

**Nathália Mayumi Noda Nicolau**

**Estudo *in vitro* de infecção das membranas corioamnióticas  
com espécies bacterianas de difícil cultivo detectadas no trato  
genital inferior: modulação da resposta imune na interface  
materno-fetal.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Guimarães da Silva  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jossimara Poletini

Botucatu  
2017

Nathália Mayumi Noda Nicolau

Estudo *in vitro* de infecção das membranas corioamnióticas com espécies bacterianas de difícil cultivo detectadas no trato genital inferior: modulação da resposta imune na interface materno fetal.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Márcia Guimarães da Silva  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Jossimara Poletini

Botucatu  
2017

---

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

Nicolau, Nathália Mayumi Noda.

Estudo *in vitro* de infecção das membranas corioamnióticas  
com espécies bacterianas de difícil cultivo detectadas no trato genital inferior:  
modulação da resposta imune na interface materno fetal. / Nathália Mayumi Noda  
Nicolau. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio  
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Márcia Guimarães da Silva

Coorientador: Jossimara Polettini

Capes: 40103005

1. Trabalho de Parto Prematuro.
2. Técnicas *in vitro*.
3. Membranas fetais, Ruptura prematura - Infecção.
4. Micoplasma.
5. Aparelho genital feminino.
6. Líquido amniótico - Exame.

Palavras-chave: Membranas corioamnióticas; Micoplasmas genitais; Parto pré-termo.

---

*Dedicatória*

---

*Dedico esse trabalho aos meus pais, minha irmã, meu marido e minha filha; alicerce da  
minha vida.*

---

# *Agradecimientos*

---

**A Deus,**  
Por tudo que já me foi proporcionado até hoje, só tenho a agradecer.

**À Jossimara Poletti,**  
Como coorientadora nunca mediu esforços para me ajudar no que fosse necessário, e mesmo longe ainda se torna bem presente, tudo teria sido muito mais difícil sem você.

**À Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva,**  
Agradeço a oportunidade de ter sido sua aluna tanto na graduação como na pós-graduação. Como orientadora é sempre solícita e atenciosa, não poderia ter tido orientação melhor. Muito obrigada por todos os ensinamentos, os levarei por toda a vida, nunca conseguirei lhe agradecer o bastante.

**Ao Prof. Dr. Ramkumar Menon,**  
Por ter aceitado me receber e orientar em seu laboratório na UTMB em Galveston, o qual foi fundamental para o desenvolvimento dessa tese.

**À todo o pessoal do Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal,**  
Aline Bolpetti, Bruna Ramos, Carolina Tafner, Gabriel Vitor Pinto, Juliano Novak, Laura Martin e Natália Moço por toda ajuda e convivência. De forma especial, a Camila Marconi e Larissa D. Marcolino, por sempre estarem dispostas a me ajudar, ouvir, ensinar e além de tudo sempre me motivam nos momentos mais difíceis de cada experimento. Cada um contribuiu de alguma maneira, só tenho a agradecer.

**À Secretária do Programa de Pós-Graduação em Patologia,**  
Vânia Soler, e aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, sempre muito atenciosos e prestativos.

**Aos funcionários do Departamento de Patologia,**  
em especial ao Luciano Donini, Cristina Dorico e José Carlos Pedroso de Lima, dispostos a auxiliar em qualquer momento.

**Às gestantes,**  
que aceitaram a participar desse estudo.

**À CAPES, CNPq e FAPESP,**  
pelas bolsas de estudos e auxílio financeiro concedidos.

---

*Resumo*

---

**Introdução:** A infecção da cavidade amniótica e inflamação são associadas com o parto pré-termo espontâneo. Em geral, essas infecções são polibacterianas e causadas principalmente pela ascensão bacteriana do trato genital inferior. Dessa forma, a invasão microbiana da cavidade amniótica e o risco do parto pré-termo estão frequentemente relacionados à colonização vaginal por diferentes espécies bacterianas, incluindo aquelas de difícil cultivo, como micoplasmas genitais. *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* são as principais bactérias isoladas no líquido amniótico de gestações complicadas por parto pré-termo com membranas íntegras ou na presença de rotura prematura de membranas pré-termo. Além dos micoplasmas genitais, *Gardnerella vaginalis* merece destaque por ser a principal bactéria do *core* patológico da vaginose bacteriana e por estar associada ao risco de parto pré-termo. Dessa forma, considerando que a infecção da cavidade amniótica é de natureza polibacteriana, mimetizar esse cenário em membranas fetais *in vitro* se torna ferramenta importante para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no parto pré-termo. **Objetivo:** Avaliar a modulação da resposta imune induzida pela interação entre micoplasmas genitais e *G. vaginalis* nas membranas corioamnióticas *in vitro*. **Material e Métodos:** Para a estimulação da cultura *in vitro*, foram coletadas 8 membranas corioamnióticas de gestantes que tiveram a resolução da gestação por cesárea eletiva de termo ( $\geq 37$  semanas de gestação), na ausência de trabalho de parto e/ou rotura prematura de membranas. As culturas das membranas corioamnióticas foram estimuladas com  $10^6$  ou  $10^3$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de suspensão bacteriana, inativada pelo calor, diluída em meio de cultura de tecidos com *U. urealyticum*, *M. hominis* e *G. vaginalis* isolados ou em combinação. Amostras de membranas corioamnióticas, apenas com o meio de cultura, sem estímulo bacteriano foram usadas como controle negativo. Como controle positivo foi utilizado o lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*. Os sobrenadantes obtidos das culturas de membranas corioamnióticas, após 24 horas de estimulação bacteriana, foram avaliados pela tecnologia Luminex® xMAP™ utilizando um painel para as seguintes citocinas e receptores: IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, sIL-1R1, sIL-1R2, sIL-6R, sTNF-R1, sTNF-R2. Além disso, pela técnica de ELISA foi avaliado o receptor solúvel sgp130, e por imunohistoquímica, a imunomarcagem dos receptores de membrana mL-6R e gp130 nas células coriônicas e no epitélio amniótico. A análise estatística para os dados de citocinas e receptores solúveis foi feita utilizando modelos de feitos mistos lineares usando a biblioteca lme4 da linguagem de programação R. Os dados de imunohistoquímica foram avaliadas usando a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, em que, o valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. O software

---

empregados nessas análises foi o GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). **Resultados:** A estimulação das membranas por micoplasmas genitais não aumentou a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF), exceto a estimulação com *U. urealyticum* que aumentou os níveis de IL-8. No entanto, a estimulação com *U. urealyticum* e *M. hominis* aumentaram significativamente os níveis de IL-10 e IL-13. A estimulação das membranas corioamnióticas por *G. vaginalis* isoladamente ou em combinação com micoplasmas genitais resultou em aumento de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , GM-CSF). Quanto a produção de IL-6, todos os grupos aumentaram significativamente com relação ao controle não estimulado, com exceção ao estímulo com *M. hominis* isolado. Já os níveis de sIL-6R aumentaram significativamente somente com estímulo por *U. urealyticum* isolado ou em combinação com *M. hominis*. Além disso, o receptor solúvel sgp130 se apresentou em níveis elevados em todos os tratamentos, com exceção do tratamento com *G. vaginalis* isolada ou na combinação das três espécies bacterianas em cargas iguais. A análise imunohistoquímica mostrou maior imunorreatividade do receptor de membrana mIL-6R apenas nas células do âmnio na presença de LPS e *G. vaginalis* em comparação com o controle ( $p < 0,0001$ ), mas não para os grupos de *M. hominis*, *U. urealyticum* e estimulações polibacterianas. Além disso, o gp130 aumentou estatisticamente nas células do âmnio e cório estimuladas com LPS, *G. vaginalis* e todos os tratamentos polibacterianos. **Conclusões:** Membranas corioamnióticas *in vitro* produzem perfil distinto de citocinas e receptores pró e anti-inflamatórios em resposta à estimulação por micoplasmas genitais e *G. vaginalis* isolados ou em combinação. *G. vaginalis* estimula resposta pró-inflamatória nas membranas fetais *in vitro*, que após 24 horas é regulada pela atividade anti-inflamatória da IL-6 através da via de sinalização clássica. Micoplasmas genitais induzem controle da resposta inflamatória pela produção de IL-13, IL-10 e sTNF-R2 favorecendo sua sobrevivência na cavidade amniótica. Além disso, o aumento de IL-6 por si só pode não ser indicativo de qualquer função, uma vez que a sua atividade é controlada por diferentes receptores de membrana e solúveis, sendo que sua produção pelas membranas fetais não deve ser mediador funcional das vias indutoras de trabalho de parto. A tentativa de correlacionar o risco de desfecho gestacional adverso baseado exclusivamente nos níveis de IL-6 em fluidos biológicos, sem considerar os receptores de IL-6, podem ser ineficazes.

**Palavras-chave:** Parto pré-termo, micoplasmas genitais, infecção polibacteriana, membranas corioamnióticas *in vitro*.

---

# *Abstract*

---

**Introduction:** The intraamniotic infection and inflammation are associated with spontaneous preterm birth (PTB). In general, such infections are polybacterial and caused mainly by ascending bacteria from the lower genital tract. Thus, the microbial invasion of the amniotic cavity (MIAC) and risk of preterm birth is often cervicovaginal colonizers such as genital mycoplasmas, in which *Mycoplasma hominis* (MH) and *Ureaplasma urealyticum* (UU) are the most commonly isolated bacteria in the amniotic fluid in both PTB with intact membranes and in preterm premature rupture of membranes (pPROM). In addition, *Gardnerella vaginalis*, the main microorganism of the pathological core of bacterial vaginosis is also closely associated with the risk of preterm birth. Thus, considering that the infection of the amniotic cavity is polybacterial, mimic this scenario in fetal membranes *in vitro* becomes an important tool for a better understanding of the mechanisms that trigger preterm delivery. **Objective:** To evaluate the modulation of the immune response induced by the interaction between genital mycoplasmas and *G. vaginalis* in chorioamniotic membranes *in vitro*. **Material and methods:** For the *in vitro* culture stimulation, 8 chorioamniotic membranes of pregnant women in term elective cesarean section ( $\geq 37$  weeks gestation) were collected, in the absence of labor and/or premature rupture of membranes. Chorioamniotic membrane cultures were stimulated with  $10^6$  or  $10^3$ UFC of heat inactivated bacterial suspension diluted in tissue culture medium with *U. urealyticum*, *M. hominis* and *G. vaginalis* alone or in combination. Unstimulated samples were used as control in which was included only culture media without bacteria, and as positive control was used Lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli*. The supernatants obtained from the chorioamnionic membrane cultures after 24 hours were evaluated by Luminex xMAP technology using a panel for the following cytokines and receptors: IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, sIL-1R1, sIL-1R2, sIL-6R, sTNF-R1, sTNF-R2. In addition, the soluble receptor sgp130 was evaluated by the ELISA technique, and by immunohistochemistry we identified membrane receptors, mIL-6R and gp130, in the amnion and chorion cells. Statistical analysis for cytokine and soluble receptors data were performed using linear mixed-effects models using the lme4 library of the R statistical language. Immunohistochemistry data were evaluated using one-way (ANOVA) followed by Tukey's test, in which the value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant and the software used was GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). **Results:** The stimulation of genital mycoplasmas did not increase the proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF), except *U. urealyticum* that increased IL-8 levels. However, *U. urealyticum* and *M. hominis* significantly increased IL-10 and IL-13 levels. *G. vaginalis* alone or in combination with genital mycoplasmas showed an increased pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8,

---

IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , GM-CSF). Considering the IL-6 production, all groups increased significantly compared to the control, except *M. hominis* isolated. Moreover, sIL-6R levels increased significantly only in the presence of *U. urealyticum* alone or in combination with *M. hominis*. In addition, the soluble sgp130 receptor was elevated in all treatments, except for the treatment with *G. vaginalis* alone or in combination of the three bacteria in equal loads. Immunohistochemistry analysis showed greater intensity of mIL-6R only in amnion cells in the presence of LPS and *G. vaginalis* compared to control ( $p < 0.0001$ ) but not for *M. hominis*, *U. urealyticum* and polybacterial treatments. In addition, gp130 increased statistically in amnion cells stimulated with LPS, GV and all polybacterial treatments. **Conclusions:** Chorioamniotic membranes *in vitro* produce a distinct cytokine and pro- and anti-inflammatory profile in response to stimulation by genital mycoplasmas and *G. vaginalis* alone or in combination. *G. vaginalis* sustain a proinflammatory response in the fetal membranes *in vitro*, in which after 24 hours is regulated by the anti-inflammatory activity of IL-6 through the classical signaling pathway. While genital mycoplasmas induce a control of the inflammatory response, by the production of anti-inflammatory cytokines (IL-13, IL-10, sTNF-R2), favoring their survival in the amniotic cavity. Furthermore, the increase of IL-6 alone may not be indicative of any function, since its activity is controlled by different membrane and soluble receptors, since its production by fetal membranes could not be a functional mediator of the labor-inducing pathways. In summary, the attempt to correlate the risk of adverse gestational outcome based exclusively on IL-6 levels in biological fluids without considering IL-6 receptors may be ineffective.

**Keywords:** preterm delivery, genital mycoplasmas, polybacterial infection, chorioamniotic membranes *in vitro*.

---

## *Lista de abreviaturas*

---

<b>AMB</b>	Antígeno de múltiplas bandas
<b>GM-CSF</b>	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
<b>Gp130</b>	Glicoproteína 130
<b>HBD</b>	Beta defensina humana
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LA</b>	Líquido amniótico
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear kappa B
<b>PAMPs</b>	Padrão de reconhecimento de patógenos
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PP</b>	Parto pré-termo
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>RPM</b>	Rotura prematura de membranas
<b>RPM-PT</b>	Rotura prematura de membranas pré-termo
<b>Th</b>	T helper
<b>TLR</b>	Receptor toll-like
<b>TNF</b>	Tumor de necrose tumoral
<b>TPP</b>	Trabalho de parto pré-termo
<b>UFC</b>	Unidade de formação de colônias

---

# *Sumário*

---

<b>Capítulo I</b>	18
<b>1. Revisão da literatura</b>	20
<i>1.1. Estrutura das membranas corioamnióticas</i>	24
<i>1.2. Inflamação e trabalho de parto pré-termo</i>	28
<i>1.3. Invasão microbiana da cavidade amniótica e parto pré-termo</i>	30
<i>1.4. Micoplasmas genitais e Gardnerella vaginalis</i>	33
<i>1.5. Membranas corioamnióticas in vitro</i>	38
<b>2. Justificativa</b>	41
<b>3. Objetivo</b>	43
<i>3.1. Objetivo específicos</i>	43
<b>4. Referências bibliográficas</b>	45
<b>Capítulo II</b>	58
<b>5. Artigo Científico I - <i>Combinations and loads of bacteria affect the cytokine production by fetal membranes: An in vitro study</i></b>	60
<b>6. Artigo Científico II - <i>Polybacterial Stimulation Suggest Discrete IL-6/IL-6R-Signaling in Human Fetal Membranes: Potential Implication in IL-6 Function</i></b>	69
<b>Conclusões</b>	98
<b>Anexo</b>	99

---

# *Capítulo I*

---

# *Revisão da Literatura*

---

O trabalho de parto a termo, na espécie humana, é resultado de complexa rede de eventos, regulados por uma variedade de mecanismos e mediadores dos sistemas endócrino, nervoso e imune. 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 37<sup>a</sup> semana de gestação(1,2). Neste contexto, as citocinas, polipeptídeos secretados por células da imunidade inata e adaptativa, permeiam e possibilitam esses mecanismos envolvidos no desencadeamento do parto(1).

Por muitos anos, a comunidade científica acreditou que o sucesso da gestação dependia do predomínio de resposta imune de perfil Th2, enquanto a resposta imune de perfil Th1 era associada a resultados gestacionais adversos(3,4). Porém, estudos vêm demonstrando que o sucesso da gestação depende de um complexo e dinâmico balanço entre citocinas, que se modifica ao longo da gestação normal(5,6). No primeiro trimestre gestacional o predomínio é da resposta imune de perfil Th1, no qual o microambiente inflamatório torna-se necessário tanto para permitir o correto reparo do endométrio, que sofre danos consequentes da implantação do feto, quanto para remoção de *debris* celulares. Já o segundo trimestre é caracterizado pela resposta imune de perfil Th2(3), com aumento de citocinas com atividade anti-inflamatória, importantes para a manutenção da gestação. No terceiro trimestre e no momento do parto, o predomínio volta a ser de perfil Th1, tanto sistemicamente(7), quanto no tecido placentário(8) e no líquido amniótico (LA)(9). Assim, Romero et al.(10) descreveram o trabalho de parto a termo como uma síndrome inflamatória.

No entanto, apesar dos inúmeros trabalhos e das tecnologias existentes, os mecanismos envolvidos no desencadeamento do trabalho de parto a termo ainda não estão completamente elucidados(11). Além disso, as alterações endócrinas que antecedem o trabalho de parto não

---

são uniformes entre as espécies (revisado por Vora, et al.(12)), o que dificulta extrapolar os achados obtidos na experimentação animal para os seres humanos.

A maior consequência do incompleto conhecimento dos mecanismos que desencadeiam o trabalho de parto a termo é a dificuldade em prevenir o trabalho de parto pré-termo (TPP), considerado um dos principais problemas da Clínica Obstétrica. Além da mortalidade neonatal, as comorbidades associadas ao parto pré-termo (PP) geralmente levam a diversas consequências na vida do neonato resultando em custos econômicos, físicos e psicológicos.(13)

O TPP é uma importante intercorrência obstétrica que acomete de 5 a 10% das gestações(14–16), caracterizada 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 superior a 2 cm, no período em que a idade gestacional encontra-se entre 22 e 37 semanas(17). A principal complicação para o recém-nascido relacionada aos episódios de TPP é a prematuridade, que é responsável por 70% dos índices de morbidade e mortalidade perinatal(18,19).

O PP é uma condição complexa que pode ser classificado em três categorias, os que ocorrem por indicação médica, com prevalência de 25% (IC 95%=18.7-35.2%); aqueles que ocorrem espontaneamente, com prevalência de 50% (IC 95%=23.2-64.1%); e por desfecho da rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT) em 25 % (IC 95%=7.1-51.2%)(20). Nos casos de PP que ocorrem por indicação médica, os riscos e biomarcadores para diagnóstico e intervenções são muito mais claros do que os pertencentes ao grupo dos partos espontâneos, sendo que nesses os fatores que levam ao parto pré-termo ainda não estão totalmente elucidados.

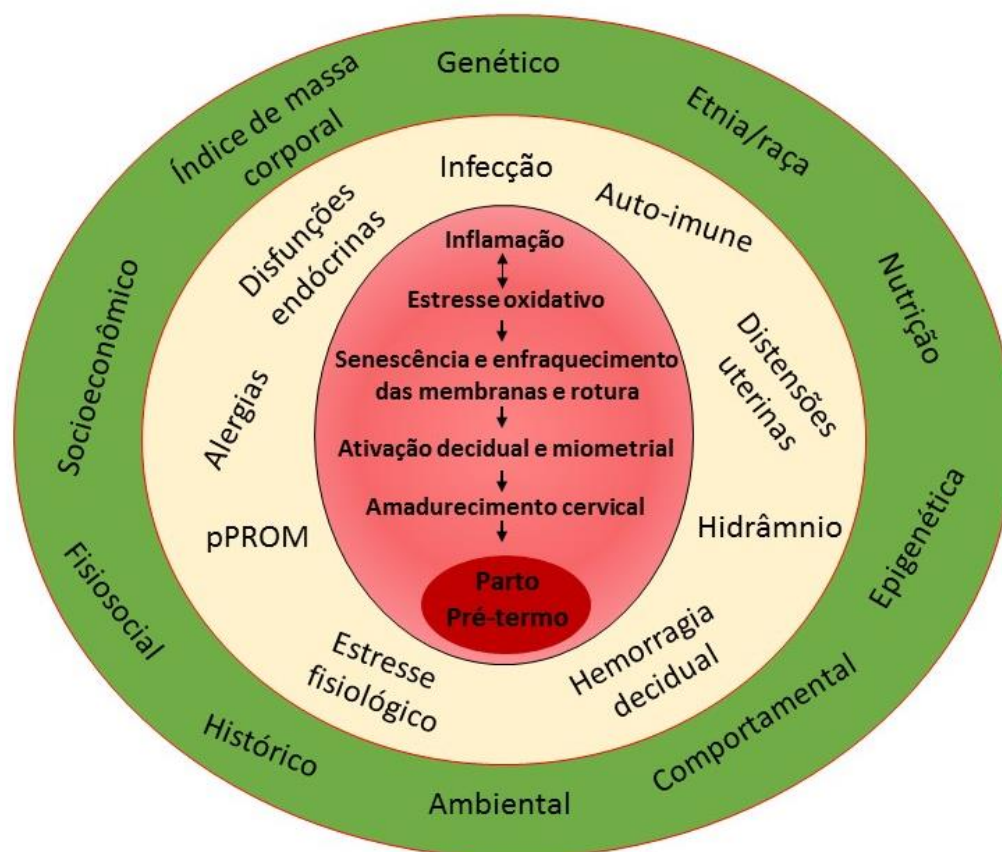
Muitos fatores associados à ocorrência de PP são conhecidos, como sua ocorrência em gestações anteriores, abortos anteriores, idade materna inferior a 20 anos(21), rotura prematura de membranas (RPM), corioamnionite (21,22), gestação múltipla, hipertensão gestacional,

---

sangramento vaginal(22), pequeno ganho de peso materno durante a gestação(23), diabetes gestacional(24) e vaginose bacteriana(25). A Figura 1 demonstra que o PP é complexo e que diversas condições clínicas (círculo amarelo) podem contribuir para o início do trabalho de parto através da ativação de múltiplas vias diferentes. Essas condições clínicas podem ser iniciadas por diferentes fatores (círculo verde), que podem atuar em sinergia ou de forma independente nesses desfechos, as quais podem ativar resposta inflamatória fetal e materna ou estresse oxidativo, levando ao enfraquecimento das membranas fetais e ativação miometrial e decidual, resultando no parto pré-termo(20). Apesar das vias efetoras finais serem provavelmente as mesmas tanto do parto a termo quanto ao pré-termo, os iniciadores podem ser diferentes.

Dessa forma, baseado em diversos trabalhos epidemiológicos e estudos de mecanismos *in vitro* (14,26–32), o princípio do PP tem sido descrito de maneira sucinta. Primeiramente fatores de risco levam à inflamação ou disfunção endócrina, seguido da ativação dos tecidos intrauterinos materno-fetais, o que leva a ativação da uterotonina culminando no parto pré-termo. Entretanto, o aumento global do PP nos últimos anos, vem demonstrando que a complexidade dos fatores de risco e seu papel em induzir alterações bioquímicas, morfológicas, inflamatórias e oxidativas que levam ao parto pré-termo envolve uma rede complexa de biomarcadores, o que dificulta o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos e a prevenção do parto pré-termo.

