tem-se o parto pré-termo (PP), determinado como uma síndrome iniciada por múltiplos mecanismos relacionados à inflamação, infecção, estresse, isquemia ou processos imunológicos, o que o torna um dos principais problemas da Clínica Obstétrica atualmente (DA FONSECA; DAMIÃO; MOREIRA, 2020)

O PP é uma intercorrência obstétrica que afeta de 5 a 18% das gestações e apresenta 75% de mortalidade e morbidade neonatal, sendo caracterizado pelo desfecho entre as 22ª e 36ª semanas de gestação (ROMERO; DEY; FISHER, 2014). O PP apresenta como causa imediata o trabalho de parto pré-termo (TPP) e a rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT), sendo a última definida como a rotura espontânea das membranas fetais entre a 20ª e 36ª semana de gestação.(MENON; RICHARDSON, 2017). A RPM-RT é considerada uma doença das membranas fetais que está presente em 40 a 50% das gestações pré-termo, podendo causar, tanto sequelas ao neonato relacionadas ao desenvolvimento neurológico, pulmonar e cardiovascular, quanto hemorragias pós-parto e sepse à parturiente. Dentre os principais fatores de risco associados a RPM-PT incluem sangramento vaginal, tabaco e má formação congênita, porém, estudos que realizaram cultura do líquido amniótico sugerem que a infecção da cavidade intra-amniótica (ICI) é responsável por cerca de 70% dos casos de rotura prematura das membranas fetais e consequentemente desfechos gestacionais adversos (LEE; CHANG; WANG, 2021)

A infecção das membranas fetais tem como causa primaria a mudança da microbiota vaginal acarretando a RPM-PT pela ascensão de bactérias pelo canal vaginal. A microbiota vaginal, composta por *Lactobacillus* spp., apresenta papel protetivo imprescindível na prevenção de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs), vaginose bacteriana, e infecções no trato urinário, pela capacidade acidificar o ambiente vaginal por meio da produção de ácido lático, assegurando o equilíbrio da microbiota. (RAVEL; GAJER; ABDO; SCHNEIDER *et al.*, 2011)

A vaginose bacteriana, causada pelo *core* patológico composto por exemplo por *Fusobacterium nucleatum, Bacterioides fragilis, Peptostreptococcus anaerobius, Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae*, bem como a vaginite aeróbia e bactérias que causam ISTs como *Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae* e *Trichomonas vaginalis*, já foram anteriormente associadas à desfechos adversos envolvendo aborto espontâneo, PP e RPM-PT (STINSON; PAYNE, 2019) A colonização da vagina por bactérias patogênicas causa a ativação do sistema imune inato dos tecidos materno-fetais levando à ativação da cascata inflamatória via ativação dos receptores de reconhecimento padrão da classe *Toll-like receptors* (TLR), liberando citocinas, quimiocinas e prostaglandinas que aumentam o cenário inflamatório (BENNETT; BROWN; MACINTYRE, 2020). Neste contexto é sabido que o NF-κB participa de forma intrínseca do processo gestacional por induzir a inflamação necessária para a expulsão do feto de forma fisiológica. Além disso, inflamação durante o primeiro e terceiro trimestre gestacional é fisiologicamente importante para a manutenção e integridade das membranas fetais (MENON, 2014). As células amnióticas vão aumentando gradualmente sua produção de quimiocinas e citocinas, reguladas pelo NF-κB durante o período gestacional, causando o remodelamento da membrana corioamniótica. Porém, no contexto da ICI há uma exacerbação da inflamação, que desencadeia a produção de citocinas e quimiocinas de forma intensificada e o desbalanço no estado redox que leva ao aumento da produção de peróxidos, superóxidos e óxido nítrico em quantidades superiores ao sistema antioxidante. (GOMEZ-LOPEZ; GALAZ; MILLER; FARIAS-JOFRE *et al.*, 2022). Ambos os eventos culminam na ativação de vias de produção de metaloproteinases (MMP) que degradam a matriz extracelular das membranas fetais levando a rotura das membranas e ao início do trabalho de parto antes do total desenvolvimento fetal (MENON; RICHARDSON; LAPPAS, 2019)