---



**Figura 1.** Diversas condições clínicas (círculo amarelo) podem contribuir para o início do trabalho de parto através da ativação de múltiplas vias diferentes. Essas condições clínicas podem ser iniciadas por diferentes fatores (círculo verde), que podem atuar em sinergia ou de forma independente nesses desfechos, as quais podem ativar resposta inflamatória fetal e materna ou estresse oxidativo, levando ao enfraquecimento das membranas fetais e ativação miometrial e decidual, resultando no parto pré-termo. (20)

Estudos anteriores indicam que a cascata inflamatória seja a chave principal no desenvolvimento do parto pré-termo(11). Nesse sentido, a principal causa, que culmina em PP, ainda é a infecção na cavidade amniótica(33,34). A infecção da cavidade amniótica é definida pela invasão microbiana juntamente com a inflamação intra-amniótica(35), na presença ou ausência de sinais clínicos de infecção(36). Tais infecções geralmente são subclínicas e podem ser causadas por espécies bacterianas de difícil cultivo(37).

Outra intercorrência gestacional que merece destaque na Clínica Obstétrica é a rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT). A rotura das membranas fetais é essencial

durante o trabalho de parto e, normalmente, procede ao início das contrações uterinas. No entanto, esse processo pode ser desencadeado antes das contrações, sendo denominado de RPM. Em idade gestacional inferior a 37 semanas, caracteriza-se a RPM-PT, intercorrência presente em até 30% das gestações pré-termo(38). Devido à associação da RPM-PT e morbidade materna e morbimortalidade perinatal(39), a RPM-PT tem sido objeto de muitos estudos epidemiológicos e clínicos, na tentativa de identificar fatores de risco. Esses fatores também são múltiplos, incluindo-se raça(40,41), fatores comportamentais (tabagismo, atividade e início da vida sexual, deficiência materna de zinco ou vitamina C)(41–45), complicações obstétricas (gemelaridade, múltiplos sangramentos vaginais durante a gestação, polidrâmnio, hipertensão e diabetes materna)(33,40,46) e infecções genitais e da cavidade amniótica(33,47), sendo essa última associada à maioria dos casos de RPM-PT (33,48,49).

A RPM-PT é uma das maiores causas de prematuridade e é a mais importante causa de morbidade e mortalidade neonatais, particularmente por estar associada ao período de latência, a infecção neonatal (50,51) e a compressão do cordão umbilical devido à redução do líquido amniótico(52). A frequência e severidade das complicações neonatais após a RPM-PT variam com a idade gestacional e estão aumentadas na presença de infecção perinatal (52,53), elevando o índice de infecção neonatal de 1 a 3% para 8 a 30% e aumentando os índices de mortalidade neonatal, independente da idade gestacional(54). A síndrome do desconforto respiratório, hemorragia intraventricular e sepse são as complicações mais graves frequentemente associadas à prematuridade (53).

### ***1.1. Estrutura das membranas corioamnióticas***

As membranas corioamnióticas formam uma estrutura de extrema importância para o desenvolvimento fetal. Dentre suas principais funções estão 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(50).

A visão tradicional é que a cavidade amniótica durante a gravidez normal seja estéril(55) apesar da grande quantidade de micro-organismos que colonizam o trato genital inferior. O estado estéril da cavidade amniótica é, presumivelmente, realizado pela participação do sistema imune, incluindo a presença e composição do muco cervical(56), componentes celulares e proteicos presentes nos tecidos gestacionais, como células inflamatórias, mediadores e antimicrobianos, além da própria estrutura física da cavidade amniótica. Nesse contexto, as membranas corioamnióticas, que constituem a bolsa das águas que abriga o feto, são tecidos de extrema importância para o desenvolvimento fetal ao proporcionarem a manutenção do volume do LA e a proteção do feto e do cordão umbilical contra compressão e traumas. Além de atuarem também como barreira física contra infecções vindas do trato genital inferior, as membranas corioamnióticas desempenham importante função secretora(54).

Durante o desenvolvimento embrionário, por volta da 17ª semana de gestação, com o aumento do tamanho do feto e consequente crescimento do saco coriônico, as vilosidades coriônicas sofrem compressão e são associadas à decídua parietal. A redução no suprimento sanguíneo das vilosidades coriônicas leva à rápida degeneração das mesmas, formando uma região relativamente avascular denominada de cório liso. Após a formação do cório liso, as vilosidades associadas à decídua basal aumentam em número e se ramificam, constituindo o cório viloso, também chamado de cório placentário ou frondoso(57).

O terceiro tecido placentário corresponde ao âmnio, que delimita a superfície interna do trofoblasto(58). Morfologicamente, possui uma porção membranosa, que se acopla ao cório liso; uma porção placentária, que recobre o cório viloso e uma porção funicular, que circunda o cordão umbilical(59).

---

O crescimento do saco coriônico é acompanhado por crescimento ainda mais rápido do saco amniótico(57). Em decorrência desse crescimento, ocorre a fusão dessas duas membranas, originando as membranas corioamnióticas(60). Essas membranas fetais são formadas pelo âmnio e cório conectados pela matriz extracelular (MEC)(61) sendo que o epitélio amniótico, camada mais superficial das membranas, está em contato direto com o líquido amniótico e macroscopicamente apresenta-se liso, translúcido e delgado. No epitélio amniótico, uma monocamada de células epiteliais colunares reveste a cavidade amniótica, e tais células apresentam conexões intercelulares especializadas em suas superfícies laterais e basais, para ligação com a membrana basal, a próxima camada do âmnio(62,63). As células epiteliais amnióticas secretam colágenos tipos III e IV e glicoproteínas que formam a membrana basal. Essas subcamadas são alicerçadas por uma camada compacta, formada por uma trama de colágeno, com densidades variadas (59), os quais são secretados por células mesenquimais e fibroblastos(64). As fibras intersticiais (colágenos tipos I e III) formam feixes paralelos que mantêm a integridade mecânica do âmnio, já os tipos V e VI formam filamentos conectivos entre o colágeno intersticial e a membrana basal epitelial(65).

A camada intermediária entre o âmnio e o cório tem aspecto histológico esponjoso e apresenta grande quantidade de glicoproteínas hidratadas, além de conter uma malha não fibrilar de colágeno tipo IV (65). Esta camada absorve estresse físico, pois permite que o âmnio deslize sobre o cório, o qual é firmemente aderido à decídua(49). O cório é mais externo e apresenta sua primeira porção composta por células reticulares e tecido conectivo coriônico, o qual é constituído por escassas fibras colágenas apoiadas em uma membrana basal(64). Sua camada celular assemelha-se a uma típica membrana epitelial, com o citotrofoblasto polarizado em direção à decídua. A camada citotrofoblástica é multicelular, podendo assim, variar em espessura(66), e o contato direto entre as células parece ser mais evidente que no âmnio(64).

---

A camada decidual é associada externamente ao corio-âmnio, deriva da decídua parietal e localiza-se internamente à parede uterina e desempenha importante papel hormonal e imunológico(67). Essa conformação final das membranas fetais, com o âmnio internamente fundido ao cório, que por sua vez, se alicerça na decídua, ocorre após três fases distintas de desenvolvimento e dois processos de fusão, os quais se acreditam acontecer por volta da 20ª semana de gestação(66).

As fibras colágenas que compõem a MEC sofrem constante remodelação ao longo da gestação para acomodar o volume e tensão crescentes, uma vez que a manutenção da integridade estrutural das membranas fetais é essencial para o sucesso gestacional. Durante as últimas oito semanas de gestação, este processo de remodelação resulta em diminuição do teor de colágeno no âmnio(50), alteração que favorece o fenômeno biológico subsequente, a rotura das membranas no momento do parto. Em mais de 90% das gestações, a rotura das membranas fetais segue o início do trabalho de parto(40), e o aumento da separação espontânea, associado à diminuição da adesão das camadas amniótica e cório-decidual, contribuem para o enfraquecimento das mesmas durante o processo de trabalho de parto(68).

Dessa forma, as membranas corioamnióticas, são de extrema importância para o desenvolvimento fetal, uma vez que protege o feto contra traumas, mantém o volume do líquido amniótico e confere proteção do cordão umbilical e do sangue fetal contra compressão, além de atuarem como barreira mecânica contra infecções vindas do trato genital inferior(50).

Além de revestir a superfície placentária e constituir o saco amniótico, as membranas corioamnióticas desempenham funções 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 micro-organismos, mas que também é requerido na ativação da resposta imune inata (8,69).

### ***1.2. Mediadores da resposta inflamatória e parto pré-termo***

Processos inflamatórios estão associados à vários mecanismos reprodutivos, incluindo ovulação, implantação e desencadeamento do parto(70). Estudos com ácido ribonucleico (RNA) celular e transcriptoma, antes e após o parto, indicaram que mediadores da resposta inflamatória estão presentes nas membranas corioamnióticas mesmo na ausência de sinais histológicos de inflamação(71), indicando que o parto espontâneo a termo é caracterizado por um perfil inflamatório na decídua, membranas corioamnióticas e na cérvix.

Com o reconhecimento do parto como um processo inflamatório, pode-se entender que estímulos patogênicos podem estimular a imunidade decidual não programada. Na vigência de infecção, ocorrem subsequentes recrutamento e ativação de leucócitos para as membranas corioamnióticas(72), resultando em amplificação da resposta inflamatória e na constatação de corioamnionite histológica, considerada importante indicador de invasão da cavidade amniótica(73).

Já é conhecido na literatura que as células que compõem as camadas teciduais das membranas corioamnióticas, assim como placenta e decídua, são importantes fontes de mediadores inflamatórios(74,75). A imunidade inata, diferentemente da imunidade adquirida, reconhece patógenos através da interação de uma variedade de perfis moleculares, como constituintes da parede celular bacteriana, RNA viral e outros. Este reconhecimento envolve moléculas de reconhecimento de padrões conhecidos como os TLRs, e cada um dos 10 tipos, já descritos na literatura (TLR1-10), são específicos para os diferentes padrões de

---

reconhecimento de patógenos (PAMPS)(76). Bactérias Gram-positivas, lipoproteínas associadas a micobactérias, peptidoglicano e ácido lipoteicóico são alguns PAMPs reconhecidos pelo TLR-2(77,78), enquanto o TLR-4 é o principal mediador da resposta inflamatória ao lipopolissacarídeo (LPS)(79). Ambos receptores são especialmente expressos pelo epitélio amniótico, células coriônicas e decíduais(69,80), constituindo a primeira linha de defesa contra infecção durante a gestação(81). Kim et al.(69) descreveram que a expressão proteica de TLR-2 e TLR-4 é significativamente maior no epitélio amniótico na presença de corioamnionite histológica, tanto em partos pré-termo quanto a termo, sugerindo 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, nesse momento tão vulnerável da gestação.

Além da ação via TLRs, acredita-se que, durante a infecção na cavidade amniótica, as próprias bactérias e seus produtos estimulem os tecidos gestacionais a produzirem citocinas pró-inflamatórias como parte da resposta do hospedeiro(1). Assim, a ativação precoce de TLRs na interface materno-fetal pode perturbar o bem estabelecido perfil anti-inflamatório necessário para a manutenção da gestação no segundo trimestre(4). A análise da produção de IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  por cultura de trofoblastos humanos, sob estimulação microbiana, revelou que as bactérias estimulam a expressão de RNAm de citocinas pró e anti-inflamatórias(82), resultando em desequilíbrio entre os dois perfis de citocinas, causado por infecção intra-amniótica, que pode potencializar a indução de parto pré-termo.

Nesse sentido, trabalhos demonstraram que as principais citocinas envolvidas no início do trabalho de parto pré-termo são IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6(83,84). Além disso, a IL-6 já foi descrita como o principal biomarcador de inflamação e como preditor de parto pré-termo(10), uma vez que níveis aumentados no líquido amniótico de gestantes no segundo trimestre são associados com maior risco (85). Adicionalmente, a identificação de IL-8 no líquido amniótico foi

---

associada à presença de rotura prematura de membranas pré-termo como ao trabalho de parto pré-termo com bolsa íntegra(86).

Em estudos animais, a administração de IL-1 ou TNF- $\alpha$  no líquido amniótico de macacos Rhesus aumentou os níveis de citocinas pró-inflamatórias(87) ou corioamnionite(88). Além disso, em camundongos a administração sistêmica de IL-1 e TNF mostrou-se suficiente para indução do parto pré-termo(89,90), o que foi evitado com a pré-administração do antagonista de IL-1R(91). Somado a isso, camundongos deficientes em IL-6 demonstraram atraso no desenvolvimento do parto pré-termo e demonstraram ser resistentes ao parto pré-termo induzido por LPS(92).

No cenário anti-inflamatório, destaca-se o papel da IL-10, citocina com função de regulação das complicações gestacionais que tem como fator causal a inflamação(93). Nesse contexto, camundongos deficientes na produção de IL-10 foram mais suscetíveis ao parto pré-termo mesmo em baixa concentração de LPS(94), uma vez que a contraregulação da ação do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1, não pode ser realizada prejudicando a modulação da resposta inflamatória(95). Adicionalmente, a IL-4 e a IL-13 tem atividade anti-inflamatória e a presença dessas citocinas juntamente com a IL-10 na cavidade amniótica já foi associada ao PP espontâneo(43), além disso, polimorfismos de nucleotídeo único na região controladora de locus para IL-4 e IL-13 foram associados com aumento de risco para PP espontâneo(96). Ainda nesse cenário, os receptores solúveis de TNF, sTNFR1 e sTNFR2, tem papel importante em minimizar os efeitos do aumento de TNF- $\alpha$ (97), e esse aumento de produção de sTNF é dependente da etnia, uma vez que membranas fetais de mulheres brancas demonstraram um aumento desses receptores como um efeito compensatório da produção de TNF- $\alpha$ , o que não foi observado em mulheres negras(98).

---

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

Embora a etiologia do parto pré-termo seja multifatorial, vários micro-organismos têm sido associados à sua patogênese, especialmente através da ascensão do trato genital inferior(70), com subsequente recrutamento neutrofilico e instalação de corioamnionite. A corioamnionite histológica é definida como inflamação das membranas corioamnióticas, e a maioria dos casos ocorrem na ausência de sinais clínicos e de sintomas de infecção, sendo que pode estar presente em mais de 20% das gestações de termo e em mais de 50% dos partos pré-termo(99–101). Em estudo do nosso grupo de pesquisa, Marconi et al.(102) 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 micro-organismos aeróbios e anaeróbios.

Kim et al.(103) propuseram um modelo de invasão microbiana intra-amniótica, no qual o estágio inicial ocorre por invasão intra-amniótica através de discreta região das membranas corioamnióticas, seguido por proliferação bacteriana no líquido amniótico e, posteriormente, a extensão dessa infecção atingiria toda superfície das membranas, iniciando-se pelo âmnio. Nesse sentido, a principal via de infecção da cavidade amniótica é através da ascensão de micro-organismos do trato genital inferior(70,104), uma vez que 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*(105,106). Quando tais micro-organismos predominam na microbiota vaginal, em relação aos lactobacilos, caracteriza-se a alteração da microbiota vaginal, denominada, vaginose bacteriana, a qual está presente de 15-42% das grávidas e aumenta em quatro vezes o risco de parto pré-termo espontâneo e de rotura prematura de membranas pré-termo(107-109).

---

A estreita relação da vaginose bacteriana e parto pré-termo(25) se justifica na capacidade que bactérias patogênicas tem em ascender à cavidade amniótica e suscitar resposta inflamatória nos tecidos gestacionais. 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 *U. urealyticum* e *M. hominis* (110). Apesar dessas evidências, alguns trabalhos não demonstraram associação significativa entre vaginose e parto pré-termo(111,112). Para esses autores, a ascensão dos micro-organismos à cavidade uterina pode ocorrer antes ou no início da gestação e no momento do trabalho de parto pré-termo não necessariamente a gestante apresente alteração da microbiota vaginal. Assim o reservatório endometrial teria um papel crucial na associação com o parto pré-termo.

Segundo revisão de Digiulio et al. (106), uma grande diversidade de espécies bacterianas pode estar presente na infecção da cavidade amniótica, sendo que nos casos de PP com bolsa íntegra ou na RPM-PT podem estar envolvidos 21 e 18 gêneros bacterianos, respectivamente. Dentre esses gêneros, os principais envolvidos tanto no PP quanto na RPM-PT são os micoplasmas genitais (*U. urealyticum*, *M. hominis* e *Mycoplasma genitalium*). Apesar disso, trabalhos têm descritos resultados controversos quanto a real contribuição dos micoplasmas genitais no resultado adverso da gestação. Hosny et al. (112) encontraram associação significativa entre o parto pré-termo e a presença de *M. hominis* no conteúdo vaginal, o que não ocorreu para *U. urealyticum*, o qual teve uma alta taxa de isolamento tanto no grupo de gestação a termo (49%) quanto pré-termo (36%). Por outro lado, trabalhos(113,114) já demonstraram associação significativa na detecção de *U. urealyticum* na cérvix/vagina e o parto pré-termo, inclusive descrevendo que a carga dessa espécie bacteriana na vagina é um fator importante para o desfecho gestacional(115). Já no líquido amniótico, a detecção de *U. urealyticum* foi associada à RPM-PT(116) e ao parto pré-termo com membranas íntegras(117,118).

---

Considerando o exposto, apesar da infecção da cavidade amniótica ser a principal causa do parto pré-termo espontâneo, existe uma complexidade dessa infecção, uma vez que não é uma entidade única e possui diversos subtipos e etiologias, comunidades bacterianas diferentes envolvidas, resposta diferente à antibióticos e resultados clínicos distintos(119). Portanto, os aspectos microbiológicos da infecção do trato genital continua por ser esclarecida e os estudo *in vitro* se tornam indispensáveis para a melhor caracterização e identificação das infecções que podem levar ao parto pré-termo.

#### ***1.4. Micoplasmas genitais e Gardnerella vaginalis***

O termo micoplasma é frequentemente utilizado para mencionar os micro-organismos da classe Mollicutes, independente do gênero a que eles pertençam. Assim, com o intuito de se evitar a confusão com os micro-organismos específicos ao gênero *Mycoplasma*, o termo Mollicutes se tornou uma denominação genérica para todos os micro-organismos da classe(120). Os membros da classe Mollicutes são caracterizados pela ausência da parede celular de peptidoglicano. Estudos filogenéticos baseados em sequências de RNA ribossômico mostraram que os Mollicutes realmente se originaram via evolução degenerativa, com perda de genes não essenciais(121,122), a partir de bactérias Gram-positivas de baixo teor de guanina e citosina e relacionados ao grupo lactobacilar (123,124).

À medida que a parede celular está ausente em Mollicutes, eles podem assumir formas cocoides ou filamentosas e são pouco coradas com a tradicional coloração de Gram, o que não permite sua identificação direta em amostras clínicas. Além disso, são resistentes a todos os tipos de antibióticos beta-lactâmicos(120), que inibem a síntese da parede celular como mecanismo de ação, como a penicilina. Devido à sua mobilidade e capacidade de adesão, *Ureaplasma* e *Mycoplasma* são os dois gêneros da família Mycoplasmataceae que podem colonizar com sucesso o trato genitourinário humano. Embora flagelos e pili estejam ausentes

---

nessas bactérias, proteínas de superfície específicas na sua membrana celular permitem a sua ligação às células do hospedeiro.

A espécie *M. hominis* foi o primeiro micoplasma humano patogênico identificado em um abscesso da glândula de Bartholin em 1937(125). Tem como característica a formação de colônias em forma de “ovo frito” com cerca de 200 µm de diâmetro(126) e utilizam a arginina como substrato no seu metabolismo(127). Já a espécie *U. urealyticum*, foi inicialmente denominado de *T-strain* ou *T-Mycoplasmas* pelo fato de produzir pequenas colônias de 7-15µm de diâmetro, após ser identificado no aparelho urogenital de homens com uretrite não gonocócica primária e recorrente(128). Pela característica única entre os micoplasmas de origem humana em utilizar como substrato a uréia e não arginina ou glicose, em 1974, foi designado como *U. urealyticum*(129). Atualmente, são reconhecidos 14 serotipos de *Ureaplasma* spp., que foram agrupados em duas espécies distintas *U. parvum*, serotipos 1, 3, 6 e 14, e *U. urealyticum* que compreende os restantes serotipos, sendo que alguns têm sido mais associados à doenças que outros(130).

A patogenicidade ureaplasma está relacionada a capacidade de adesão à superfícies mucosas, principalmente em células epiteliais, através de proteínas de citoaderência expressas na superfície celular bacteriana. A principal lipoproteína de superfície é o antígeno de múltiplas bandas (AMB), que é o principal fator de virulência desse microrganismo(131), sendo reconhecido pelo sistema imune através dos receptores de reconhecimento padrão TLR1, TLR2 e TLR6 ativando a via do fator nuclear kappa B (NF-κB)(132). Dessa forma, trabalhos sugerem que a variação no tamanho da lipoproteína AMB ureaplasma esteja relacionada à capacidade desses micro-organismos de evadir-se do sistema imune e colonizar o hospedeiro (133,134). Nesse sentido, a severidade da corioamnionite já foi inversamente associada à variação do tamanho da lipoproteína AMB identificada no líquido amniótico(134). Em estudo animal, a variação do tamanho da lipoproteína AMB não preveniu o reconhecimento pelos receptores de

---

reconhecimento padrão do hospedeiro(135), porém, essa variação pode limitar a eliminação desse microrganismo da cavidade amniótica caracterizando assim o seu fator de virulência. Além disso, já foram identificados fatores de virulência potenciais como fosfolipase A1, A2 e C (136), capazes de estimular o trabalho de parto pela produção de prostaglandinas e a protease de IgA, a qual tem a capacidade de destruir um dos principais componentes da resposta imune, facilitando a colonização por micro-organismos(137).

Adicionalmente, tanto *U. urealyticum* quanto *M. hominis* liberam, juntamente com o trifosfato de adenosina, a amônia através do metabolismo da uréia e da arginina, respectivamente. A amônia pode reagir com a água nos tecidos formando o hidróxido de amônio causando assim injúria celular e inflamação devido a mudança no pH(134). Porém, Robinson et al. (134) demonstraram apenas o dano tecidual crônico nas membranas corioamnióticas e pulmão fetal pela produção de amônia, uma vez que não associaram o pH elevado do líquido amniótico ou surfactante pulmonar fetal com a infiltração leucocitária das membranas corioamnióticas ou tecido pulmonar fetal. Além do mais, estudos *in vitro* demonstraram que *Ureaplasma* spp. é capaz de formar biofilmes, o que pode contribuir para persistência no hospedeiro(138).

Tanto *M. hominis* quanto *U. urealyticum* fazem parte do microbioma placentário compondo a microbiota comensal não-patogênica da placenta (139). Além disso, são considerados constituintes da microbiota vaginal normal de mulheres assintomáticas e sexualmente ativas, podendo ser detectados tanto na cérvix ou vagina com prevalência de 20-50% e 40-80% (140,141), respectivamente. A incidência da colonização desses microrganismos está relacionada a fatores como idade, perfil socioeconômico, raça e número de parceiros(142). Apesar da presença em indivíduos saudáveis, esses microrganismos também são detectados em pacientes com uretrite não gonocócica, infertilidade, prostatite(143), doença inflamatória pélvica (144), complicações gestacionais e neonatais.

---

A presença de *U. urealyticum* no LA de gestantes foi associada à corioamnionite e ao parto prematuro (145,146), endometrite pós-parto(147) e rotura prematura de membranas(113,145,146,148), assim como à natimortalidade (149). A taxa de transmissão vertical é de cerca de 72%(150) e está associado ao baixo peso ao nascer(128), pneumonias e doença crônica do pulmão(149), meningite(128), abscessos cerebrais(151), infecção crônica do sistema nervoso central e mortalidade por insuficiência respiratória grave (145,152).

Já a presença de *M. hominis*, no conteúdo vaginal, foi associado a RPM (153), corioamnionite(154), parto pré-termo (155) e endometrite pós-parto(156), podendo ser transmitido verticalmente em cerca de 60% dos casos (150), causando meningites(128), abscessos cerebrais(151) e conjuntivite(110).

Adicionalmente, *M. hominis* e *U. urealyticum* são constituintes do *core* patológico da vaginose bacteriana, principal alteração de microbiota vaginal, na qual o domínio por *Lactobacillus* spp. é substituído por diversas espécies bacterianas, predominantemente cocobacilar, na ausência ou com rara presença de formas lactobacilares (157). Nesse sentido, *U. urealyticum* já foi isolado variando de de 62-97% dos casos de vaginose bacteriana (144), porém sua associação com essa alteração da microbiota vaginal é menos consistente do que a de *M. hominis* (157), que além de ser frequentemente detectado em mulheres com vaginose bacteriana estão presentes em quantidades muito maiores nessa alteração da microbiota vaginal quando comparado com mulheres com microbiota normal(157).

Apesar da presença tanto de *U. urealyticum* quanto de *M. hominis* em amostras de mulheres com vaginose bacteriana, estes micro-organismos não são necessários para o desenvolvimento dessa alteração da flora vaginal, na qual o *core* patológico é caracterizado por grande diversidade de bactérias com diferentes cargas bacterianas, o que dificulta associar os sintomas e sequelas da vaginose bacteriana à uma espécie isoladamente(158).

---

Outra espécie bacteriana de grande relevância na vaginose bacteriana é *G. vaginalis* (159), pequenos bacilos pleomórficos, imóveis e sem a presença de flagelos, endoesporos ou cápsulas típicas, medindo de 2 a 3 µm de comprimento, embora não se alonguem em filamentos(160–162). Apesar da *G. vaginalis* não possuir a camada de lipopolisacarídeo clássica, a presença de lisina e não o ácido diaminopimélico como o aminoácido dibásico na parede celular confirma que a sua composição não é de bactéria gram-negativa, porém, como sua parede celular é fina pode parecer gram-negativa sob o microscópio (163).

A capacidade de adesão de *G. vaginalis* às células epiteliais urogenitais minimiza o contato dela com enzimas extracelulares potencialmente deletérias e anticorpos locais, contribuindo assim para sua colonização no trato genital inferior. Adicionalmente, *G. vaginalis* produz citolisina dependente de colesterol específica para células humanas denominada de vaginolisina, que é capaz de codificar uma toxina formadora de poros que se liga à molécula reguladora do complemento humano CD59(164), que também auxilia na aderência inicial de *G. vaginalis* às células epiteliais do hospedeiro(165). A formação de biofilme é o principal fator que permite a sobrevivência dessa bactéria na vagina (166), sendo que algumas cepas capazes de produzir sialidase aumentam essa capacidade de produção de biofilme através da atividade da mucinase(167). Apesar da comunidade lactobacilar da microbiota vaginal normal ser capaz de produzir bacteriocinas que atuam contra *G. vaginalis*, o biofilme produzido por ela é tolerante ao ácido láctico e peróxido de hidrogênio produzidos pelos lactobacilos(168–170).

De forma resumida a aderência e produção de substâncias citotóxicas contra as células do hospedeiro, juntamente com a capacidade de formação de biofilme, são os principais passos para o estabelecimento da vaginose bacteriana e nesse sentido Patterson et al. (164) demonstraram que dentre as bactérias identificadas na vaginose bacteriana, somente *G. vaginalis* demonstrou todas essas características, sugerindo que os outros organismos podem ser oportunistas relativamente avirulentos que colonizam após o início da infecção por *G.*

---

*vaginalis*, confirmando assim o papel fundamental dessa bactéria no estabelecimento da vaginose bacteriana.

### **1.5. Membranas corioamnióticas *in vitro***

Os trabalhos *in vitro* que mimetizam a infecção intra-amniótica tem se tornado importante 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, especialmente o epitélio amniótico e as células coriônicas e deciduais, respondem ao estímulo bacteriano com o aumento da produção de citocinas(21,171) e peptídeos antimicrobianos(172).

Holmlund et al.(173) descreveram que células trofoblásticas de placenta de termo estimuladas com zimozam ou LPS produziram IL-6 e IL-8, e isso foi sugerido através da ligação com TLR-2 e TLR-4, respectivamente. Zaga-Clavellina et al. (171) identificaram aumento significativo na produção de citocinas pró- e anti-inflamatória IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-10 nas membranas fetais *in vitro* na presença de *Escherichia coli*. Além de estimular a produção de mediadores inflamatórios, Szukiewicz et al.(174) observaram que a produção do antimicrobiano natural  $\beta$  defensina humana(HBD)-3 estava aumentada em células de epitélio amniótico após ativação de TLR-4 com LPS. Nesse mesmo sentido, outro estudo identificou que a estimulação das membranas corioamnióticas *in vitro* com *G. vaginalis* aumentou a produção de citocinas, IL-1 $\beta$ , IL-6 e dos peptídeos antimicrobianos HBD1, HBD2 e HBD3 (172).

Menon et al. (73) demonstraram ainda que a produção de citocinas inflamatórias e expressão de receptores Toll-like, em membranas corioamnióticas *in vitro*, dependem da espécie bacteriana envolvida na infecção. Considerando que as infecções na cavidade amniótica são caracterizadas como um cenário polibacteriano e que a resposta inflamatória difere quanto ao microrganismo envolvido na infecção, estudar diferentes combinações das principais

---

bactérias envolvidas no trabalho de parto pré-termo é uma ferramenta importante para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no desencadeamento do parto pré-termo. Porém, até o momento, os estudos realizados se basearam apenas na estimulação bacteriana individual, com exceção de um trabalho que estudou *Streptococcus agalactiae* e *E. coli* em combinação mas que não encontrou nenhuma sinergia entre as espécies na produção de mediadores inflamatórios(175).

---

*Justificativa*

---

Considerando que o parto pré-termo:

1. Apresenta-se como um problema médico, social e humano que tem elevada taxa de incidência global oscilando entre 5 – 18% e com prevalência estável ao longo de décadas;
2. Que seu entendimento etiopatogênico e fisiopatológico ainda não se encontra totalmente esclarecido e que múltiplos mecanismos estão implicados na sua gênese;
3. Que, entre esses mecanismos, os processos inflamatórios dos tecidos gestacionais estão possivelmente implicados nos resultados perinatais adversos;

Propusemos avaliar em modelos *in vitro* de infecção das membranas corioamnióticas as relações entre o *status* microbiológico e a modulação da resposta imune inata na interface materno-fetal, com espécies bacterianas de difícil cultivo detectadas no trato genital inferior de gestantes em trabalho de parto pré-termo.

---

## *Objetivos*

---

### **3. Objetivo Geral**

O objetivo do estudo foi determinar, em modelos *in vitro* de infecção das membranas corioamnióticas com espécies bacterianas de difícil cultivo detectadas no trato genital inferior de gestantes em parto pré-termo, as relações entre o *status* microbiológico e a modulação da resposta imune na interface materno-fetal.

#### **3.1. Objetivos Específicos**

✓ Desafiar membranas corioamnióticas obtidas de gestações de termo com as cepas padrão usando os ATCCs (American Type Culture Collection) das espécies bacterianas de difícil cultivo mais frequentemente associadas ao parto pré-termo (*M. hominis* e *U. urealitycum*) juntamente com a principal espécie (*G. vaginalis*) do *core* patológico da vaginose bacteriana em diferentes concentrações, e avaliar a expressão proteica das seguintes citocinas/quimiocinas (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-13, GM-CSF) e receptores solúveis (sIL-1R sIL-1R, sIL-1R2, sTNFR-1, sTNFR-2).

✓ Desafiar membranas corioamnióticas obtidas de gestações de termo com os ATCCs (American Type Culture Collection) das espécies bacterianas de difícil cultivo mais frequentemente associadas ao parto pré-termo (*M. hominis* e *U. urealitycum*) juntamente com a principal espécie (*G. vaginalis*) do *core* patológico da vaginose bacteriana em diferentes concentrações, e avaliar a bioatividade da IL-6 e seus receptores de membrana (IL-6R e gp130) e solúvel (sIL-6R e sgp130).

---

## *Referências Bibliográficas*

---

1. Peltier MR. Immunology of term and preterm labor. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1(122):1–11.
  2. Orsi NM. Cytokine networks in the establishment and maintenance of pregnancy. *Hum Fertil (Camb)*. 2008;11(4):222–30.
  3. Raghupathy R. Maternal anti-placental cell-mediated reactivity and spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol*. 1997;37(6):478–84.
  4. 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(7):353–6.
  5. Chaouat G. The Th1/Th2 paradigm: Still important in pregnancy? *Semin Immunopathol*. 2007;29(2):95–113.
  6. Denney JM, Nelson EL, Wadhwa PD, Waters TP, Mathew L, Chung EK, et al. Longitudinal Modulation of Immune System Cytokine Profile During Pregnancy. *Cytokine*. 2011;53(2):170–7.
  7. 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(1):55–60.
  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(1):47–54.
  9. Von Dadelszen P, Watson RW, Noorwali F, Marshall JC, Parodo J, Farine D, et al. Maternal neutrophil apoptosis in normal pregnancy, preeclampsia, and normotensive intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;181(2):408–14.
  10. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2006;113(SUPPL. 3):17–42.
  11. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci*. 2009;16(2):206–15.
  12. Vora S, Abbas A, Kim CJ, Summerfield TL, Kusanovic JP, Iams JD, et al. Nuclear factor-kappa B localization and function within intrauterine tissues from term and preterm labor and cultured fetal membranes. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8(8):1–12.
  13. Behrman RE, Butler AS. Preterm Birth: Causes, Consequences, and Prevention. *Preterm birth: causes, consequences and prevention*. 2007. 790 p.
  14. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008;371(9606):75–84.
  15. 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 An Int J Obstet Gynaecol*. 2007;114(6):731–5.
-

16. McPheeters ML, Miller WC, Hartmann KE, Savitz D a., Kaufman JS, Garrett JM, et al. The epidemiology of threatened preterm labor: A prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192(4):1325–30.
  17. Jacinto SOS, Pamplona K, Soares M. *Manual Técnico de Gestação de Alto Risco - 2012* . Editora Ms. 2012. 302p p.
  18. MacDorman MF, Minino AM, Strobino DM, Guyer B. Annual Summary of Vital Statistics - 2001. *Pediatrics.* 2017;140(1):1037–52.
  19. McCormick MC. The contributions of low birth weight to infant mortality and childhood mortality. *N Engl J Med.* 1985;312(2):82–90.
  20. Menon R, Nicolau NN, Bredson S, Poletini J. Fetal membranes: Potential source of preterm birth biomarkers. *General Methods in Biomarker Research and their Applications.* 2015. 483-529 p.
  21. Lo C, Hsu J, Hsieh C, Hsieh T, Hung T. Risk factors for spontaneous preterm delivery before 34 weeks of gestation among taiwanese women. *Taiwan J Obs Gynecol.* 2007;46(4):389–94.
  22. Slattery MM, Geary M, Morrison JJ. Obstetric antecedents for preterm delivery. *J Perinat Med.* 2008;36:306–9.
  23. Park JH, Lee BE, Park HS, Ha EH, Lee SW, Kim YJ. Association between pre-pregnancy body mass index and socioeconomic status and impact on pregnancy outcomes in Korea. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011;37(2):138–45.
  24. Jensen D, Damm P, Moelsted-Pedersen L, Ovesen P, Westergaard J, Moeller M, et al. Outcomes in Type 1 Diabetic Pregnancies. *Diabetes Care.* 2004;27(12):2819–23.
  25. Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, Reybrouck R, Van Den Bosch T, Riphagen I, et al. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2009;116:1315–24.
  26. Mazor M, Chaim W, Horowitz S, Romero R, Glezerman M. The biomolecular mechanisms of preterm labor in women with intrauterine infection. *Isr J Med Sci.* 1994;30(5-6):317–22.
  27. Park J, Park C, Lockwood C, Norwitz E. Role of cytokines in preterm labor and birth. *Minerva Ginecol.* 2005;57(4):349–66.
  28. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2006;113(3):17–42.
  29. Villar J, Papageorgiou AT, Knight HE, Gravett MG, Iams J, Waller S a., et al. The preterm birth syndrome: A prototype phenotypic classification. *Am J Obstet Gynecol.* Elsevier Inc.; 2012;206(2):119–23.
  30. Goldenberg R, Andrews W, Hauth J. Choriodecidual infection and preterm birth. *Nutr Rev.* 2002;60(5 Pt 2):S19–25.
-

31. Goldenberg RL, Gravett MG, Iams J, Papageorghiou AT, Waller S a., Kramer M, et al. The preterm birth syndrome: Issues to consider in creating a classification system. *Am J Obstet Gynecol.* Elsevier Inc.; 2012;206(2):113–8.
  32. Menon R, Fortunato SJ. Infection and the role of inflammation in preterm premature rupture of the membranes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2007;21(3):467–78.
  33. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine Infection and Preterm Delivery. *N Engl J Med.* 2000;342(20):1500–7.
  34. Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002;8(1):3–13.
  35. Myntti T, Rahkonen L, Nupponen I, Pätäri-Sampo A, Tikkanen M, Sorsa T, et al. Amniotic Fluid Infection in Preterm Pregnancies with Intact Membranes. *Dis Markers.* Hindawi Publishing Corporation; 2017;2017:8167276.
  36. Romero R, Sirtori M, Oyarzun E, Avila C, Mazor M, Callahan R, et al. Infection and labor. V. Prevalence, microbiology, and clinical significance of intraamniotic infection in women with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1989 Sep;161(3):817–24.
  37. Andrews WW, Hauth JC, Goldenberg RL. Infection and preterm birth. *Am J Perinatol.* 2000;17(7):357–65.
  38. Mercer BM. Preterm Premature Rupture of the Membranes. *Am Coll Obstet Gynecol.* 2003;101(1):178–93.
  39. ACOG Practice Bulletin No. 80: premature rupture of membranes. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. ACOG Committee on Practice Bulletins-Obstetrics. *Obs Gynecol.* 2007;109:1007–19.
  40. Lee T, Silver H. Etiology and epidemiology of preterm premature rupture of the membranes. *Clin Perinatol.* 2001;28(4):721–34.
  41. Savitz D, Blackmore C, Thorp J. Epidemiologic characteristics of preterm delivery: etiologic heterogeneity. *Am J Obs Gynecol.* 1991;164(2):467–71.
  42. Silverman RK, Wojtowycz M. Risk factors in premature rupture of membranes. *Prim Care Update Ob Gyns.* 1998;5(4):181.
  43. Simhan HN, Bodnar LM, Kim KH. Lower genital tract inflammatory milieu and the risk of subsequent preterm birth: an exploratory factor analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2011;25(3):277–82.
  44. Casanueva E, Ripoll C, Meza-Camacho C, Coutiño B, Ramírez-Peredo J, Parra a. Possible interplay between vitamin C deficiency and prolactin in pregnant women with premature rupture of membranes: Facts and hypothesis. *Med Hypotheses.* 2005;64(2):241–7.
  45. Kyrklund-Blomberg NB, Granath F, Cnattingius S. Maternal smoking and causes of very preterm birth. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005;84(6):572–7.
-

46. Yang J, Hartmann K, Savitz D, Herring A, Dole N, Olshan A, et al. Vaginal bleeding during pregnancy and preterm birth. *Am J Epidemiol.* 2004;160(2):118–25.
  47. Aagaard-Tillery K, Nuthalapaty F, Ramsey P, Ramin K. Preterm premature rupture of membranes: perspectives surrounding controversies in management. *Am J Perinatol.* 2005;22(6):287–97.
  48. Gomez R, Romero R, Edwin S, David C. Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. *Infect Dis Clin North Am.* 1997;11(1):135–76.
  49. Menon R, Fortunato S. Fetal membrane inflammatory cytokines: a switching mechanism between the preterm premature rupture of the membranes and preterm labor pathways. *J Perinat Med.* 2004;32(5):391–9.
  50. Parry S, Strauss JF. Premature Rupture of the Fetal Membranes. *N Engl J Med.* 1998;338(10):663–70.
  51. Corchia C, Ferrante P, Da Fre M, Di Lallo D, Gagliardi L, Carnielli V, et al. Cause-specific mortality of very preterm infants and antenatal events. *J Pediatr.* 2013;162(6).
  52. Storness-Bliss C, Metcalfe A, Simrose R, Wilson R, SL C. Correlation of residual amniotic fluid and perinatal outcomes in periviable preterm premature rupture of membranes. *J Obs Gynaecol Can.* 2012;34(2):154–8.
  53. Goldenberg R. The management of preterm labor. *Obs Gynecol.* 2002;100(5):1020–37.
  54. Romero R, Erez O, Espinoza J. Intrauterine infection, preterm labor, and cytokines. *J Soc Gynecol Investig.* 2005;12(7):463–5.
  55. Romero R, Gotsch F, Pineles B, Kusanovic J. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. *Nutr Rev.* 2007;65(12):S194–202.
  56. Hein M, Valore E V., Helmig RB, Uldbjerg N, Ganz T. Antimicrobial factors in the cervical mucus plug. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187(1):137–44.
  57. Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia clínica.* 8th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
  58. Benirschke K, Pekarske S. Placental pathology casebook. Extensive calcification of the umbilical cord and placenta. *J Perinatol.* 1995;15:81–3.
  59. Rezende J. *Obstetrícia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
  60. Chua WK, Oyen ML. Do we know the strength of the chorioamnion? A critical review and analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009;144(SUPPL 1):128–33.
  61. Hay ED. Extracellular matrix. *J Cell Biol.* 1981;9:205s – 223s.
  62. Sánchez RV, Castrejón MC, Orozco YH, López NG, Montoya JB, Ortega FV. Análisis tridimensional de la estructura de las membranas corioamnióticas humanas al término de la gestación. *Ginecol Obstet Mex.* 2008;76(1):38–44.
-

63. McParland P, Bell S. The fetal membranes and mechanisms underlying their labour-associated and pre-labour rupture during pregnancy. *Fetal Matern Med Rev.* 2004;15:73–108.
  64. Casey M, MacDonald P. Interstitial collagen synthesis and processing in human amnion: a property of the mesenchymal cells. *Biol Reprod.* 1996;55(6):1253–60.
  65. Malak T, Ockleford C, Bell S, Dalgleish R, Bright N, Macvicar J. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta.* 1993;14(4):385–406.
  66. Oyen M, Stylianopoulos T, Barocas V, Calvin S, Cook R. Uniaxial and biaxial mechanical behavior of human amnion. *J Mater Res.* 2005;20:2902–9.
  67. 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.
  68. Strohl A, Kumar D, Novince R, Shaniuk P, Bryant K, Moore RM, et al. Decreased Adherence and Spontaneous Separation of Fetal Membrane Layers--Amnion and Chorion--a Possible Part of the Normal Weakening Process. *Placenta.* 2010;31(1):18–24.
  69. Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, Kim GJ, Kim MR, Kuivaniemi H, 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(4):1346–55.
  70. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel L a., Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006;11(5):317–26.
  71. Haddad R, Gould BR, Romero R, Tromp G, Farookhi R, Edwin SS, 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(3):822–8.
  72. 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(3):803–8.
  73. 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(3):306.e1–306.e6.
  74. 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.
  75. Osman I, Young A, Ledingham M, Thomson A, Jordan F, Greer I, et al. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod.* 2003;9(1):41–5.
-

76. Bauer S, Müller T, Hamm S. Pattern recognition by Toll-like receptors. *Adv Exp Med Biol.* 2009;653:15–34.
  77. Patni S, Flynn P, Wynen LP, Seager a. L, Morgan G, White JO, et al. An introduction to Toll-like receptors and their possible role in the initiation of labour. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2007;114(11):1326–34.
  78. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 2006;124(4):783–801.
  79. Wright SD, Ramos R a, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC, Wright SD, et al. CD14 , a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide ( LPS ) and LPS Binding Protein. *Science.* 1990;249(4975):1431–3.
  80. Leroy M-J, Dallot E, Czerkiewicz I, Schmitz T, Breuiller-Fouché M. Inflammation of choriodecidual induces tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of human myometrial cells. *Biol Reprod.* 2007;76(5):769–76.
  81. Janeway CJ, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197–216.
  82. 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(6):334–40.
  83. Tanaka Y, Narahara H, Takai N, Yoshimatsu J, Anal T, Miyakawa I. Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-8 in cervicovaginal fluid during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179(3 I):644–9.
  84. Jun JK, Yoon BH, Romero R, Kim M, Moon J Bin, Ki SH, et al. Interleukin 6 determinations in cervical fluid have diagnostic and prognostic value in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183(4):868–73.
  85. Goepfert AR, Goldenberg RL, Andrews WW, Hauth JC, Mercer B, Iams J, et al. The preterm prediction study: Association between cervical interleukin 6 concentration and spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184(3):483–8.
  86. 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(3-4):154–60.
  87. Sadowsky DW, Adams KM, Gravett MG, Witkin SS, Novy MJ. Preterm labor is induced by intraamniotic infusions of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  but not by interleukin-6 or interleukin-8 in a nonhuman primate model. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195(6):1578–89.
  88. Presicce P, Senthamaikannan P, Alvarez M, Rueda CM, Cappelletti M, Miller L a, et al. Neutrophil recruitment and activation in decidua with intra-amniotic IL-1beta in the preterm rhesus macaque. *Biol Reprod.* 2015;92(2):56.
  89. Romero R, Mazor M, Tartakovsky B. Systemic administration of interleukin-1 induces preterm parturition in mice. *Am J Obs Gynecol.* 1991;165(4 Pt 1):969–71.
-