A principal via intracelular induzida durante a inflamação das membranas fetais é o *Nuclear Factor Kappa B* (NF-κB). O NF-κB é uma família de dímeros composta por cinco subunidades – Rel A (p65), Rel B, c-Rel, p52 e p50 – que permanecem inativadas no citosol acoplados a uma proteína quinase que modula negativamente sua atividade (MITCHELL; VARGAS; HOFFMANN, 2016) A via clássica do NF-κB compreende a via dependente do complexo de quinases chamado NF-κB *essencial modulator* (NEMO), responsável pela fosforilação da quinase em que o dímero está acoplado (IκB). Quando há um estímulo celular inflamatório pelo receptor de TNF-α, por exemplo, os receptores transmembrana TNFR se ligam a proteínas que irão ativar o complexo de quinases (NEMO) iniciando a fosforilação do inibidor dimérico (IκB). Dessa forma, o dímero, agora livre, passa para seu estado ativo e inicia a translocação para o núcleo. Uma vez no núcleo, o dímero

possui capacidade de se ligar à uma sequência de 10 pares de base promotora de genes envolvidos na resposta inflamatória e imunológica (VALLABHAPURAPU; KARIN, 2009)

Embora a via inflamatória do NF-κB seja de extrema relevância para o desfecho gestacional, a literatura carece de associações entre a via e o cenário de infecção das membranas fetais. Portanto, é de extrema importância a elucidação das subunidades expressas envolvidas no contexto da ICI e sua associação com o PP e RPM-RT.

2. OBJETIVOS

Avaliar a via inflamatória do NF-κB e suas subunidades em cultura de células amnióticas primárias no cenário de infecção polibacteriana.

3. METODOLOGIA

3.1. Cultura de células amnióticas epiteliais imortalizadas

Células amnióticas epiteliais humanas e imortalizadas (hFM-AECs) utilizadas nesse projeto foram gentilmente cedidas pelo Dr. Ramkumar Menon, da University of Texas Medical Branch at Galveston (UTMB), Texas, EUA. Resumidamente, as células foram transferidas para um meio de cultura modificado (Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) Nutrient Mixture F12 HAM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução antibiótica e antifúngica (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA), e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. O *pellet* celular foi ressuspendido em meio de cultura completo (Keratinocyte serum-free medium (KSFM) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)) suplementado com Primocina (InvivoGen, San Diego, CA, USA). A partir desses procedimentos, as células foram transferidas para garrafas de cultura, T25 ou T75, contendo meio de cultura KSFM, com troca de meio após 24 horas. A partir disso, ao atingirem a confluência de 90% (Figura 1) foi feita a tripsinização, neutralização, centrifugação, ressuspensão e incubação até que a confluência de 90% seja novamente atingida. No final desse processo, as células estavam disponíveis para serem remanejadas nas placas de 6 poços e os posteriormente realizar os desafios bacterianos. Apesar da disponibilidade de cultivo de células imortalizadas de forma indefinida, houve o cuidado da obtenção da quantidade de células necessárias para a realização do projeto com o menor número de passagens possíveis.

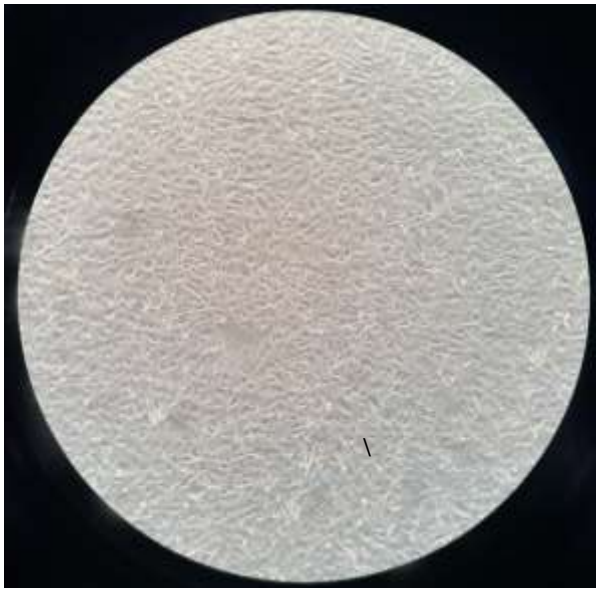


Figura 1: Cultura de células amnióticas epiteliais imortalizadas com 90% de confluência.