90. Silver RM, Lohner WS, Daynes R a, Mitchell MD, Branch DW. Lipopolysaccharide-induced fetal death: the role of tumor-necrosis factor alpha. *Biol Reprod.* 1994;50(5):1108–12.
  91. Romero R, Tartakovsky B. The natural interleukin-1 receptor antagonist prevents interleukin-1-induced preterm delivery in mice. *Am J Obs Gynecol.* 1992;164(4 Pt 1):1041–5.
  92. Robertson S a., Christiaens I, Dorian CL, Zaragoza DB, Care AS, Banks AM, et al. Interleukin-6 is an essential determinant of on-time parturition in the mouse. *Endocrinology.* 2010;151(8):3996–4006.
  93. Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, et al. Gestational Age-Dependent Expression of IL-10 and Its Receptor in Human Placental Tissues and Isolated Cytotrophoblasts. *J Immunol.* 2000;164(11):5721–8.
  94. Robertson S a, Skinner RJ, Care AS. Essential role for IL-10 in resistance to lipopolysaccharide-induced preterm labor in mice. *J Immunol.* 2006;177(7):4888–96.
  95. Fiorentino D, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann T, Howard M, Moore K, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol.* 1991;146(10):3444–51.
  96. Harmon QE, Engel SM, Olshan AF, Moran T, Stuebe AM, Luo J, et al. Association of polymorphisms in natural killer cell-related genes with Preterm Birth. *Am J Epidemiol.* 2013;178(8):1208–18.
  97. Maymon E, Ghezzi F, Edwin SS, Mazor M, Bo Hyun Yoon, Gomez R, et al. The tumor necrosis factor  $\alpha$  and its soluble receptor profile in term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;181(5 I):1142–8.
  98. Fortunato SJ, Lombardi SJ, Menon R. Racial disparity in membrane response to infectious stimuli: A possible explanation for observed differences in the incidence of prematurity: Community Award Paper. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190(6):1557–63.
  99. Poletini J, Peraçoli JC, Candeias JMG, 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(1):27–31.
  100. Edwards RK. Chorioamnionitis and labor. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2005;32(2):287–96.
  101. Silva M, Peraçoli J, Sadatsune T, Abreu E, Peraçoli M. Cervical Lactobacillus and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynaecol Obs.* 2003;81(2):175–82.
  102. Marconi C, De Andrade Ramos BR, Peraçoli JC, Donders GGG, 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(6):549–56.
-

103. Kim MJ, Romero R, Gervasi MT, Kim J, Yoo W, Lee D, et al. Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection. *Lab Invest.* 2009;89(8):924–36.
  104. Helmo FR, Alves EAR, Moreira RADA, Severino VO, Rocha LP, Monteiro MLGDR, et al. Intrauterine infection, immune system and premature birth. *J Matern Neonatal Med.* 2017;0(0):1–7.
  105. Sherman D, Tovbin J, Lazarovich T, Avrech O, Reif R, Hoffmann S, et al. Chorioamnionitis caused by gram-negative bacteria as an etiologic factor in preterm birth. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1997;16(6):417–23.
  106. DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2012;17(1):2–11.
  107. Nadeau HCG, Subramaniam A, Andrews WW. Infection and preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med.* Elsevier Ltd; 2016;21(2):100–5.
  108. Goldenberg RL, Andrews WW, Goepfert AR, Faye-Petersen O, Cliver SP, Carlo WA, et al. The Alabama Preterm Birth Study: umbilical cord blood *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* cultures in very preterm newborn infants. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198(1):43.e1–5.
  109. Hendler I, Andrews WW, Carey CJ, Klebanoff M a., Noble WD, Sibai BM, et al. The relationship between resolution of asymptomatic bacterial vaginosis and spontaneous preterm birth in fetal fibronectin-positive women. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197(5):488.e2–5.
  110. Perni SC, Vardhana S, Korneeva I, Tuttle SL, Paraskevas L-R, 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(4):1382–6.
  111. Discacciati MG, Simoes J a., Silva MG, Marconi C, Brolazo E, Costa ML, et al. Microbiological characteristics and inflammatory cytokines associated with preterm labor. *Arch Gynecol Obstet.* 2011;283(3):501–8.
  112. Hosny AEDMS, El-khayat W, Kashef MT, Fakhry MN. Association between preterm labor and genitourinary tract infections caused by *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, Gram-negative bacilli, and coryneforms. *J Chinese Med Assoc.* 2016;1–7.
  113. Mitsunari M, Yoshida S, Deura I, Horie S, Tsukihara S, Harada T, et al. Cervical *Ureaplasma urealyticum* colonization might be associated with increased incidence of preterm delivery in pregnant women without prophlogistic microorganisms on routine examination. *J Obstet Gynaecol Res.* 2005;31(1):16–21.
  114. Harada K, Tanaka H, Komori S, Tsuji Y, Nagata K, Tsutsui H, et al. Vaginal infection with *Ureaplasma urealyticum* accounts for preterm delivery via induction of inflammatory responses. *Microbiol Immunol.* 2008;52(6):297–304.
-

115. 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(11):973–8.
  116. 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 the membranes and subsequent cesarean delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193(5):1663–9.
  117. Yoon BH, Chang JW, Romero R. Isolation of *Ureaplasma urealyticum* from the amniotic cavity and adverse outcome in preterm labor. *Obstet Gynecol.* 1998;92(1):77–82.
  118. 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(3):518–21.
  119. Yeh C-C, Chen C, Wang P. Infection and preterm birth. *J Chin Med Assoc [Internet]. Elsevier Ltd;* 2017;S1726-4901(17):30038–42.
  120. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(4):1094–156.
  121. Glass JI, Lefkowitz EJ, Glass JS, Heiner CR, Chen EY, Cassell GH. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature.* 2000;407(6805):757–62.
  122. Dybvig K, Voelker LL. Molecular Biology of Mycoplasmas. *Annu Rev Microbiol.* 1996;50:25–57.
  123. Woese CR, Maniloff J, Zablen LB. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(1):494–8.
  124. Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, Petzel JP, Oyaizu H, Yang D, et al. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J Bacteriol.* 1989;171(12):6455–67.
  125. Dienes L, Edsall G. Observations on the L-organism of Klieneberger. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1937;36:740–4.
  126. Taylor-Robinson D, Furr PM. Recovery and identification of human genital tract mycoplasmas. *Isr J Med Sci.* 1981;17(7):648–53.
  127. Edward DG. A suggested classification and nomenclature for organisms of the pleuropneumonia group. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1955;5:85–93.
  128. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):757–89.
  129. Shepard MC, Lunceford CD. Occurrence of urease in T strains of *Mycoplasma*. *J Bacteriol.* 1967;93(5):1513–20.
-

130. 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 Pt 5:1921–9.
  131. 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(3):891–8.
  132. Shimizu T, Kida Y, Kuwano K. *Ureaplasma parvum* lipoproteins, including MB antigen, activate NF- $\kappa$ B through TLR1, TLR2 and TLR6. *Microbiology*. 2008;154(Pt 5):1318–25.
  133. Knox CL, Dando SJ, Nitsos I, Kallapur SG, Jobe AH, Payton D, et al. The severity of chorioamnionitis in pregnant sheep is associated with in vivo variation of the surface-exposed multiple-banded antigen/gene of *Ureaplasma parvum*. *Biol Reprod*. 2010;83(3):415–26.
  134. Robinson JW, Dando SJ, Nitsos I, Newnham J, Polglase GR, Kallapur SG, et al. *Ureaplasma parvum* serovar 3 multiple banded antigen size variation after chronic intra-amniotic infection/colonization. *PLoS One*. 2013;8(4):e62746.
  135. Dando SJ, Nitsos I, Kallapur SG, Newnham JP, Polglase GR, Pillow JJ, et al. The role of the multiple banded antigen of *Ureaplasma parvum* in intra-amniotic infection: Major virulence factor or decoy? *PLoS One*. 2012;7(1):e29856.
  136. DeSilva NS, Quinn PA. Characterization of phospholipase A1, A2, C activity in *Ureaplasma urealyticum* membranes. *Mol Cell Biochem*. 1999;201(1-2):159–67.
  137. Kilian M, Brown MB, Brown TA, Freundt EA, Cassell GH. Immunoglobulin A1 protease activity in strains of *Ureaplasma urealyticum*. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B*. 1984;92(1):61–4.
  138. 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 J*. 2013;32(4):394–8.
  139. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* . 2014;6(237):237ra65.
  140. Cassell GH, Waites KB, Watson HL, Crouse DT, Harasawa R. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. *Clin Microbiol Rev*. 1993;6(1):69–87.
  141. Taylor-Robinson D, Jensen J. Atlas of sexually transmitted diseases and AIDS. 2010. 64-71 p.
  142. Capoccia R, Greub G, Baud D. *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and adverse pregnancy outcomes. *Curr Opin Infect Dis*. 2013;26:231–40.
  143. Chang-tai Z, Zhong-yi H, Chun-lei D, Chang-song Z, Mei-zhen W, Yang L. Investigation of *Ureaplasma urealyticum* biovars and their relationship with antimicrobial resistance. *Indian J Med Microbiol*. 2011;29(3):288–92.
-

144. Taylor-Robinson D. Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: an update. *Clin Infect Dis*. 1996;23(4):671–4.
  145. Yoon BH, Romero R, Lim J-H, Shim S-S, Hong J-S, Shim J-Y, 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(4):919–24.
  146. Aaltonen R, Jalava J, Laurikainen E, Karkkainen 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.
  147. Chaim W, Horowitz S, David JB, Ingel F, Evinson B, Mazor M. *Ureaplasma urealyticum* in the development of postpartum endometritis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003;109(2):145–8.
  148. 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(3):518–21.
  149. Kotecha S, Hodge R, Schaber JA, Miralles R, Silverman M, Grant WD. Pulmonary *Ureaplasma urealyticum* is associated with the development of acute lung inflammation and chronic lung disease in preterm infants. *Pediatr Res*. 2004;55(1):61–8.
  150. Sobouti B, Fallah S, Mobayen M, Noorbakhsh S, Ghavami Y. Colonization of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women and their transmission to offspring. *Iran J Microbiol*. 2014;6(4):219–24.
  151. Rao RP, Ghanayem NS, Kaufman BA, Kehl KS, Gregg DC, Chusid MJ. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* species brain abscess in a neonate. *Pediatr Infect Dis J*. 2002;21(11):1083–5.
  152. Aujard Y, Maury L, Doit C, Mariani-Kurkdjian P, Baud O, Farnoux C, et al. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections in newborns: personal data and review of the literature. *Arch Pediatr*. 2005;12 Suppl 1:S12–8.
  153. Kacerovský M, Pavlovský M, Tosner J. Preterm premature rupture of the membranes and genital mycoplasmas. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2009;52(3):117–20.
  154. 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(3):253–7.
  155. Odendaal HJ, Popov I, Schoeman J, Grove D. Preterm labour--is *Mycoplasma hominis* involved? *S Afr Med J*. 2002;92(3):235–7.
  156. Jacqui P, Sedallian A. Role of mycoplasmas in the last month of pregnancy and postpartum pathology. Prospective study of 577 pregnancies. *Rev Fr Gynecol Obstet*. 1992;87(3):135–44.
  157. 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(2):120–6.
-

158. Taylor-Robinson D. Mollicutes in vaginal microbiology: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma genitalium*. *Res Microbiol*. Elsevier Masson SAS; 2017;3–9.
  159. Srinivasan S, Hoffman NG, Morgan MT, Matsen F a., Fiedler TL, Hall RW, et al. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: High resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS One*. 2012;7(6):e37818.
  160. Greenwood JR, Pickett MJ. Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a. *Int J Syst Bacteriol*. 1980;30(1):170–8.
  161. Piot P. *Gardnerella*, *Streptobacillus*, *Spirillum*, and *Calymmatobacterium*. *manual of clinical microbiology*. 1991. p. 483–7.
  162. Taylor-Robinson D. The bacteriology of *Gardnerella vaginalis*. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. 1984;86:41–55.
  163. Harper JJ, Davis GHG. Cell Wall Analysis of *Gardnerella vaginalis* (*Haemophilus vaginalis*). *Int J Syst Bacteriol*. 1982;32(1):48–50.
  164. Patterson JL, Stull-Lane A, Girerd PH, Jefferson KK. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology*. 2010;156:392–9.
  165. Gelber SE, Aguilar JL, Lewis KLT, Ratner AJ. Functional and phylogenetic characterization of vaginolysin, the human-specific cytolysin from *Gardnerella vaginalis*. *J Bacteriol*. 2008;190(11):3896–903.
  166. Costerton J, Cheng K, Geesey G, Ladd T, Nickel J, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*. 1987;41:435–64.
  167. Lopes Dos Santos Santiago G, Deschaght P, El Aila N, Kiama TN, Verstraelen H, Jefferson KK, et al. *Gardnerella vaginalis* comprises three distinct genotypes of which only two produce sialidase. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;204(5):450.e1–450.e7.
  168. Patterson J, Girerd P, Karjane N, Jefferson K. Effect of biofilm phenotype on resistance of *Gardnerella vaginalis* to hydrogen peroxide and lactic acid. *Am J Obs Gynecol*. 2007;197:170 e1–7.
  169. Teixeira GS, Soares-Brandão KKL, Branco KMGR, Sampaio JLM, Nardi RMD, Mendonça M, et al. Antagonism and synergism in *Gardnerella vaginalis* strains isolated from women with bacterial vaginosis. *J Med Microbiol*. 2010;59(8):891–7.
  170. Nagy E, Petterson M, Mårdh P. Antibiosis between bacteria isolated from the vagina of women with and without signs of bacterial vaginosis. *APMIS*. 1991;99(8):739–44.
  171. Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera H, Espejel-Nuñez A, Flores-Pliego A, Soriano-Becerril D, et al. In vitro secretion profiles of interleukin (IL)-1 $\beta$ , 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.
-

172. Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Espinosa P. Evidence of in vitro differential secretion of human beta-defensins-1, -2, and -3 after selective exposure to *Streptococcus agalactiae* in human fetal membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25(4):358–63.
  173. Holmlund U, Cebers G, Dahlfors AR, Sandstedt B, Bremme K, Ekström ES, et al. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. *Immunology.* 2002;107(1):145–51.
  174. Szukiewicz D, Szewczyk G, Pyzlak M, Klimkiewicz J, Maslinska D. Increased production of beta-defensin 3 (hBD-3) by human amniotic epithelial cells (HAEC) after activation of toll-like receptor 4 in chorioamnionitis. *Inflamm Res.* 2008;57 Suppl 1:S67–8.
  175. Flores-Herrera H, García-López G, Díaz NF, Molina-Hernández a., Osorio-Caballero M, Soriano-Becerril D, et al. An experimental mixed bacterial infection induced differential secretion of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) and proMMP-9 in human fetal membranes. *Placenta.* 2012;33(4):271–7.
-

## *Capítulo II*

---

# *Artigo Científico I*

Artigo publicado no *American Journal of Reproductive Immunology* (fator de impacto 3.013)

---

# Combinations and loads of bacteria affect the cytokine production by fetal membranes: An in vitro study

Nathalia Mayumi Noda-Nicolau<sup>1,2</sup> | Jossimara Polettini<sup>1,2</sup> | Morgan R. Peltier<sup>3,4</sup> |  
Márcia Guimarães da Silva<sup>2</sup> | Ramkumar Menon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Maternal-Fetal Medicine & Perinatal Research, Department of Obstetrics & Gynecology, The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, TX, USA

<sup>2</sup>Department of Pathology, Botucatu Medical School, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil

<sup>3</sup>Department of Obstetrics & Gynecology, Winthrop University Hospital, Mineola, NY, USA

<sup>4</sup>Department of Biomedical Research, Winthrop University Hospital, Mineola, NY, USA

## Correspondence

Ramkumar Menon, Division of Maternal-Fetal Medicine & Perinatal Research, Department of Obstetrics & Gynecology, The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, TX, USA.  
Email: ram.menon@utmb.edu

## Funding information

Department of Ob/Gyn at The University of Texas Medical Branch at Galveston (UTMB); São Paulo Research Foundation; FAPESP, Grant/Award Number: Grant 2012/17234-1; Department of Pathology, Botucatu Medical School, Univ. Estadual Paulista (UNESP); Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel; CAPES, Grant/Award Number: BEX 3511/13-8

**Problem:** The polybacterial invasion and inflammation of the amniotic cavity is a common scenario in PTB, and then, we analyzed the cytokine production by human fetal membranes to better understand the host response to polybacterial infections.

**Method of study:** Fetal membranes were treated by heat-inactivated genital mycoplasmas and *Gardnerella vaginalis* at 10<sup>3</sup> or 10<sup>6</sup> colony/color-forming units/mL alone or in combination. Cytokines/receptors were measured in the medium by immunoassays.

**Results:** Stimulation of genital mycoplasmas did not increase the proinflammatory cytokines, except *Ureaplasma urealyticum* that increased IL-8 levels. However, *U. urealyticum* and *Mycoplasma hominis* significantly increased IL-10 and IL-13 levels. *G. vaginalis* alone or in combination with genital mycoplasmas showed an increased proinflammatory and anti-inflammatory cytokines.

**Conclusions:** *G. vaginalis* sustain a proinflammatory response in the fetal membranes in vitro, while genital mycoplasmas induce a strong control of the inflammatory response. The ability of genital mycoplasmas to control the proinflammatory response may favor their survival in the upper genital tract.

## KEYWORDS

*Gardnerella vaginalis*, genital mycoplasmas, polybacterial infection

## 1 | INTRODUCTION

Preterm labor (PTL) is a multifactorial obstetric complication that occurs in approximately 9.6% of all pregnancies.<sup>1–4</sup> PTL presents a complex etiology, however, and microbial invasion, infection, and inflammation are the most common factors associated with those ending in spontaneous preterm birth (PTB). Preterm premature rupture of the membranes (pPROM) often precedes PTB, in which rate of infection is often as high as 70%.<sup>5</sup> Several microorganisms, particularly those ascending from the lower genital tract, have been associated with physiopathology of the

maternal–fetal interface through the activation of host inflammatory response.<sup>6</sup> It is widely accepted that this scenario is polybacterial and comprises at least six phylum-level distributions of the bacterial taxa in amniotic fluid.<sup>7</sup> Additionally, 21 genus-level classifications of bacteria were reported in PTB with intact membranes, and 18 were detected in cases of pPROM.<sup>7</sup> Despite the wide variety, the bacteria most frequently detected in the amniotic fluid in both PTB with intact membranes and pPROM is *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*.<sup>7</sup>

The prevalence of *U. urealyticum* and *M. hominis* varies widely and is dependent primarily on demographic characteristics such as

geographical location, socioeconomic status, and number of sexual partners and secondarily on the type of study such as study design, sampling site, and diagnostic method.<sup>8</sup> Accordingly, the presence of *U. urealyticum* in amniotic fluid can vary from 3.3% to 63.0%, whereas in vaginal fluid, the rate varies from 3.7% to 89.7%.<sup>8</sup> Regarding *M. hominis*, the prevalence is from 1.4% to 35.5% in amniotic fluid and 2.5% to 55.0% in vaginal fluid.<sup>8</sup> According to recent reports, *U. urealyticum* alone has been associated with PTL and pPROM in vaginal samples,<sup>9,10</sup> amniotic fluid,<sup>11,12</sup> and cervical fluid,<sup>13</sup> while *M. hominis* alone was associated with PTL in vaginal<sup>14</sup> and amniotic fluid<sup>15</sup> and with pPROM in vaginal samples only.<sup>10</sup> Although *U. urealyticum* more prevalent in pPROM compared to *M. hominis*,<sup>10,15</sup> the co-occurrence of these bacteria in vaginal fluid leads to more severe adverse pregnancy outcomes compared to the presence of *U. urealyticum* alone.<sup>16,17</sup> However, adverse pregnancy outcome and its association with genital mycoplasmas are not always consistent. Lamont et al.<sup>18</sup> did not show statistical significance with the presence of *M. hominis* and PTL in the vaginal samples by culture methods, whereas Harada et al.<sup>14</sup> demonstrated significant association of PTL and *M. hominis* using the same methodology and type of samples.

Therefore, the real contribution of the genital mycoplasmas amniotic cavity infection in pathogenesis of PTB and pPROM is still obscure. The polybacterial invasion and inflammation of the amniotic cavity (PIAC) is a common scenario in PTB, once genital mycoplasmas are not always alone in the intraamniotic cavity, and other pathogens can be isolated along with them in PTL and pPROM.<sup>7,19</sup> The intraamniotic presence of various combinations of bacteria, their load, and antigenicity may modify the effect caused by mycoplasmas as polybacterial infection involves complex interactions between strains. Based on previous data on fetal membrane response to genital mycoplasmas and *Gardnerella vaginalis* alone,<sup>20,21</sup> we hypothesized that the combination of mycoplasmas and other pathogens, based on their species and loads, may produce distinct intensity inflammatory responses in fetal membranes. The inflammatory milieu of the specific combination may influence the pregnancy outcome, considering that cytokines can regulate the prostaglandin production and can be related to the mechanisms involved in the weakness of the chorioamniotic membranes.<sup>22</sup> To note, interactions among pathogens can result in virulence factor gene expression modulation in some strains, increasing their pathogenicity.<sup>23</sup> This is likely a load and location associated phenomenon.

Infection of the amniotic cavity is associated with the alteration of the normal vaginal flora, especially among women with bacterial vaginosis (BV) as most microorganisms isolated from amniotic fluid are present in vaginal fluid.<sup>24</sup> Frequent vaginal microorganism isolation in amniotic fluid, predominantly genital mycoplasmas, *M. hominis* and *U. urealyticum*, suggests ascending infection. To mimic PIAC, we used *G. vaginalis*, a bacterium present in 95%–100% of clinically diagnosed BV, a condition often associated with PL and pPROM.<sup>24</sup> Studies have identified the presence of *G. vaginalis* in the amniotic fluid of women in PL and pPROM along with other microbes.<sup>19,25</sup> Moreover, *G. vaginalis* participates in the vaginal biofilm formation, increases virulence when compared to other bacteria species associated with BV,<sup>26</sup> and is known to activate fetal membrane inflammatory response.<sup>20,21</sup>

The knowledge of innate immune response at intrauterine environment is important for understanding the mechanisms that trigger the infection-associated pathways ending in PL or pPROM. We hypothesized that interaction between *M. hominis* and *U. urealyticum* with *G. vaginalis* leads to a distinct proinflammatory and anti-inflammatory cytokine signature by fetal membranes in vitro.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

This study is approved by the Institutional Review Board at The University of Texas Medical Branch (UTMB), John Sealy Hospital, Galveston, TX.

### 2.1 | Patients and fetal membranes collection

Fetal membranes were obtained from elective repeat cesarean sections at term (>37 weeks of gestation) prior to onset of labor (n=8) at John Sealy Hospital, UTMB. Women with a prior history of PTB or pPROM were not included, as well as patients with obstetrical and medical complications and infections (subclinical infections as indicated by high C-reactive protein levels, fever, or those undergoing antibiotic treatment). Decidua and adhering blot clots were removed from the membranes using saline and sterile cotton gauze, and the remaining amnion-chorion were placed in Hanks' balanced salt solution (HBSS; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) containing penicillin/streptomycin (10 IU/mL) and 1 IU/mL amphotericin B. Then, amnion-chorion tissue sections (6-mm diameter) were placed into a tissue culture system as previously described.<sup>21,27</sup> Cultures were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 48 hours, and culture media was changed every 24 hours.

### 2.2 | Stimulation of fetal membrane cultures

The American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) of *U. urealyticum* (ATCC #27816), *M. hominis* (ATCC #14027), and *G. vaginalis* (ATCC #49145) was prepared and used to stimulate fetal membranes. Preparation of *U. urealyticum* was performed through cultivation in beef heart infusion broth supplemented with 20% (v/v) horse serum + 10% (w/v) yeast extract + 0.2% (w/v) urea + 1000 U/mL penicillin G + 40 mg/mL phenol red (pH=6.0). For *M. hominis* cultivation, we used PPLO (pleuropneumonia-like organism) broth supplemented with 20% (v/v) horse serum + 10% (w/v) yeast extract + 0.2% arginine (w/v) + 1000 U/mL penicillin G. Lastly, *G. vaginalis* was cultivated in Casman's broth + 5% (v/v) defibrinated sheep blood. In order to prepare different loads of bacteria as proposed in this study, bacteria were cultured to late log phase, concentrated, and resuspended in RPMI 1640 for subsequent quantitative cultures. The colony-forming units (CFU) were established through determination by serial dilution and plating on appropriate agar. Then, bacteria were heat-killed at 80°C for 1 hour and stored at -80°C until use.

Tissue cultures were stimulated with either 10<sup>3</sup> CFU or 10<sup>6</sup> CFU of heat-inactivated bacterial suspension diluted in tissue culture media for 24 hours. Different treatments were performed as described in the

**TABLE 1** Treatments used to stimulate fetal membranes in vitro

CTR: unstimulated samples
MH(6): <i>Mycoplasma hominis</i> (10 <sup>6</sup> CFU)
UU(6): <i>Ureaplasma urealyticum</i> (10 <sup>6</sup> CFU)
GV(6): <i>Gardnerella vaginalis</i> (10 <sup>6</sup> CFU)
MH(6)+UU(6): <i>M. hominis</i> + <i>U. urealyticum</i> (10 <sup>6</sup> CFU)
MH(6)+UU(6)+GV(6): <i>M. hominis</i> + <i>U. urealyticum</i> (10 <sup>6</sup> CFU) + <i>G. vaginalis</i> (10 <sup>6</sup> CFU)
MH(6)+UU(6)+GV(3): <i>M. hominis</i> + <i>U. urealyticum</i> (10 <sup>6</sup> CFU) + <i>G. vaginalis</i> (10 <sup>3</sup> CFU)
MH(3)+UU(3)+GV(6): <i>M. hominis</i> + <i>U. urealyticum</i> (10 <sup>3</sup> CFU) + <i>G. vaginalis</i> (10 <sup>6</sup> CFU)

CFU, colony-forming unit.

Table 1. Unstimulated samples were used as control in which was included only culture media without bacteria, and as positive control was used Lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli* O55:B5; Sigma, St. Louis, MO, USA) at 100 ng/mL in culture media for testing the stimulatory power of the fetal membrane in our culture environment. After stimulation, tissue samples and supernatant from both stimulated and unstimulated controls were harvested and stored at -80°C for further analysis.

### 2.3 | Immunoassays

The resulting culture supernatants were evaluated according to the protein levels by Luminex xMAP technology (Luminex, Austin, TX, USA) using a customized human cytokine panel (EMD, Millipore, MA, USA) for cytokines and receptors (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-8, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, sIL-1R1, sIL-1R2, sTNF-R1, sTNF-R2) per the manufacturer's instructions. Samples in which cytokine levels were below the sensitivity of the assay were set equal to the sensitivity of the assay. All samples above the standard curve were diluted and reassayed.

### 2.4 | Statistical analysis

Data were evaluated using linear mixed-effects models using the lme4 library of the R statistical language. Effects due to tissue donor were considered random and all others fixed. Differences between individual treatments were ascertained using contrast procedures. The residuals of all fit models were analyzed for compliance with the assumptions of parametric statistical techniques (normality, independence, and equality of errors). Parametric bootstrapping was performed (on 10 000 replicates), and data were reanalyzed when violations of these assumptions were detected. Results are reported as differences or fold differences from control ( $\pm$ 95% CI). Differences where  $P < .05$  are considered statistically significant.

## 3 | RESULTS

All cytokines tested were detectable in conditioned medium after 24-hour incubation with heat-inactivated bacteria or LPS. As expected,

LPS increased the production of proinflammatory cytokines, including IL-8 and TNF- $\alpha$  production ( $P < .001$ ). IL-1 $\beta$  was also increased although it was not statistically significant ( $P = .075$ ). No effect of LPS on GM-CSF was detected (Figure 1), and LPS increased production of the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10 but not IL-13 (Figure 2).

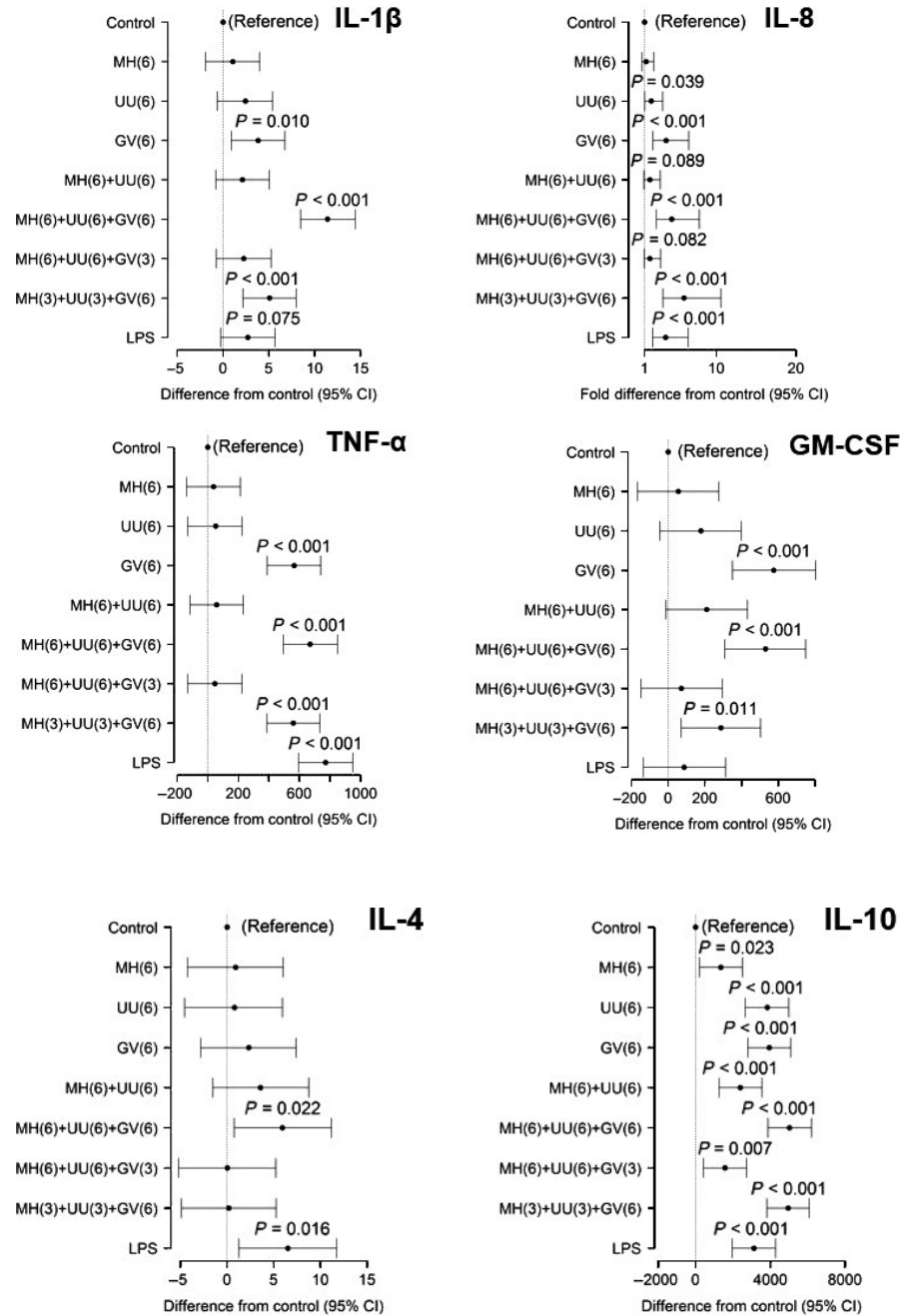
The genital mycoplasmas alone or in combination had minimal effects on proinflammatory cytokine production. IL-8 was the only cytokine increased by *U. urealyticum*, and no change in this cytokine was observed for cultures stimulated with *M. hominis*. *G. vaginalis* alone produced a broad proinflammatory cytokine profile, increasing the levels of all proinflammatory cytokines studied (all  $P < .05$ ). The combination of *G. vaginalis* at 10<sup>6</sup> CFU, independent of genital mycoplasmas' load, increased all proinflammatory cytokines. On the other hand, a higher load of genital mycoplasmas combined with a lower *G. vaginalis* load did not show the same results (Figure 1). When *G. vaginalis* was combined with genital mycoplasmas at the same load, the production of all proinflammatory cytokines was significantly enhanced ( $P < .001$ ) compared to the genital mycoplasmas (*M. hominis* + *U. urealyticum*) stimulation alone.

The pattern of anti-inflammatory cytokines for the individual stimulation of *M. hominis*, *U. urealyticum*, and *G. vaginalis* was similar, increasing of IL-10 and IL-13 but having no effect on IL-4 (Figure 2). Moreover, all polybacterial treatments significantly increased IL-10 and IL-13 concentrations compared to control, but the combination of a lower load of *G. vaginalis* and a higher load of genital mycoplasmas did not increase IL-13 production (Figure 2). A significant increase in IL-10 concentration ( $P < .001$ ) was seen when *G. vaginalis* was combined with the genital mycoplasmas compared to genital mycoplasmas alone. Polybacterial combinations of equal loads of *G. vaginalis* and genital mycoplasmas significantly increased the production of IL-4 compared to control (Figure 2).

We also tested soluble receptors as they may regulate the bioactivity of the cytokines quantified. sIL-1R2 and sTNF-R1 did not show any difference after treatments regardless of the dose or combinations. sIL-1R was not detected in any of our samples. However, sTNF-R2 levels were significantly increased in the presence of individual *M. hominis* ( $P = .039$ ) and *U. urealyticum* ( $P < .001$ ) and in all polybacterial combinations ( $P < .001$ ) (Figure 3).

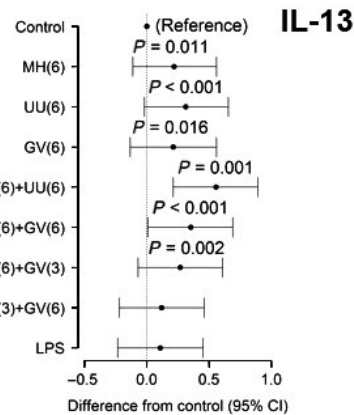
Comparing the stimulation between individual microorganisms, *G. vaginalis* treatment produced higher concentrations of IL-8 ( $P = .02$ ), TNF- $\alpha$  ( $P < .001$ ), and GM-CSF ( $P = .001$ ) compared to *U. urealyticum*, and compared to *M. hominis*, it showed statistically higher production of the same cytokines of *U. urealyticum*, including IL-10 ( $P < .001$ ). *U. urealyticum* results compared to *M. hominis* results were statistically higher for IL-10 only ( $P < .001$ ).

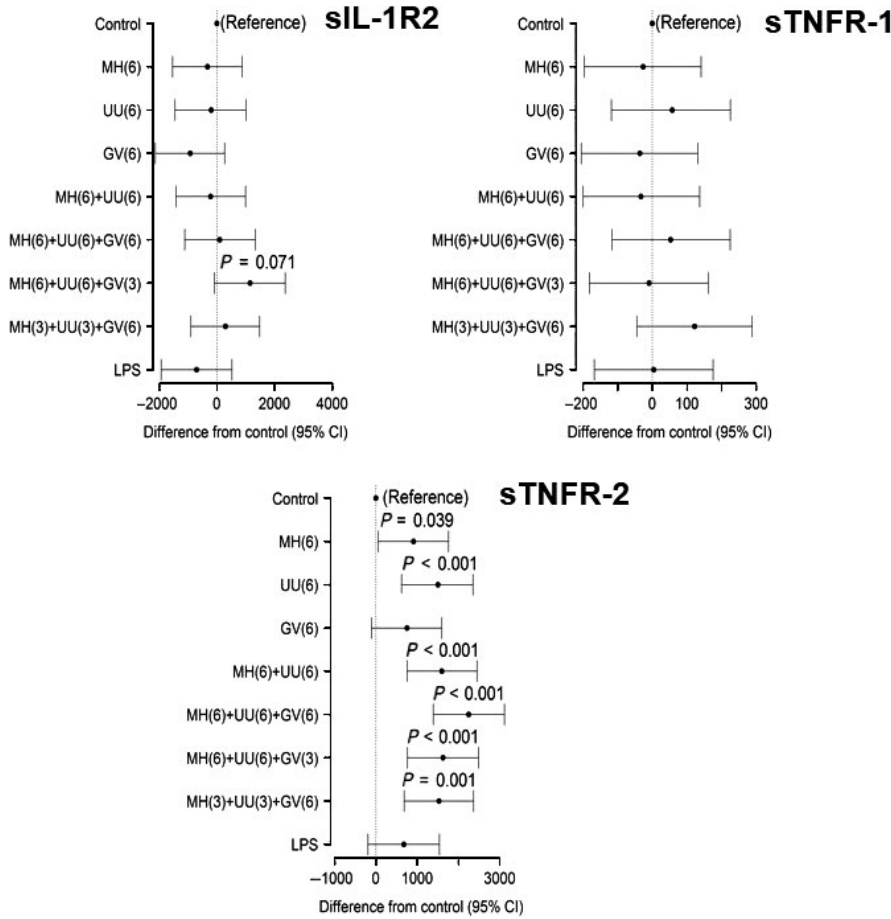
Considering that *G. vaginalis* generated the highest fetal membrane cytokine response off all three species used in this study, we analyzed all cytokine data together after stratifying them based on presence or absence of *G. vaginalis*. Group 1 consisted of genital mycoplasmas alone or combined (10<sup>6</sup> CFU), and Group 2 had both mycoplasmas and *G. vaginalis* at various loads as described in Table 2. We excluded the combination with a low load of *G. vaginalis* (10<sup>3</sup> CFU) because the impact of



**FIGURE 1** Proinflammatory IL-1β, IL-8, TNF-α, GM-CSF (pg/mL) secreted by fetal membranes in vitro, in the studied groups: control=unstimulated, MH(6)=*Mycoplasma hominis* at 10<sup>6</sup> CFU, UU(6)=*Ureaplasma urealyticum* at 10<sup>6</sup> CFU, GV(6)=*Gardnerella vaginalis* at 10<sup>6</sup> CFU, MH(6)+UU(6)=*M. hominis* and *U. urealyticum* at 10<sup>6</sup> CFU, MH(6)+UU(6)+GV(6)=*M. hominis*, *U. urealyticum* and *G. vaginalis* at 10<sup>6</sup> CFU, MH(6)+UU(6)+GV(3)=*M. hominis* and *U. urealyticum* at 10<sup>6</sup> CFU and *G. vaginalis* at 10<sup>3</sup> CFU, MH(3)+UU(3)+GV(6)=*M. hominis* and *U. urealyticum* at 10<sup>3</sup> CFU and *G. vaginalis* at 10<sup>6</sup> CFU, LPS=lipopolysaccharide

**FIGURE 2** Anti-inflammatory IL-4, IL-10, and IL-13 (pg/mL) secreted by fetal membranes in vitro, in the studied groups: control=unstimulated, MH(6)=*Mycoplasma hominis* at 10<sup>6</sup> CFU, UU(6)=*Ureaplasma urealyticum* at 10<sup>6</sup> CFU, GV(6)=*Gardnerella vaginalis* at 10<sup>6</sup> CFU, MH(6)+UU(6)=*M. hominis* and *U. urealyticum* at 10<sup>6</sup> CFU, MH(6)+UU(6)+GV(6)=*M. hominis*, *U. urealyticum* and *G. vaginalis* at 10<sup>6</sup> CFU, MH(6)+UU(6)+GV(3)=*M. hominis* and *U. urealyticum* at 10<sup>6</sup> CFU and *G. vaginalis* at 10<sup>3</sup> CFU, MH(3)+UU(3)+GV(6)=*M. hominis* and *U. urealyticum* at 10<sup>3</sup> CFU and *G. vaginalis* at 10<sup>6</sup> CFU, LPS=lipopolysaccharide





**FIGURE 3** Soluble receptors sIL-1R2, sTNFR-1, and sTNFR-2 (pg/mL) secreted by fetal membranes in vitro in the studied groups: Control=unstimulated, MH(6)=*Mycoplasma hominis* at  $10^6$  CFU, UU(6)=*Ureaplasma urealyticum* at  $10^6$  CFU, GV(6)=*Gardnerella vaginalis* at  $10^6$  CFU, MH(6)+UU(6)=*M. hominis* and *U. urealyticum* at  $10^6$  CFU, MH(6)+UU(6)+GV(6)=*M. hominis* and *U. urealyticum* and *G. vaginalis* at  $10^6$  CFU, MH(6)+UU(6)+GV(3)=*M. hominis* and *U. urealyticum* at  $10^6$  CFU and *G. vaginalis* at  $10^3$  CFU, MH(3)+UU(3)+GV(6)=*M. hominis* and *U. urealyticum* at  $10^3$  CFU and *G. vaginalis* at  $10^6$  CFU, LPS=lipopolysaccharide

**TABLE 2** Treatments grouped based on the presence or absence of *Gardnerella vaginalis*

Group 1	MH(6): <i>Mycoplasma hominis</i> ( $10^6$ CFU) UU(6): <i>Ureaplasma urealyticum</i> ( $10^6$ CFU) MH(6)+UU(6): <i>M. hominis</i> + <i>U. urealyticum</i> ( $10^6$ CFU)
Group 2	GV(6): <i>Gardnerella vaginalis</i> ( $10^6$ CFU) MH(6)+UU(6)+GV(6): <i>M. hominis</i> + <i>U. urealyticum</i> ( $10^6$ CFU) + <i>G. vaginalis</i> ( $10^6$ CFU) MH(3)+UU(3)+GV(6): <i>M. hominis</i> + <i>U. urealyticum</i> ( $10^3$ CFU) + <i>G. vaginalis</i> ( $10^6$ CFU)

CFU, colony-forming unit.

this group was minimal in the model. Group 2 showed an important proinflammatory cytokine response with higher levels of IL-1 $\beta$  ( $P < .001$ ), TNF- $\alpha$  ( $P < .001$ ), IL-8 ( $P = .017$ ), sIL-1R2 ( $P < .001$ ), and sTNFR-2 ( $P < .001$ ) compared to Group 1 (Figure 4). Regarding the anti-inflammatory cytokines, IL-4, IL-10, and IL-13 were not different between the groups.

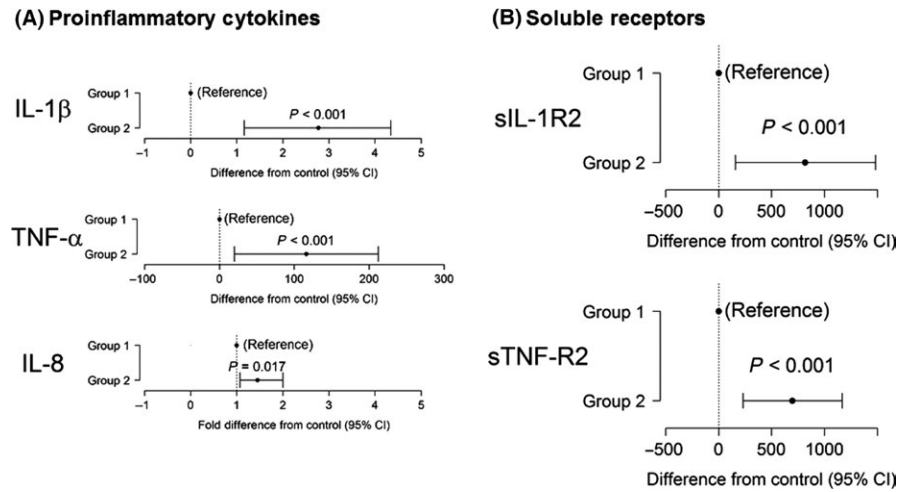
## 4 | DISCUSSION

### 4.1 | Main findings

Our study had a number of important findings: (i) term, not-in-labor fetal membranes in an organ explant system produce a distinct

signature of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines and cytokine antagonists in response to individual genital mycoplasmas or a combination of genital mycoplasmas and *G. vaginalis*; (ii) LPS treatment showed excitability of the membranes in an organ explant system with IL-4, IL-8, TNF- $\alpha$ , and IL-10 production; (iii) *G. vaginalis* produced IL-8, TNF- $\alpha$ , and IL-10 similar to that of LPS; (iv) *M. hominis* and *U. urealyticum* either alone or combined produced a minimal proinflammatory response with an important regulation by anti-inflammatory cytokines; (v) equal loads of polybacterial combinations of mycoplasmas and *G. vaginalis* produced proinflammatory and anti-inflammatory markers; (vi) polybacterial combinations with a low load of *G. vaginalis* and a high load of mycoplasmas produced a strong anti-inflammatory response; and (vii) polybacterial combinations with a high load of *G. vaginalis* and a low load of mycoplasmas sustain a strong proinflammatory response in 24 hours.