3.2. Estimulação polibacteriana das células amnióticas epiteliais

As hFM-AECs foram desafiadas com cepas de ATCC (American Type Culture Collection) do *core* patológico da vaginose bacteriana (*Fusobacterium nucleatum*, *Bacterioides fragilis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Streptococcus agalactiae*) (Tabela 1).

Tabela 1. Diferentes desafios para estimulação das células epiteliais amnióticas *in vitro*

Espécies bacterianas	Concentração
F. nucleatum + B. fragilis, + P. anaerobius + S. agalactiae	10^6 UFC

3.3. Ressuspensão das espécies anaeróbias Fusobacterium nucleatum, Bacterioides fragilis e Peptostreptococcus anaerobius

Adquiriu-se o ATCC (American Type Culture Collection) e os protocolos de ressuspensão foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. A ressuspensão foi realizada em meio Tioglicolato (Figura 2) em estufa a 37°C até apresentarem formação de grumos ou turvação. O estoque das espécies foi feito em glicerol e congelado a -80°C.

3.4. Ressuspensão da espécie Streptococcus agalactiae

Adquiriu-se o ATCC (American Type Culture Collection) e o protocolo de ressuspensão foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. A ressuspensão foi realizada em meio BHI em estufa a 37°C até apresentar turvação O estoque foi realizado em meio de cultura Columbia suplementado com sangue de carneiro em temperatura ambiente (Figura 3).



Figura 2: Cultivo de *F. nucleatum*, *B. fragilis* e *P. anaerobius* em câmara de anaerobiose

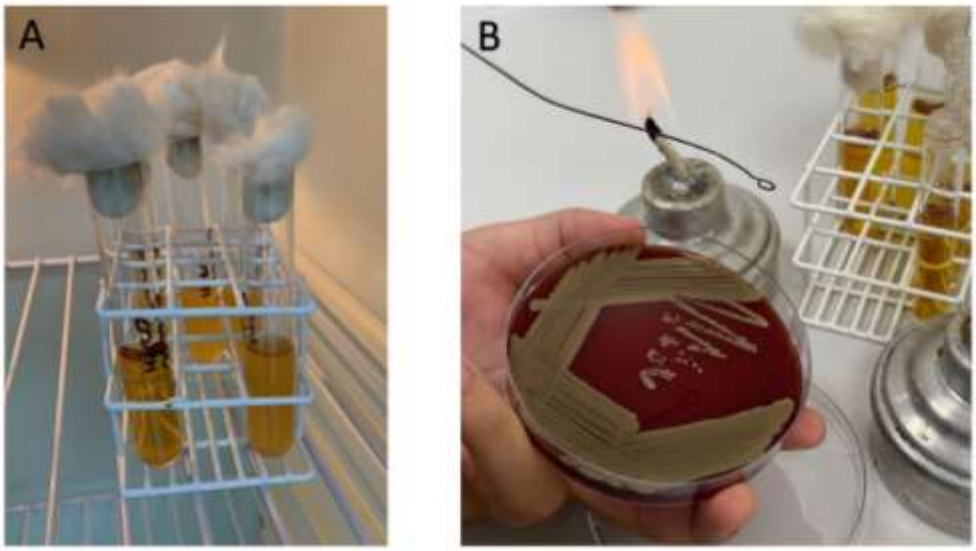


Figura 3: Cultivo de *S. agalactiae* (aeróbia) em caldo BHI (**A**) e estoque da mesma em meio Columbia suplementado com sangue de carneiro (**B**).