Polybacterial invasion and infection of the amniotic cavity and fetal membranes are a well-established risk factor to adverse pregnancy outcomes.<sup>7,25,28</sup> Microbial invasion followed by intraamniotic colonization and infection generate host immune responses that can result in PTB and pPROM (the host response syndrome). Bacteria are thought to interact with the host through toll-like receptors (TLRs)<sup>29</sup> and pathogen-associated molecular pattern molecules (PAMPs). In vitro studies have demonstrated an association between microbial infection of the fetal membranes, decidua and placenta and different arrays of proinflammatory cytokines, chemokines,<sup>20,30</sup> TLRs,<sup>21</sup> PAMPs



**FIGURE 4** Cytokines and soluble receptors secreted by fetal membranes in vitro, in the studied groups: absence of *Gardnerella vaginalis* (Group 1) and presence of *G. vaginalis* (Group 2). A, Proinflammatory cytokines: IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  (pg/mL). B, Soluble receptors: sIL-1R2 and sTNF-R2 (pg/mL)

as LPS,<sup>21,31</sup> damage-associated molecular patterns (DAMPs) as defensins,<sup>20</sup> and High-mobility group box 1<sup>33,34</sup> that can optimize the host response to a particular group of pathogens. Most of these studies, however, are limited to a single pathogen and address the proinflammatory properties of the innate immune mechanisms.

## 4.2 | Strengths

A strength of our study is that we also evaluated how anti-inflammatory cytokines and soluble receptors can attenuate the host response to the pathogens. As in previous studies, we found that the inflammatory response varies based on the species of pathogen.<sup>21</sup> *G. vaginalis* produced the maximum proinflammatory response compared to the most common PTB-associated genital mycoplasmas,<sup>7,25</sup> either alone or in combination. Similar results were seen in our model when a load of *G. vaginalis* was kept a constant  $10^6$  CFU, regardless of being alone or combined with genital mycoplasmas. Individual *U. urealyticum* increased IL-8 concentration compared to control, but this increase was significantly lower than either *G. vaginalis* alone or combined with genital mycoplasmas at the same dose. A moderate inflammatory response induced by *M. hominis* and *U. urealyticum* seems to be regulated by anti-inflammatory markers (increases of IL-10, IL-13, and sTNF-R2), and this anti-inflammatory profile was sustained or enhanced with *G. vaginalis*. This observation correlates well with findings from other species of mycoplasma. *Mycoplasma pulmonis* is a common respiratory and reproductive pathogen of conventionally housed rodents. Th1-type immune responses (proinflammatory) help to clear infection with this pathogen, but anti-inflammatory (Th2)-type responses lead to chronic infection. Experimental infection with this pathogen is associated with a shift toward Th2 immunity in mice.<sup>35</sup> A lack of a proinflammatory surge with lower loads of *G. vaginalis* and higher loads of genital mycoplasmas further supports the concept that mycoplasmas may provide a balanced innate immune response. We speculate that mycoplasmas may provide an anti-inflammatory environment to protect the intrauterine cavity when combined with other more potent pathogens to limit the damage that can be done by exaggerated cytokine production, and the mechanism involved can be

mediated by genital mycoplasma modulation of *G. vaginalis* virulence factor gene expression that can result in amplified proinflammatory cytokine production by the host. However, this anti-inflammatory scenario could be beneficial to the survival of pathogens facilitating the bacteria colonization.

We postulate that genital mycoplasmas are not necessarily a threat to pregnancy and this fact very well may depend on their site of localization and load. Mycoplasmas may gain access to intraamniotic cavity due to an underlying pathologic mechanisms that reduces antimicrobial defense providing a favorable environment that may favor their growth and survival. Type of growth in a minimal resistant environment, minimal antigenicity required for survival may produce host anti-inflammatory response. This could be an evolutionary mechanism of adaptation to environment for survival as protecting an environment that is favorable. A proinflammatory milieu is likely detrimental to their survival as innate and adaptive immunity will eliminate them. Therefore, in pregnancy, they may act as natural probiotics. Access to other fetal compartments such as lungs, with higher antimicrobial defense, may promote a virulent phenotype from these bacteria and proinflammatory surge. Similarly, an environment challenged by heavy load of highly virulent strains of *G. vaginalis* may also threaten the survival of mycoplasmas prompting virulence and proinflammatory surge.

## 4.3 | Limitations

Our findings are limited by several factors. First, we did not investigate multiple time points and therefore the kinetics of cytokine production. Measurement of cytokine values after 24 hour of treatment may not reflect the initial surge of proinflammatory responses as expected, regardless of the treatment. Our unpublished data indicated IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  increase within 3 hours of treatment with LPS or bacteria and IL-6 and IL-8 responses afterward within 6-8 hours. Others have reported similar changes.<sup>32</sup> Our model becomes more relevant in the context that *G. vaginalis*'s proinflammatory response prevailed even after 24 hour of treatment, whereas genital mycoplasmas demonstrate a more balanced inflammatory response with higher levels of anti-inflammatory cytokines and soluble receptors. This fact

could explain controversial results as the real contribution of genital mycoplasmas in PTB.

## 5 | CONCLUSIONS

These bacteria are fundamentally different, and there are similarities between their pathogenesis considering that both pathogens have the capacity to stimulate innate immune responses and inflammatory cytokine production. Different bacterial species can lead to inflammation mediated by different innate immune pattern recognition receptors (PPRs), such as TLRs, nucleotide-binding oligomerization domain-containing 1 and 2 (NOD1 and NOD2) and some others cell surface receptors whose are an important amplifier of inflammation. Then, we could hypothesize that higher load of *G. vaginalis* induces an increased proinflammatory cytokines profile depending on increased NF- $\kappa$ B activation by different PPRs. However, a key question remains to be answered what is the exact mechanism in which higher load of *G. vaginalis* induces an increased proinflammatory cytokines profile. Further studies need to be performed to clarify this question.

Thereby, we can conclude that *G. vaginalis* induces a strong proinflammatory response in the fetal membranes in vitro, while genital mycoplasmas induce a moderate inflammatory response that could be regulated after 24 hours. The ability for genital mycoplasmas to favor an anti-inflammatory host immune response may favor their survival in the upper genital tract.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by developmental funds granted to Dr. Ramkumar Menon from the Department of Ob/Gyn at The University of Texas Medical Branch at Galveston (UTMB); by São Paulo Research Foundation, FAPESP, (Grant 2012/17234-1) granted to Dr. Márcia Guimarães da Silva from the Department of Pathology, Botucatu Medical School, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil; and by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, CAPES, (BEX 3511/13-8) granted to Nathália Mayumi Noda Nicolau, PhD student of Postgraduation Program in Pathology, Botucatu Medical School, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil, who performed her training at UTMB.

## REFERENCES

- Slattery MM, Geary M, Morrison JJ. Obstetric antecedents for preterm delivery. *J Perinat Med*. 2008;36:306–309.
- Lo C, Hsu J, Hsieh C, Hsieh T, Hung T. Risk factors for spontaneous preterm delivery before 34 weeks of gestation among taiwanese women. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2007;46:389–394.
- 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;116:1315–1324.
- Leitich H, Bodner-Adler B, Brunbauer M, Kaider A, Egarter C, Husslein P. Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;189:139–147.
- Menon R. Oxidative stress damage as a detrimental factor in preterm birth pathology. *Front Immunol*. 2014;5:1–14.
- 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;11:317–326.
- DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2012;17:2–11.
- Capoccia R, Greub G, Baud D. Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis and adverse pregnancy outcomes. *Curr Opin Infect Dis*. 2013;26:231–240.
- 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;79:973–978.
- Kacerovský M, Pavlovský M, Tosner J. Preterm premature rupture of the membranes and genital mycoplasmas. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2009;52:117–120.
- 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;187:518–521.
- 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;193:1663–1669.
- Aaltone R, Jalava J, Laurikaine 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.
- 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.
- Nguyen DP, Gerber S, Hohlfeld P, Sandrine G, Witkin SS. Mycoplasma hominis in mid-trimester amniotic fluid: relation to pregnancy outcome. *J Perinat Med*. 2005;32:323–326.
- Larsen B, Hwang J. Mycoplasma, Ureaplasma, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2010;2010. pii: 521921.
- Kwak D-W, Hwang H-S, Kwon J-Y, Park Y-W, Kim Y-H. Co-infection with vaginal Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis increases adverse pregnancy outcomes in patients with preterm labor or preterm premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013;7058:1–5.
- 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;24:253–257.
- Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, et al. A novel molecular microbiologic technique for the rapid diagnosis of microbial invasion of the amniotic cavity and intra-amniotic infection in preterm labor with intact membranes. *Am J Reprod Immunol*. 2014;71:330–358.
- Zaga-Clavellina V, Martha RVM, Flores-Espinosa P. In vitro secretion profile of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, and of Human Beta-Defensins (HBD)-1, HBD-2, and HBD-3 from human chorioamnionic membranes after selective stimulation with Gardnerella vaginalis. *Am J Reprod Immunol* 2012;67(II):34–43.
- 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. e1–306.e6.
- Hsu C, Meaddough E, Aversa K, et al. Dual roles of amniotic fluid nitric oxide and prostaglandin E2 in preterm labor with intra-amniotic infection. *Am J Perinatol*. 1998;15:683–687.
- 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.
- Hillier SL. Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1993;169:455–459.

25. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One*. 2008;3:1–10.
26. Patterson JL, Stull-Lane A, Girerd PH, Jefferson KK. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology*. 2010;156:392–399.
27. 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.
28. Marconi C, De Andrade Ramos BR, Peraçoli JC, Donders GGG, 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;65:549–556.
29. 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;191:1346–1355.
30. 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.
31. Basraon SK, Costantine MM, Saade G, Menon R. The effect of simvastatin on infection-induced inflammatory response of human fetal membranes. *Am J Reprod Immunol*. 2015;74:54–61.
32. Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, Drage MG, Jadowsky J, Harding CV, et al. Human -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:18631–18635.
33. Bredeson S, Papaconstantinou J, Deford JH, Kechichian T. HMGB1 promotes a p38MAPK associated non-infectious inflammatory response pathway in human fetal membranes. *PLoS One*. 2014;9:1–18.
34. Park JS, Gamboni-robertson F, He Q, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290:917–924.
35. Romero-Rojas A, Ponce-Hernández C, Mendoza S, Reyes-Esparza J, Estrada-Parra S, Hadden J. Immunomodulatory properties of *Mycoplasma pulmonis*. II. Studies on the mechanisms of immunomodulation. *Int Immunopharmacol*. 2001;1:1689–1697.
36. Reisenberger K, Egarter C, Schiebel I, Obermair A, Kiss H, Lehner R. In vitro cytokine and prostaglandin production by amnion cells in the presence of bacteria. *Am J Obstet Gynecol*. 1997;176:981–984.

**How to cite this article:** Noda-Nicolau, N. M., Poletti, J., Peltier, M. R., da Silva, M. G. and Menon, R. (2016), Combinations and loads of bacteria affect the cytokine production by fetal membranes: An in vitro study. *American Journal of Reproductive Immunology*, 76: 504–511. doi: 10.1111/aji.12596

# *Artigo Científico II*

**Artigo segundo as normas da revista American Journal of Obstetrics & Gynecology (fator de impacto 5.57)**

---

Polybacterial Stimulation Suggests Discrete IL-6/IL-6R Signaling in Human  
Fetal Membranes: Potential Implications on IL-6 Bioactivity

Nathalia Mayumi Noda-Nicolau, MS<sup>a,b</sup>, Jossimara Poletini, PhD<sup>a,b,c</sup>,  
Márcia Guimarães da Silva, PhD<sup>b</sup>, Morgan R Peltier, PhD<sup>d,e</sup>, and  
Ramkumar Menon, PhD<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Division of Maternal-Fetal Medicine and Perinatal Research, Department of Obstetrics and Gynecology, The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas, United States of America.

<sup>b</sup>Department of Pathology, Botucatu Medical School, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil.

<sup>c</sup>Master's Course in Health Sciences, University of Western São Paulo, UNOESTE, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

<sup>d</sup>Department of Biomedical Research, NYU-Winthrop University Hospital, Mineola, New York, United States of America.

<sup>e</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, NYU-Winthrop University Hospital, Mineola, New York, United States of America.

The authors report no conflicts of interest.

**Funding:** This study was supported by: developmental funds granted to Dr. R Menon from the Department of OBGYN, the University of Texas Medical Branch; Galveston, TX, USA; by São Paulo Research Foundation – FAPESP (Grant 2012/17234-1) granted to Dr. Márcia Guimarães da Silva from the Department of Pathology, Botucatu Medical School, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil; and by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – CAPES (BEX 3511/13-8) granted to Nathália Mayumi Noda Nicolau, PhD student in the Post-graduate Program in Pathology, Botucatu Medical School, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil. Mrs Nicolau performed her training at the University of Texas Medical Branch at Galveston (UTMB) with Dr. Menon.

The authors report no conflict of interest

**Corresponding Author:**

Ramkumar Menon, MS, PhD

Department of Obstetrics and Gynecology, Division of Maternal-Fetal Medicine & Perinatal Research, The University of Texas Medical Branch at Galveston, 301 University Blvd, MRB 11-158, Galveston, TX 77555; Ph # 409 - 772 -7596;

[ram.menon@utmb.edu](mailto:ram.menon@utmb.edu)

Word count: Abstract= 257 Main text=2739

---

**Condensation**

During polybacterial infections, IL-6 concentrations alone may be ineffective in assessing a patient's risk or design interventions to prevent adverse pregnancy outcomes without considering changes to accessory molecules that regulate IL-6 function.

**Short version of title**

Polybacterial stimulation suggests discrete IL-6/IL-6R signaling in human fetal membranes

---

## Abstract

**Background:** The polybacterial invasion of the amniotic cavity and risk of preterm birth is often due to cervicovaginal bacteria such as genital mycoplasmas (*Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*) and *Gardnerella vaginalis*. The most studied biomarker associated with preterm birth is interleukin-6 (IL-6), a pleiotropic cytokine that performs different functions based on classical or trans-signaling mechanisms.

**Objective:** To evaluate the changes in IL-6 and IL-6 function associated accessory molecules by human fetal membranes in order to determine the functional availability of IL-6 assessment in an *in vitro* model of polymicrobial infection.

**Study design:** Fetal membranes were treated with LPS or heat-inactivated genital mycoplasmas and *G. vaginalis* alone or in combination. IL-6 and its soluble receptors (sgp130, sIL-6R) were assessed in conditioned medium by immunoassays and membrane-bound receptors were evaluated in the tissue using immunohistochemistry and RT-PCR. Data from protein and gene expression were evaluated using linear mixed effects models. Data from immunohistochemistry were evaluated using one-way analysis of variance followed by the Tukey test.

**Results:** Genital mycoplasmas alone, or in combination, inhibited IL-6 trans-signaling with increased sgp130 production. *G. vaginalis* activated the classical IL-6 signaling pathway, as did LPS. Polybacterial challenge resulted in a balanced response with neither pathway being favored.

**Conclusion:** The increase in IL-6 production by fetal membranes in response to infection is likely a non-specific innate response and not an indicator of a functional mediator of any labor-inducing pathways. This suggests that correlating the risk of adverse pregnancy outcomes and designing interventions based on IL-6 levels without considering soluble receptors may be an ineffective strategy

**Keywords:** fetal membranes *in vitro*, genital mycoplasmas, interleukin-6, polybacterial infection.

---

## Introduction

Intraamniotic infection and inflammation are associated with spontaneous preterm birth (PTB)<sup>1,2</sup>. These infections are generally due to cervicovaginal colonizers<sup>3,4</sup> such as genital mycoplasmas (*Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*) and *Gardnerella vaginalis*<sup>5</sup>, a pathogen frequently associated with bacterial vaginosis<sup>6</sup> that ascends from the lower genital tract. *M. hominis* and *U. urealyticum* are the most commonly isolated bacteria in the amniotic fluid in both PTB with intact membranes and in preterm premature rupture of membranes (pPROM)<sup>3</sup>. Both species, along with *G. vaginalis*, are present at higher frequencies in human fetal membranes from women with preterm labor<sup>7</sup>. Although the relative roles of bacterial diversity, bacterial load and the host response to infection in the induction of PTB remain unclear, polybacterial invasion of the amniotic cavity (PIAC) is thought to trigger an inflammatory response in fetal membranes<sup>8</sup>, which, in turn, can increase prostaglandin production and lead to preterm contractions that result in preterm labor and ultimately preterm delivery.

Inflammation by microbial pathogens is heterogeneous, and there are no predictive biomarkers for predicting PTB. In a recent study published by our group<sup>9</sup>, different combinations and loads of bacterial species had distinct effects on the array of cytokines produced in membrane host immune response. Therefore, using a single inflammatory biomarker to evaluate the health of asymptomatic pregnancies may not be feasible.

The most studied biomarker associated with PTB is interleukin-6 (IL-6)<sup>10</sup>. High levels of IL-6 in cervicovaginal fluid<sup>11</sup> and amniotic fluid<sup>12</sup> are associated with infection and PTB. IL-6 is a pleiotropic cytokine that performs its functions

---

either through classical or trans-signaling mechanisms, which determine its biological activities (Figure 1). Classical signaling, through the membrane-bound IL-6 receptor (mIL-6R), produces an anti-inflammatory effect; conversely, trans-signaling through the soluble IL-6 receptor (sIL-6R) generates a proinflammatory effect. In both cases, the binding between IL-6 and mIL-6R or sIL-6R is followed by homodimerization of  $\beta$ -subunit glycoprotein 130 (gp130), the signal transduction subunit. However, soluble gp130 (sgp130) functions as a natural antagonist of IL6/sIL6R trans-signaling, neutralizing IL-6 bioactivity by blocking the IL-6/sIL-6R complex binding to gp130<sup>13,14</sup> and suppressing inflammation. To better understand how polybacterial infections may affect IL-6 signaling and bioactivity, we evaluated the expression of IL-6 and its various IL-6 receptors (mIL-6R and sIL-6R) and signaling modifiers (gp130 and sgp130) in conditioned medium and tissues from a polybacterial infection tissue culture model of fetal membranes.

## **Materials and methods**

### Patient and collection of fetal membranes

Fetal membranes were obtained from elective repeat cesarean sections at term (>37 weeks of gestation) prior to the onset of labor (n=6). The decidua and adhering blot clots were removed from the membranes using saline and sterile cotton gauze. Segments (6 mm disks isolated with a skin biopsy punch), were placed in Hanks balanced salt solution (HBSS; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) containing penicillin/streptomycin (10 IU/mL) and amphotericin B (1 IU/mL) and incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 48 h. Culture medium was replaced every 24 h, as previously described<sup>15,16</sup>.

---

Women with a prior history of pPROM or spontaneous PTB were excluded, as were patients with obstetrical and medical complications and infections (subclinical infections as indicated by high C-reactive protein levels, foul smelling vaginal discharge, fever, and those undergoing antibiotic challenge). The Institutional Review Board at The University of Texas Medical Branch (UTMB), John Sealy Hospital, Galveston, TX, approved this study on October 7, 2011 until April 15, 2016 (IRB #: 11-251).

#### Stimulation of fetal membranes

The preparation of heat-killed stocks of *U. urealyticum* (ATCC #27816), *M. hominis* (ATCC #14027) and *G. vaginalis* (ATCC #49145) is described in our previous report<sup>9</sup>. Tissue cultures were stimulated with heat-inactivated bacteria for 24 hours at the final concentrations indicated in Table 1. The negative control consisted of sterile tissue medium, and purified lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (O55:B5) at 100 ng/ml was used as a positive control. Supernatants and tissues were then harvested and stored at -80°C until biochemical analysis, as described below. Additional tissue samples were fixed in 10% formalin for paraffin embedding and immunohistochemistry.

#### Protein biomarker assays

A customized cytokine panel (EMD, Millipore, Billerica, MA, USA) based on Luminex xMAP™ technology (Luminex, Austin TX) was used to quantify IL-6 and sIL-6R concentrations in conditioned medium. A commercially available ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was used to quantify sgp130 levels in these samples. All assays were performed according to the manufacturer's instructions. Samples in which cytokine levels were estimated to

---

be below the sensitivity of the assay were set equal to the sensitivity of the assay and those with concentrations at levels above standard curve were diluted and re-assayed.

### Gene expression

Frozen fetal membranes were homogenized in 1 mL of Trizol (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), and extracted using Direct-zol RNA Mini Prep kits (Zymo-Research, Irvine, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The quality and concentration of extracted total RNA were measured by UV-spectroscopy. Aliquots of the RNA samples (0.1 mg/mL) were then reverse transcribed using the First-Strand cDNA Synthesis SuperScript II reverse transcriptase kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Relative mRNA expression levels of gp130 (hs00174360 m1) and mL-6R (hs00169842 m1) and the housekeeping gene, GAPDH, were measured using TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The absence of DNA contamination was confirmed by amplifying mock controls of RNA that were not reverse transcribed.

### Immunohistochemistry analysis

Fetal membranes embedded in paraffin blocks were sectioned (6  $\mu$ m thick) and subject to deparaffinization, rehydration and antigen retrieval by boiling in Trilogy™ solution (Cell Marque, Hot Springs, AR, USA) for 30 min. Sections were then treated with Peroxidized 1™ (Biocare Medical, Pacheco, CA, USA) and Protein block™ (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA) followed by Mach 4™ Universal HRP Polymer Kit with DAB (Biocare Medical, Pacheco, CA, USA). The primary antibodies used were: rabbit anti-human mL-6R (sc-661, dilution 1:150, 3 hours of incubation at 4°C, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and

---

mouse anti-human gp130 (sc-9994, dilution 1:25, overnight incubation at 4°C, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Sections were counterstained with Harris hematoxylin. In this system, a brown color indicates positive staining for immunolocalization in the slide. Images from three different areas from each slide were analyzed using Image J software and applying hematoxylin-diaminobenzidine (H-DAB) specific color deconvolution in the RGB (red-green-blue) image of the amnion and chorion layers. Median intensity was calculated using the measure function. Since the maximum intensity value of RGB image analyzed in the program is 255, and the amount of chromogen present is inversely proportional the intensity value, in order to facilitate the interpretation of results, we deducted the value of 255 from median intensities represents in the graph, making the results directly proportional.

#### Statistical analysis

Data from protein and gene expression were evaluated using linear mixed effects models using the lme4 library of the R statistical language. Effects due to tissue donor were considered random and all other effects were fixed. Differences between individual challenges were ascertained using contrast procedures and results are expressed as differences from control with 95% confidence intervals (CI). The residuals of all fit models were analyzed for compliance with the assumptions of parametric statistical techniques (normality, independence and equality of errors). Parametric bootstrapping was performed (on 10,000 replicates) and data were reanalyzed whenever violations of these assumptions were detected. Immunohistochemistry results were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test with GraphPad Prism, in which a p value < 0.05 was considered to be statistically significant.

---

## Results

The combination of different doses of genital mycoplasmas and *G. vaginalis* are defined here as polybacterial challenges, and the results of these challenges, were compared with cultures from unstimulated samples (negative control).

*G. vaginalis*, alone or in combination with genital mycoplasmas, significantly increased IL-6 production. Although other challenge groups, except for *M. hominis*, also showed increased IL-6 concentrations (Figure 2), the increase was not as great as that produced by *G. vaginalis*.