3.5. Avaliação da viabilidade das bactérias

Para se certificar que foram utilizadas somente as bactérias de interesse foi realizada a Coloração de Gram em lâminas com o meio de cultura para avaliar se não havia nenhuma contaminação externa nas colônias de *F. nucleatum*, *B. fragilis*, *P. anaerobius* e *S. agalactiae* (Figura 4)

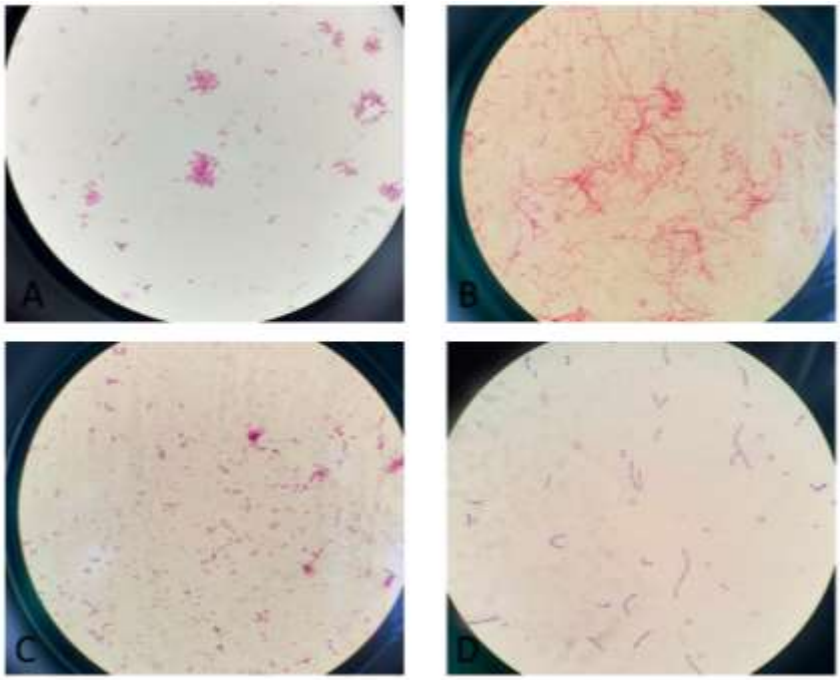


Figura 4: Coloração de Gram para avaliação das culturas de bactérias *Bacterioides fragilis* (A), *Fusobacterium nucleatum* (B), *Peptostreptococcus anaerobius* (C) e *Streptococcus agalactiae* (D)

3.6. Concentração de Bactérias

Posteriormente foi realizada a escala de McFarland em salina para obtenção da concentração necessária de bactérias para o desafio das células. Ao final, por meio da turbidez, acertou-se a escala para a concentração de 10^9 UFC objetivando chegar-se à concentração de 10^6 (Figura 5)

c

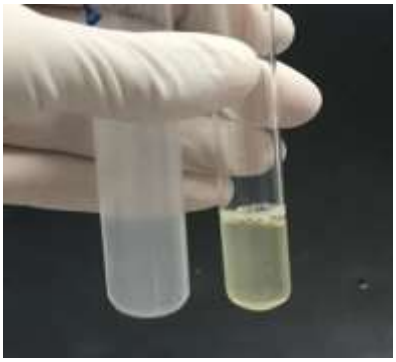


Figura 5: Estabelecimento da concentração inicial de bactérias de 10^9 UFC (Unidade de Formado de Colônia) pela escala de McFarland.

3.7. Desafio das Células Epiteliais Amnióticas com as espécies bacterianas

Após a quantificação, as espécies bacterianas foram atenuadas pelo calor a 80°C durante1 hora e armazenadas a -80°C até à sua utilização. As culturas de células epiteliais amnióticas foram estimuladas com *F. nucleatum, B. fragilis, P. anaerobius, S. agalactiae* na concentração 10^6 UFC e a solução inativada pelo calor diluída em meio de cultura. O desafio realizado está descrito na Tabela 2. Culturas sem estímulo bacteriano foram usadas como controle negativo, as quais foram incubadas apenas com o meio de cultura, e como controle positivo foi utilizado o LPS de *E. coli* 10% (Sigma) para demonstrar o poder de estimulação das células nesse modelo de cultura *in vitro*. Para a avaliação das subunidades do NF-κB foram coletadas as células após 24h de estimulação por meio da tripsinização e armazenados a -80 ºC para uso a posteriori.