Soluble IL-6R concentrations did not change in response to polybacterial challenge, LPS, *M. hominis* or *G. vaginalis*. However, *U. urealyticum* significantly increased sIL-6R production alone, or in combined challenge with *M. hominis* (Figure 2). In addition, the sgp130 concentration was increased by LPS as well as *M. hominis* and *U. urealyticum*, and in the polybacterial challenges, except for the combination of the same load of all the studied bacteria. *G. vaginalis* also had no effect on sgp130 production (Figure 2). The increase in IL-6, sIL-6R and sgp130 during genital mycoplasma stimulation indicates the binding of these mediators; thus, there was no interaction with membrane-bound receptors, thereby inhibiting the proinflammatory action of IL-6 (trans-signaling). Similarly, in the polybacterial stimulation with different loads of bacteria, sgp130 was increased but without sIL-6R, suggesting the inhibition of trans-signaling.

The mRNA levels of membrane-bound receptors, i.e. mL-6R and gp130, were reduced by *G. vaginalis*, but LPS was only effective at reducing mL-6R expression. No other effects of bacterial stimulation were detected (Figure 3).

---

Immunohistochemistry analysis suggested that neither polybacterial stimulation nor challenge with *M. hominis* or *U. urealyticum* affected mL-6R levels in amnion or chorion cells (Figure 4), and only LPS and *G. vaginalis* challenges increased mL-6R expression in amnion cells (Figure 4;  $p < 0.001$ ). Moreover, gp130 was not changed following challenge with genital mycoplasmas, but it was increased in both amnion and chorion cells by LPS, *G. vaginalis* and all polybacterial challenges (Figure 5;  $p < 0.001$ ), suggesting the activation of classical signaling in the presence of *G. vaginalis* or LPS.

### **Comment**

Polybacterial infections are commonly associated with spontaneous PTB and pPROM<sup>17-19</sup>. However, the host inflammatory response varies with the bacterial load, the combination of bacteria, and the tissues affected<sup>9,16,20</sup>. This non-homogenous immune profile complicates the search for biomarkers of intrauterine infections and the development of interventions<sup>21,22</sup>. Genital mycoplasmas are one of the most common isolates from pregnancies with intra-amniotic infection (IAI) or PIAC<sup>18</sup>. However, recent findings question the contribution of genital mycoplasmas to adverse outcomes<sup>23-25</sup>. Our prior work showed that genital mycoplasmas are not highly immunogenic in fetal tissues; in fact, they tend to buffer overwhelming inflammation generated by other pathogens by increasing the anti-inflammatory cytokine response<sup>9</sup>. In this study, we further tested the role of polybacterial infections on the innate immune response by fetal membranes. Since IL-6 is one of the most studied cytokines as a marker of IAI and inflammation<sup>10</sup> and it is used clinically in multiple point of care

---

(POC) test kits to diagnose these conditions<sup>26,27</sup>, we studied how the host response may modulate IL-6 and its signaling molecules during PIAC.

In Figure 6, our data were used to build a representative model of classical, trans-signaling and inhibition of IL-6 activity after 24 hours of fetal membrane challenge. In summary, we observed that: 1) our positive control (LPS) activated the IL-6 classical signaling pathway, since the expression of membrane-bound receptors was increased, along with IL-6. 2) *G. vaginalis* activated IL-6 classical signaling, since IL-6 was increased along with gp130 and mL-6R, similar to the LPS response. Of note, the effect of LPS and *G. vaginalis* challenge induced an anti-inflammatory response, although they both increased IL-6 significantly compared to the control challenge. 3) *M. hominis* has no detectible effect on altering either IL-6 or IL-6 receptor levels; therefore, *M. hominis* is unlikely to have any effect on IL-6 signaling. 4) The increase in IL-6 and sIL-6R expression by *U. urealyticum* alone or in combination with *M. hominis* (genital mycoplasmas) suggests that an upregulation of these molecules needed for trans-signaling activation; however, the concurrent increase in sgp130, which inhibits trans-signaling, suggests that this response is either balanced or tightly regulated. Classical signaling is also unlikely with *Mycoplasma* stimulation, as membrane bound-receptors were not increased upon exposure to these pathogens. 5) Polybacterial stimulation with similar or different loads of pathogens increased IL-6 and gp130 levels, but had no effect on mL-6R. This suggests an impairment of the biological activity of IL-6 via classical signaling. Similarly, no changes in sIL-6R were observed in response to polybacterial challenge, which suggests that any effect was triggered by trans-signaling. Finally, polybacterial challenge did not show potential for an IL-6-mediated effect, as all markers tested showed a

---

balanced response regardless of challenge (combination and load). Our results confirm that the type of bacteria and bacterial load play major roles in determining IL-6 production, the expression of its receptors, and likely its bioactivity.

The high prevalence of vaginal, cervical and intra-amniotic colonization by genital mycoplasmas have been extensively demonstrated in pregnancy complications, such as PTB and pPROM<sup>28-30</sup>. Additional studies have shown that IAI is associated with mycoplasmas and increased IL-6 concentrations in the amniotic fluid<sup>31,32</sup>. These observations have suggested that IL-6 may be a valuable biomarker, and resulted in the development of POC tests<sup>26,27,33</sup> designed for clinical use. However, information on quantitative change alone is not sufficient to understand the functional downstream effects of IL-6 that activate or inhibit labor pathways. Therefore, we tested changes in other molecules that IL-6 interacts with to exert its biological effects in response to polybacterial pathogens associated with PTB. It is possible that increased circulating sgp130 levels is part of a convalescent response to minimize IL-6 production hours after the initial exposure. Quantification of sIL-6R and sgp130 may also be useful for identifying patients most likely to benefit from sgp130Fc therapy due to excessive IL-6 trans-signaling<sup>34</sup>. Our results regarding the inhibition of IL-6 trans-signaling through increased sgp130 could also help explain why many pregnancies that test positive for genital mycoplasmas and other microorganisms do not result in adverse pregnancy outcomes<sup>24,25,35-37</sup>. Inhibition of IL-6 trans-signaling results in the downregulation of inflammatory signaling, which could also favor the survival of *Ureaplasma species* that live off the urea-rich<sup>38</sup> amniotic fluid and need to evade the maternal immune system. Similarly, polybacterial stimulation with different loads of genital mycoplasma and *G. vaginalis* do not suggest a functional

---

role for IL-6 through either the classical or trans-signaling pathways. Therefore, although IL-6 may increase in quantity in response to polybacterial infection, the presence of genital mycoplasmas may mitigate the function of IL-6 as an anti-inflammatory mediator. A disturbance or immune weakness in the uterine cavity may attract mycoplasma due to an underlying pathology, forcing them to ascend from the genital tract. Based on data from this report and our prior report<sup>9</sup>, we postulate that this ascension is likely to provide a probiotic environment to assure fetal wellbeing. A stronger anti-inflammatory response<sup>9</sup> and the absence of IL-6 trans-signaling support this hypothesis. However, access of these microbes to fetal organs can contribute to adverse neonatal outcomes<sup>39</sup>.

*G. vaginalis* increases the expression levels of IL-6 and the membrane-bound receptor proteins mL-6R and gp130; however, gene expression of these receptors was downregulated. Although the signal transducing chain gp130 is shared by members of the IL-6 family of cytokines, mL-6R is a unique binding receptor for IL-6<sup>40</sup>. Therefore, it is likely that the fetal membrane may try to minimize the induction of an intense inflammatory response by *G. vaginalis* (as seen by increased IL-6 and all other associated signaling markers) by minimizing membrane receptors after 24 hours. An alternate hypothesis is that the downregulation of gene expression observed is just a transient state where functionally viable protein expression is already effective, as IL-6 production in amnion cells is normally increased by 12 hours of bacterial stimulation<sup>41</sup>.

Other factors that could contribute to the function of IL-6 include IL-6 and IL-6R polymorphisms and their interactions with infection, which can strongly influence IL-6 production and signaling<sup>42</sup>. Further studies will be needed to

---

determine how they may impact the host response to infection of the fetal membranes.

The observed IL-6 increase by various PIAC-associated bacteria suggest its potential as a biomarker of infection, irrespective of the bacteria involved. However, an increase in this cytokine alone may not be indicative of any functional role, as its biological activities are controlled by additional molecules whose expression also changes in response to infection. Additional information will be valuable to determine the possible downstream effects of increased IL-6 levels and/or to design an interventional target to modulate IL-6 function. As shown here, not all bacteria or combinations of them produce a molecular arrangement for IL-6 to exert a function. IL-6 expression by membranes is likely a non-specific innate response and not a functional mediator of any labor-inducing pathways. Indeed, previous studies have demonstrated that IL-6 is neither necessary nor sufficient to include PTB in mouse models<sup>43,44</sup>. Conversely, Robertson's group<sup>45</sup> have shown that IL-6 null mutant mice have an extended gestational period after LPS challenge, suggesting yet another role for IL-6 in pregnancy maintenance. Therefore, additional consideration of all the factors that influence IL-6 bioactivity need to be considered if it is to be used as a biomarker for adverse pregnancy outcomes or a target for designing drugs to prevent them.

### **Acknowledgments**

None

---

## References

1. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med*. 2000;342(20):1500–7.
  2. Helmo FR, Alves EAR, Moreira RADA, et al. Intrauterine infection, immune system and premature birth. *J Matern Neonatal Med*. 2017;0(0):1–7.
  3. DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2012;17(1):2–11.
  4. Mendz GL, Kaakoush NO, Quinlivan J a. Bacterial aetiological agents of intra-amniotic infections and preterm birth in pregnant women. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3:58.
  5. Menard JP, Mazouni C, Salem-Cherif I, et al. High vaginal concentrations of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* in women undergoing preterm labor. *Obstet Gynecol*. 2010;115(1):134–40.
  6. Santos-Greatti MMDV, da Silva MG, Ferreira CST, Marconi C. Cervicovaginal cytokines, sialidase activity and bacterial load in reproductive-aged women with intermediate vaginal flora. *J Reprod Immunol*. 2016;118:36–41.
  7. Doyle RM, Alber DG, Jones HE, et al. Term and preterm labour are associated with distinct microbial community structures in placental membranes which are independent of mode of delivery. *Placenta*. 2014;35(12):1099–101.
  8. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel L a., Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006;11(5):317–26.
  9. Noda-Nicolau NM, Polettini 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(6):504–11.
  10. Menon R, Torloni MR, Voltolini C, et al. Biomarkers of Spontaneous Preterm Birth: An Overview of the literature in the last four decades. *Reprod Sci*. 2011;18(11):1046–70.
  11. Taylor BD, Holzman CB, Fichorova RN, et al. Inflammation biomarkers in vaginal fluid and preterm delivery. *Hum Reprod*. 2013;28(4):942–52.
  12. Kim a., Lee ES, Shin JC, Kim HY. Identification of biomarkers for preterm delivery in mid-trimester amniotic fluid. *Placenta*. 2013;34(10):873–8.
-

13. Lee SY, Buhimschi I a, Dulay AT, et al. IL-6 trans-signaling system in intra-amniotic inflammation, preterm birth, and preterm premature rupture of the membranes. *J Immunol*. 2011;186(5):3226–36.
  14. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the proinflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci*. 2012;8(9):1237–47.
  15. Fortunato SJ, Menon R, Swan KF, W LT. Organ culture of amniochorionic membrane in vitro. *Am J Reprod Immunol*. 1994;32:184–7.
  16. 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(3):306.e1–306.e6.
  17. DiGiulio DB, Romero R, Kusanovic JP, et al. Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol*. 2010;64:38–57.
  18. DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2012;17(1):2–11.
  19. 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(6):549–56.
  20. 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.
  21. Menon R, Williams SM, Fortunato SJ. Amniotic fluid interleukin-1 $\beta$  and interleukin-8 concentrations: racial disparity in preterm birth. *Reprod Sci*. 2007;14(3):253–9.
  22. Ryckman K, Simhan H, Krohn M, Willians S. Cervical cytokine network patterns during pregnancy: the role of bacterial vaginosis and geographic ancestry. *J Reprod Immunol*. 2009;79(2):174–82.
  23. Choi SJ, Park SD, Jang IH, Uh Y, Lee A. The prevalence of vaginal microorganisms in pregnant women with preterm labor and preterm birth. *Ann Lab Med*. 2012;32(3):194–200.
  24. Govender S, Theron GB, Odendaal HJ, Chalkley LJ. Prevalence of genital mycoplasmas, ureaplasmas and chlamydia in pregnancy. *J Obstet Gynaecol*. 2009;29(8):698–701.
-

25. Lee SE, Romero R, Kim E-C, Yoon BH. A high Nugent score but not a positive culture for genital mycoplasmas is a risk factor for spontaneous preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009;22(3):212–7.
  26. Chaemsaitong P, Romero R, Korzeniewski SJ, et al. A point of care test for interleukin-6 in amniotic fluid in preterm prelabor rupture of membranes: a step toward the early challenge of acute intra-amniotic inflammation/infection. *J Matern Neonatal Med.* 2015;7058:1–8.
  27. Chaemsaitong P, Romero R, Korzeniewski SJ, et al. A rapid interleukin-6 bedside test for the identification of intra-amniotic inflammation in preterm labor with intact membranes. *J Matern Neonatal Med.* 2015;7058:1–30.
  28. Capoccia R, Greub G, Baud D. *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and adverse pregnancy outcomes. *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26(3):231–40.
  29. Kwak D-W, Hwang H-S, Kwon J-Y, Park Y-W, Kim Y-H. Co-infection with vaginal *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* increases adverse pregnancy outcomes in patients with preterm labor or preterm premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013;7058:1–5.
  30. Kacerovský M, Pavlovský M, Tosner J. Preterm premature rupture of the membranes and genital mycoplasmas. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2009;52(3):117–20.
  31. Yoon B, Romero R, Lim J-H, 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(4):919–24.
  32. Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, et al. A novel molecular microbiologic technique for the rapid diagnosis of microbial invasion of the amniotic cavity and intra-amniotic infection in preterm labor with intact membranes. *Am J Reprod Immunol.* 2014;71(4):330–58.
  33. Musilova I, Bestvina T, Hudeckova M, et al. Vaginal fluid interleukin-6 concentrations as a point-of-care test is of value in women with preterm prelabor rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;215(5):619.e1–619.e12.
  34. Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest.* 2011;121(9):3375–83.
  35. Steel JH, Malatos S, Kennea N, et al. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatr Res.* 2005;57(3):404–11.
-

36. Naessens A, Foulon W, Breynaert J, Lauwers S. Postpartum bacteremia and placental colonization with genital mycoplasmas and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;160(3):647–50.
  37. Aagaard K, Ma J, Antony K, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med.* 2014;6(237):1–22.
  38. Shepard MC, Lunceford CD. Occurrence of urease in T strains of *Mycoplasma*. *J Bacteriol.* 1967;93(5):1513–20.
  39. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):757–89.
  40. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6:a016295.
  41. Reisenberger K, Egarter C, Schiebel I, Obermair A, Kiss H, Lehner R. In vitro cytokine and prostaglandin production by amnion cells in the presence of bacteria. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;176(5):981–4.
  42. Velez DR, Fortunato SJ, Williams SM, Menon R. Interleukin-6 (IL-6) and receptor (IL6-R) gene haplotypes associate with amniotic fluid protein concentrations in preterm birth. *Hum Mol Genet.* 2008;17(11):1619–30.
  43. Yoshimura K, Hirsch E. Interleukin-6 is neither necessary nor sufficient for preterm labor in a murine infection model. *J Soc Gynecol Investig.* 2003;10(7):423–7.
  44. Sadowsky DW, Adams KM, Gravett MG, Witkin SS, Novy MJ. Preterm labor is induced by intraamniotic infusions of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  but not by interleukin-6 or interleukin-8 in a nonhuman primate model. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195(6):1578–89.
  45. Robertson S a., Christiaens I, Dorian CL, et al. Interleukin-6 is an essential determinant of on-time parturition in the mouse. *Endocrinology.* 2010;151(8):3996–4006.
-

---

**Table 1. Challenges used to stimulate fetal membranes *in vitro***

---

---

MH(6) : *Mycoplasma hominis* (10<sup>6</sup> CFU)

---

---

UU(6): *Ureaplasma urealyticum* (10<sup>6</sup> CFU)

---

---

GV(6): *Gardnerella vaginalis* (10<sup>6</sup> CFU)

---

---

MH(6)+UU(6): *M. hominis* + *U. urealyticum* (10<sup>6</sup> CFU)

---

---

MH(6)+UU(6)+GV(6): *M. hominis* + *U. urealyticum* (10<sup>6</sup> CFU)+ *G. vaginalis* (10<sup>6</sup> CFU)

---

---

MH(6)+UU(6)+GV(3): *M. hominis* + *U. urealyticum* (10<sup>6</sup> CFU) + *G. vaginalis* (10<sup>3</sup> CFU)

---

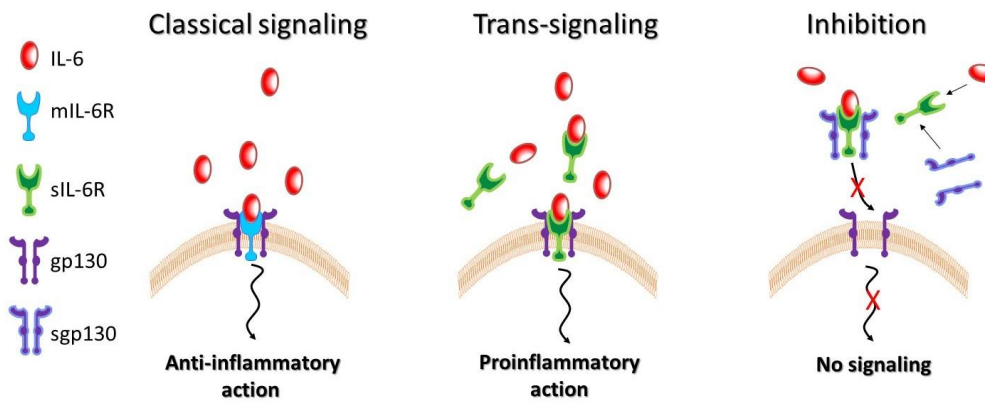
---

MH(3)+UU(3)+GV(6): *M. hominis* + *U. urealyticum* (10<sup>3</sup> CFU) + *G. vaginalis* (10<sup>6</sup> CFU)

---

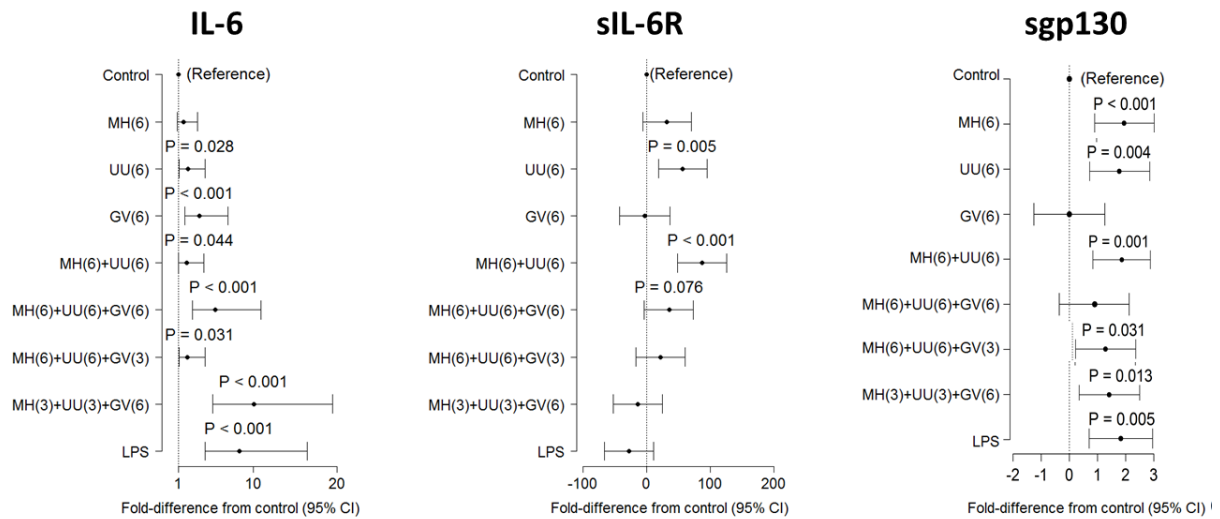
CFU= colony forming unit.

---

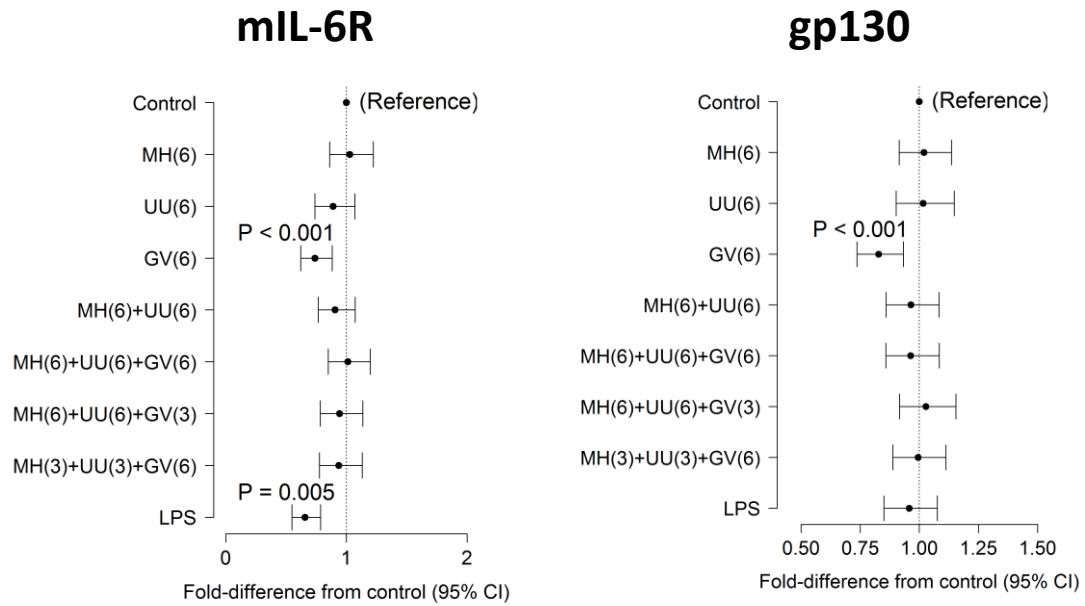


**Figure 1.** Representative model of classical, trans-signaling and inhibition of IL-6 activity.

Classical signaling produces an anti-inflammatory effect when IL-6 binds to mIL-6R along with gp130. Conversely, trans-signaling generates a proinflammatory effect when IL-6 binds to sIL-6R, which binds to gp130. The inhibition of trans-signaling occurs when sgp130 neutralizes IL-6 bioactivity by blocking the IL-6/sIL-6R complex binding to gp130, acting as a natural antagonist of IL6/sIL6R trans-signaling. Modified with permission from I. Buhimschi and C. Buhimschi<sup>13</sup>.