Tabela 2: Tratamentos para estimulação das células amnióticas epiteliais *in vitro*

Controle negativo: amostras não estimuladas
Controle positivo: Lipopolissacarídeo (*E. coli*) a 100ng/ml
Estímulo polibacteriano: *Fusobacterium nucleatum, Bacterioides fragilis, Peptostreptococcus anaerobius, Streptococcus agalactiae*

3.8. Extração de RNA e obtenção de cDNA

As células cultivadas e desafiadas com as cepas ATCC foram submetidas à extração de RNAtotal foi realizada utilizando-se o kit RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare) Durante a extração, as amostras foram tratadas com DNase livre de RNase, para eliminar possível contaminação com DNA residual genômico. Ao final da extração, a eficácia do tratamento com a DNAse foi verificada por amplificação do gene constitutivo da β-globina por

PCR seguida de visualização em gel de agarose 1,5%. As amostras que não apresentaram essa amplificação foram utilizadas para obtenção de cDNA. O RNA total foi quantificado em aparelho Epoch (Biotek) e foram consideradas as amostras com razão da absorbância A260/A280 entre 1,8 e 2,1 e concentração entre 0,02 e 0,2µg/µL. Amostras com concentrações superiores foram diluídas. O cDNA foi obtido utilizando-se o kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante (DNAsyTissue Kit, Qiagen).

3.9. Expressão Gênica do NF-κB

A expressão gênica da subunidade do NF-κB, Rel-A (p65) foi avaliada por PCR em tempo real utilizando-se Sybr Green (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em duplicatas em volume final de 20 µL (10 µL de Sybr, 0.3 µL de cada primer (10mM) e 4 µL de cDNA diluído (1:5)). As condições de ciclagem serão 95ºC por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e curva de *melting*. Como controle endógeno foi utilizado o gene PPIA com os primers: PPIA-F5'GAGGAAAACCGTGTACTATTAGC3' e PPIA-R 5'GGGACCTTGTCTGCAAAC3' nas mesmas condições de reação e ciclagem descritas acima. Todas as reações foram realizadas em duplicata e nenhum controle negativo foi incluído nas corridas.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. Foi empregado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para determinar as diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de interesse. O nível de significância adotado foi de 5% e as análises foram realizadas empregando-se o *software* GraphPad Prism (versão 8.0; GraphPad, Inc., San Diego, CA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores da expressão gênica da subunidade p65 do NF-κB estão apresentados na Figura 6. O valor da expressão gênica foi obtido através da comparação do resultado de amplificação do p65 com o *housekeeping* gene *PPIA*. Não foi observada diferenças estatisticamente significativas do grupos controle positivo e estímulo polibacteriano quando comparados com o grupos controle

negativo, assim como não foi encontra diferença estatisticamente significativa quando os grupos foram comparados entre si.

O fator de transcrição NF-κB é um dímero formado por um complexo de 5 subunidades de proteínas (p65, Rel-B, c-Rel, p50 e p52) (COOKSON; CHAPMAN, 2010), sendo que a literatura mostra uma importante correlação entre a ativação dessa via e o início do trabalho de parto, através de processos de inflamação dos tecidos gestacionais, condição inerente ao trabalho de parto (MENON, 2014). No último trimestre gestacional, perto da resolução do parto, as altas demandas metabólicas fetais promovem um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, ativando a via do NF-κB, promovendo um cenário pró-inflamatório devido a produção de citocinas (HUSSAIN; MURTAZA; METWALLY; KALHORO *et al.*, 2021)

No presente estudo, a expressão gênica da subunidade p65 não apresentou correlação com o processo infeccioso e inflamatório provocado por estímulos bacterianos. Embora a subunidade p65 seja a principal subunidade relacionada com a atividade transcricional do NF-κB, seu papel nos processos de infecção intrauterina ainda não é completamente conhecido (AN; ZHAO; HAN; SUN *et al.*, 2022). Vale ressaltar que nesse trabalho foi analisado uma única subunidade do NF-κB, e que para a compreensão do papel dessa via e sua ativação no contexto de infecção amniótica é necessário que as demais subunidades também sejam avaliadas, assim como a avaliação proteica dessas moléculas.

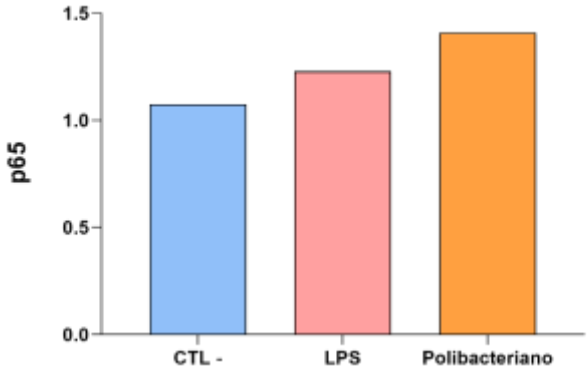


Figura 6. Expressão gênica de *p65* nos grupos: controle negativo (CTL-), estímulo bacteriano (LPS) e estímulo polibacteriano (Polibacteriano)

6. CONCLUSÃO

Por conta do processo infeccioso, era esperado aumento na expressão gênica de moléculas efetoras da via do NF-κB. Entretanto, os resultados aqui apresentados ainda são preliminares e a investigação de outras moléculas envolvidas nesta via, além da determinação da expressão proteica das moléculas efetoras é essencial para melhor compreensão dos mecanismos implicados na infecção polimicrobiana associada à prematuridade. Com este estudo destacamos a necessidade de aprofundar a investigação da via NF-κB em gestações fisiológicas e complicadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, Z.; ZHAO, R.; HAN, F.; SUN, Y. *et al.* Potential Serum Biomarkers Associated with Premature Rupture of Fetal Membranes in the First Trimester. **Front Pharmacol**, 13, p. 915935, 2022.

BENNETT, P. R.; BROWN, R. G.; MACINTYRE, D. A. Vaginal Microbiome in Preterm Rupture of Membranes. **Obstet Gynecol Clin North Am**, 47, n. 4, p. 503-521, Dec 2020.

COOKSON, V. J.; CHAPMAN, N. R. NF-kappaB function in the human myometrium during pregnancy and parturition. **Histol Histopathol**, 25, n. 7, p. 945-956, Jul 2010.

DA FONSECA, E. B.; DAMIÃO, R.; MOREIRA, D. A. Preterm birth prevention. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, 69, p. 40-49, Nov 2020.

DASKALAKIS, G.; PSARRIS, A.; KOUTRAS, A.; FASOULAKIS, Z. *et al.* Maternal Infection and Preterm Birth: From Molecular Basis to Clinical Implications. **Children (Basel)**, 10, n. 5, May 22 2023.

GOMEZ-LOPEZ, N.; GALAZ, J.; MILLER, D.; FARIAS-JOFRE, M. *et al.* The immunobiology of preterm labor and birth: intra-amniotic inflammation or breakdown of maternal-fetal homeostasis. **Reproduction**, 164, n. 2, p. R11-r45, Jun 20 2022.

HUSSAIN, T.; MURTAZA, G.; METWALLY, E.; KALHORO, D. H. *et al.* The Role of Oxidative Stress and Antioxidant Balance in Pregnancy. **Mediators Inflamm**, 2021, p. 9962860, 2021.

LEE, W. L.; CHANG, W. H.; WANG, P. H. Risk factors associated with preterm premature rupture of membranes (PPROM). **Taiwan J Obstet Gynecol**, 60, n. 5, p. 805-806, Sep 2021.

MENON, R. Oxidative stress damage as a detrimental factor in preterm birth pathology. **Front Immunol**, 5, p. 567, 2014.

MENON, R.; RICHARDSON, L. S., 2017, **Preterm prelabor rupture of the membranes: a disease of the fetal membranes**. Elsevier. 409-419.

MENON, R.; RICHARDSON, L. S.; LAPPAS, M. Fetal membrane architecture, aging and inflammation in pregnancy and parturition. **Placenta**, 79, p. 40-45, Apr 2019.

MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NFκB system. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, 8, n. 3, p. 227-241, May 2016.

RAVEL, J.; GAJER, P.; ABDO, Z.; SCHNEIDER, G. M. *et al.* Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 4680-4687, Mar 15 2011.

ROMERO, R.; DEY, S. K.; FISHER, S. J. Preterm labor: one syndrome, many causes. **Science**, 345, n. 6198, p. 760-765, Aug 15 2014.

STINSON, L. F.; PAYNE, M. S. Infection-mediated preterm birth: Bacterial origins and avenues for intervention. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, 59, n. 6, p. 781-790, Dec 2019.

VALLABHAPURAPU, S.; KARIN, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. **Annu Rev Immunol**, 27, p. 693-733, 2009.