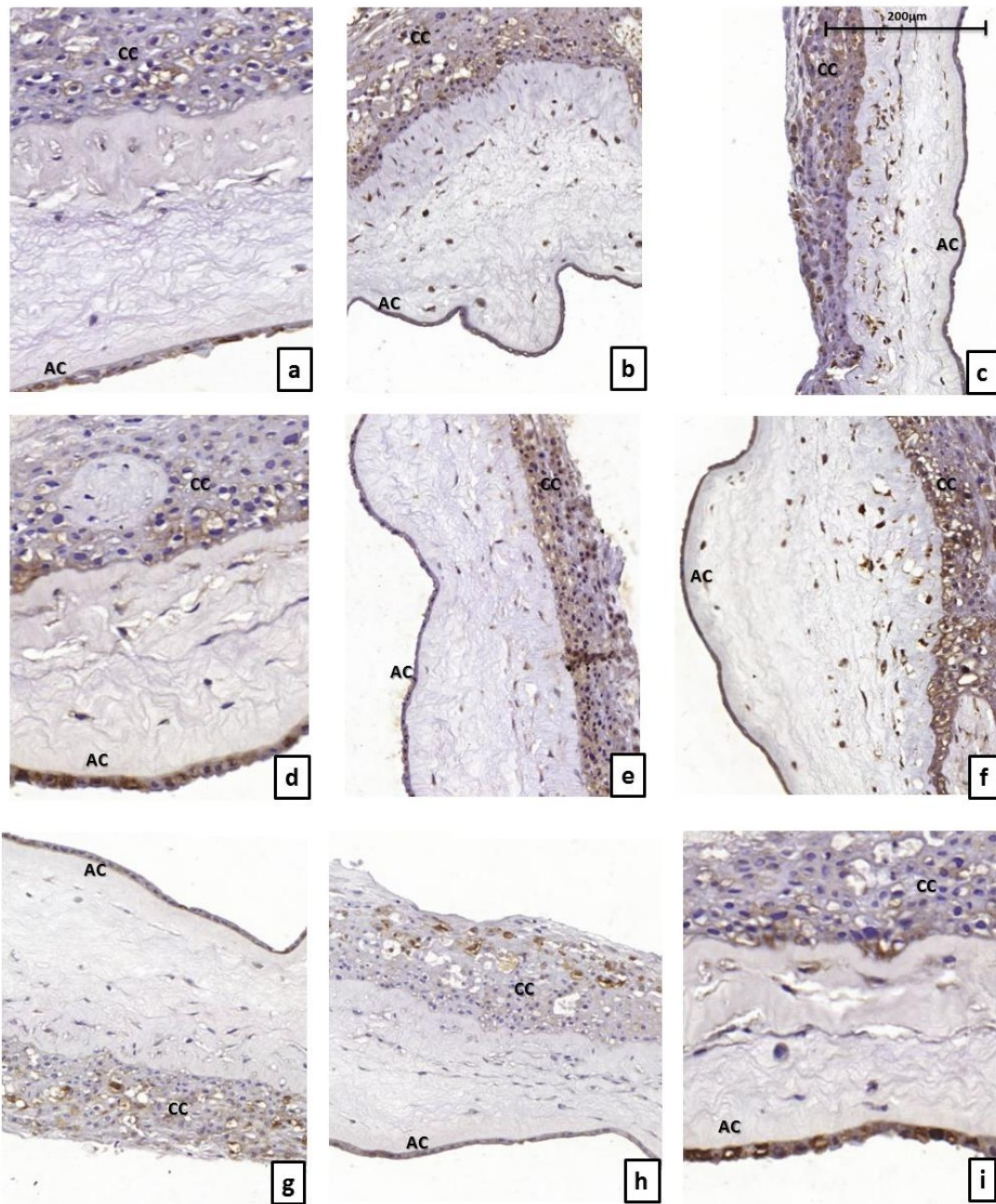


**Figure 2.** Differential signature of IL-6 cytokine and receptors (soluble receptor (sIL-6R) and soluble  $\beta$ -subunit glycoprotein 130 (sgp130)) secreted by fetal membranes maintained in organ explants system. Control = unstimulated, MH(6) = *Mycoplasma hominis* at  $10^6$  CFU, UU(6) = *Ureaplasma urealyticum* at  $10^6$  CFU, GV(6) = *Gardnerella vaginalis* at  $10^6$  CFU, MH(6)+UU(6) = *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* at  $10^6$  CFU, MH(6)+UU(6)+GV(6) = *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* and *Gardnerella vaginalis* at  $10^6$  CFU, MH(6)+UU(6)+GV(3) = *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* at  $10^6$  CFU and *Gardnerella vaginalis* at  $10^3$  CFU, MH(3)+UU(3)+GV(6) = *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* at  $10^3$  CFU and *Gardnerella vaginalis* at  $10^6$  CFU, LPS-lipopolysaccharide.

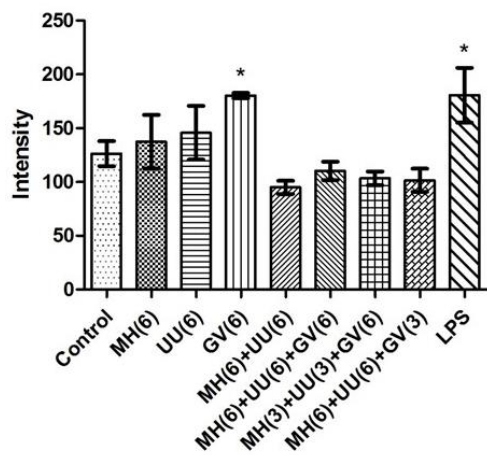


**Figure 3.** The relative mRNA expression of the membrane-bound receptor (mIL-6R) and gp130 receptor by fetal membranes maintained in an organ explants system, in the studied groups: Control = unstimulated, MH(6) = *Mycoplasma hominis* at  $10^6$  CFU, UU(6) = *Ureaplasma urealyticum* at  $10^6$  CFU, GV(6) = *Gardnerella vaginalis* at  $10^6$  CFU, MH(6)+UU(6) = *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* at  $10^6$  CFU, MH(6)+UU(6)+GV(6) = *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* and *Gardnerella vaginalis* at  $10^6$  CFU, MH(6)+UU(6)+GV(3) = *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* at  $10^6$  CFU and *Gardnerella vaginalis* at  $10^3$  CFU, MH(3)+UU(3)+GV(6) = *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* at  $10^3$  CFU and *Gardnerella vaginalis* at  $10^6$  CFU, LPS = lipopolysaccharide.

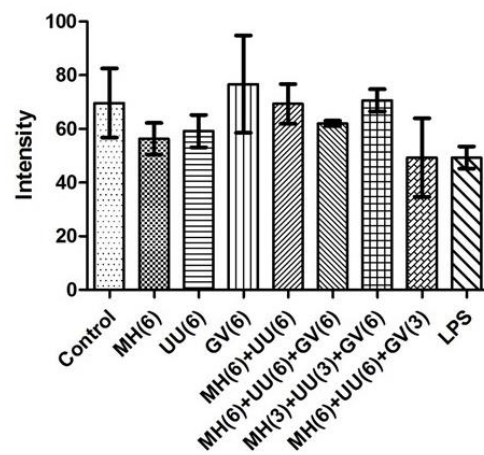
A) mL-6R



B) mL-6R in amnion cells



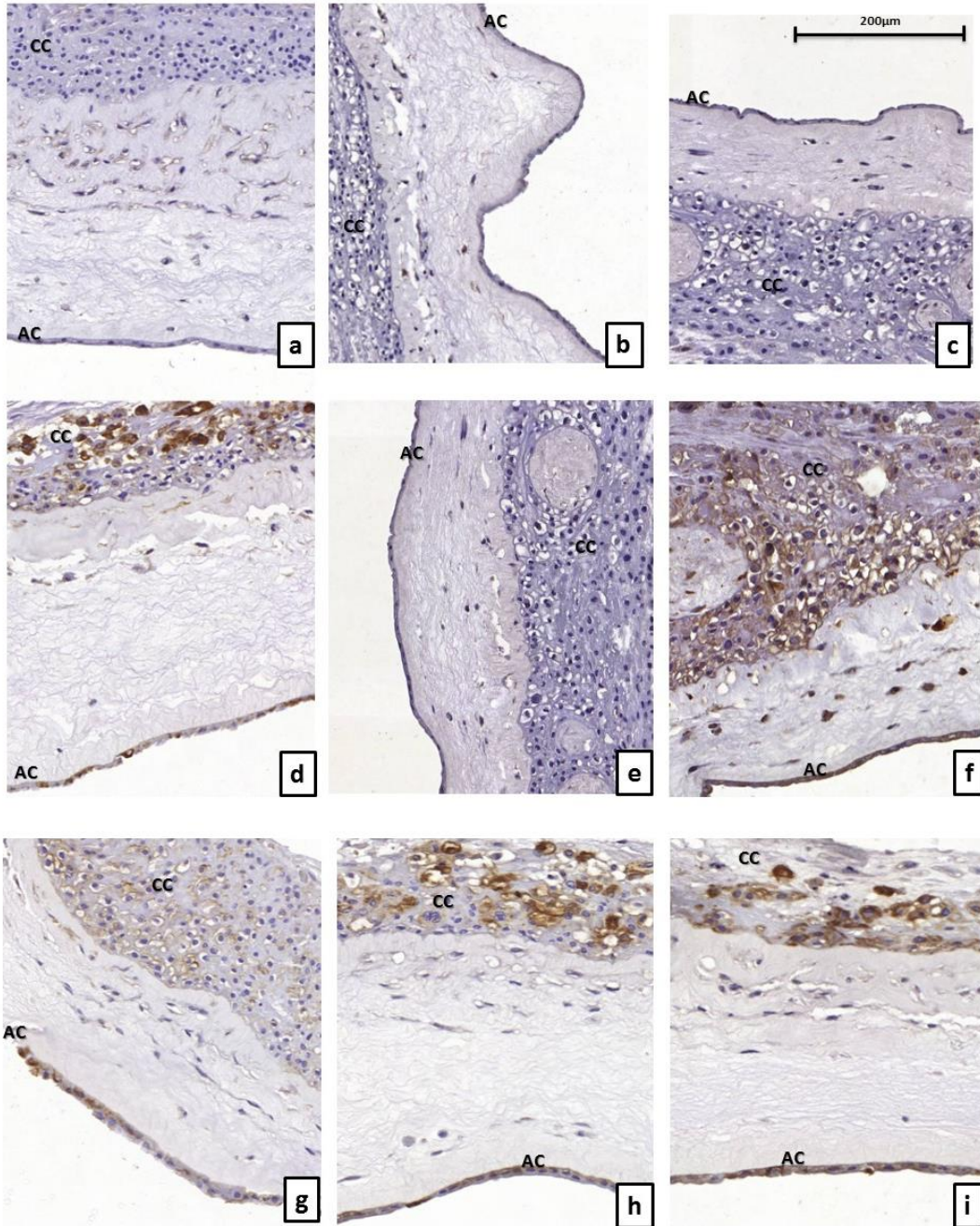
C) mL-6R in chorion cells



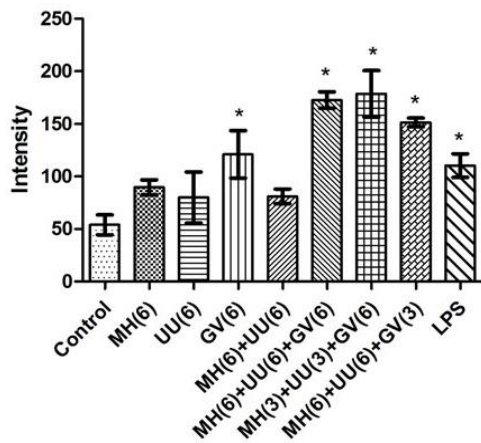
**Figure 4. A)** Immunohistochemical staining for mL-6R in the amnion (ac) and chorion (cc) maintained in an organ explants system for each challenge: **a)** Control = unstimulated, **b)** MH(6) = *Mycoplasma hominis* at  $10^6$  CFU, **c)** UU(6) = *Ureaplasma urealyticum* at  $10^6$  CFU, **d)** GV(6) = *Gardnerella vaginalis* at  $10^6$  CFU, **e)** MH(6)+UU(6) = *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* at  $10^6$  CFU, **f)** MH(6)+UU(6)+GV(6) = *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* and *Gardnerella vaginalis* at  $10^6$  CFU, **g)** MH(6)+UU(6)+GV(3) = *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* at  $10^6$  CFU and *Gardnerella vaginalis* at  $10^3$  CFU, **h)** MH(3)+UU(3)+GV(6) = *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* at  $10^3$  CFU and *Gardnerella vaginalis* at  $10^6$  CFU, **i)** LPS = lipopolysaccharide. **B)** Differential intensity of gp130 in amnion cells by immunohistochemistry in the studied challenges compared to control. \*  $p < 0.001$ . **C)** Differential intensity of gp130 in chorion cells by immunohistochemistry in the studied challenges compared to control.

---

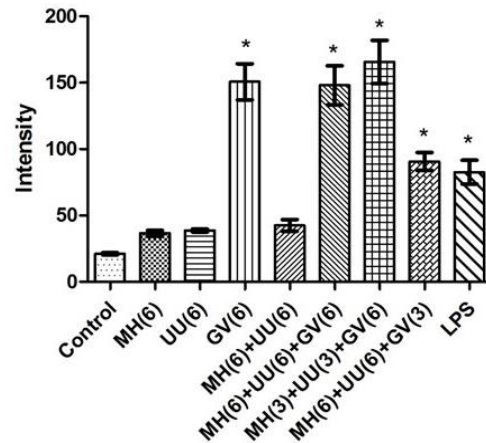
**A) GP130**



**B) gp130 in amnion cells**

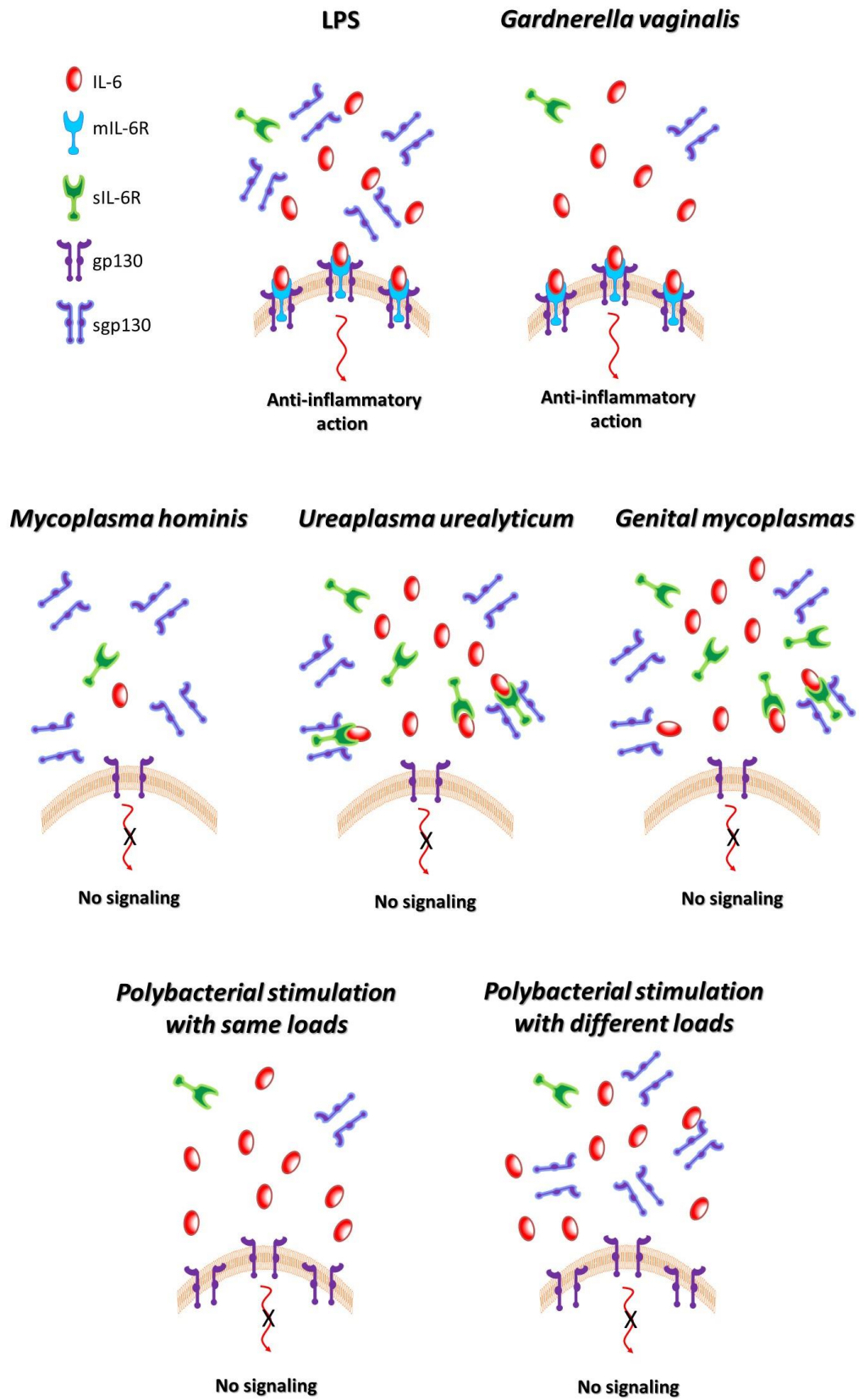


**C) gp130 in chorion cells**



**Figure 5. A)** Immunohistochemical staining for gp130 in the amnion (ac) and chorion (cc) maintained in an organ explants system for each challenge: **a)** Control = unstimulated, **b)** MH(6) = *Mycoplasma hominis* at  $10^6$  CFU, **c)** UU(6) = *Ureaplasma urealyticum* at  $10^6$  CFU, **d)** GV(6) = *Gardnerella vaginalis* at  $10^6$  CFU, **e)** MH(6)+UU(6) = *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* at  $10^6$  CFU, **f)** MH(6)+UU(6)+GV(6) = *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* and *Gardnerella vaginalis* at  $10^6$  CFU, **g)** MH(6)+UU(6)+GV(3) = *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* at  $10^6$  CFU and *Gardnerella vaginalis* at  $10^3$  CFU, **h)** MH(3)+UU(3)+GV(6) = *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* at  $10^3$  CFU and *Gardnerella vaginalis* at  $10^6$  CFU, **i)** LPS = lipopolysaccharide. **B)** Differential intensity of gp130 in amnion cells by immunohistochemistry in the studied challenges compared to control. ANOVA followed by Tukey's test, \*  $p < 0.0001$ . **C)** Differential intensity of gp130 in chorion cells by immunohistochemistry in the studied challenges compared to control. ANOVA followed by Tukey's test, \*  $p < 0.001$ .

---



**Figure 6. Conceptual model for how IL-6 signaling may occur in fetal membranes stimulated with different bacterial combinations *in vitro* based on the expression of IL-6 and factors that affect its biological activities.**

---

## *Conclusões*

---

**Considerando os resultados obtidos nesse estudo, podemos concluir que:**

- 1) Membranas corioamnióticas *in vitro* produzem um perfil distinto de citocinas e receptores pró- e antiinflamatórios em resposta à estimulação por micoplasmas genitais e *G. vaginalis* isolados ou em combinação;
  - 2) *G. vaginalis* induz uma intensa resposta inflamatória nas membranas fetais *in vitro*, enquanto os micoplasmas genitais induzem uma resposta inflamatória moderada que pôde ser regulada após 24 horas. A capacidade dos micoplasmas genitais em suscitar a resposta anti-inflamatória do hospedeiro pode favorecer a sua sobrevivência na cavidade amniótica.
  - 3) O aumento de IL-6 por si só pode não ser indicativo de qualquer função, uma vez que a sua atividade é controlada por diferentes receptores de membrana e solúveis, sendo que sua produção pelas membranas fetais não deve ser mediador funcional das vias indutoras de trabalho de parto. A tentativa de correlacionar o risco de desfecho gestacional adverso baseado exclusivamente nos níveis de IL-6 em fluidos biológicos, sem considerar os receptores de IL-6, podem ser ineficazes.
-

*Anexo*

---

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo in vitro de infecção das membranas corioamnióticas com espécies bacterianas isoladas do trato genital inferior e modulação da resposta imune inata na interface materno-fetal

**Pesquisador:** Márcia Guimarães da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 49314215.4.0000.5411

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.354.209

#### Apresentação do Projeto:

Tratam os autos de Projeto de Pesquisa aprovado pelo CEP em 04/07/2011 antes da vigência do Sistema Plataforma Brasil. Os pesquisadores optaram por lançar o referido projeto na Plataforma Brasil para que dessa forma fosse possível envio de Emenda ao Estudo. Inicialmente esse estudo foi proposto como Pós Doutorado de Jossimara Poletini sobre Supervisão da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Guimarães da Silva.

Neste momento é enviado Emenda com objetivo de inclusão de Subprojeto cujo título é "Estudo in vitro de infecção das membranas corioamnióticas com espécies bacterianas de difícil cultivo detectadas no trato genital inferior" que será objeto de Doutorado de Nathalia Mayumi Noda Nicolau sobre a mesma orientação.

#### Objetivo da Pesquisa:

1. Objetivo Geral:

Determinar, em modelos in vitro de infecção das membranas corioamnióticas com espécies bacterianas de difícil cultivo detectadas no trato genital inferior de gestantes em TPP, as relações entre o status microbiológico e a modulação da resposta imune inata na interface materno-fetal.

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**CEP:** 18.618-970

**Telefone:** (14)3880-1608

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 1.354.209

## 2. Objetivos Específicos:

- Identificar e quantificar as espécies bacterianas presentes na microbiota vaginal de mulheres em trabalho de parto pré-termo, em diferentes idades gestacionais;
- Desafiar membranas corioamnióticas obtidas de gestações de termo com os ATCCs (American Type Culture Collection) das espécies bacterianas mais frequentemente detectadas no trato genital inferior das gestantes em TPP, em diferentes concentrações, para avaliar a expressão gênica e proteica de IL-1 , IL-6 alfa, IL-8, TNF-alfa, PGE2, TLR-2, TLR-4, defensinas e pentraxina-3;
- Determinar a relação de tais mediadores da resposta imune inata e associá-los ao status microbiológico identificado no trato genital de gestantes em trabalho de parto pré-termo.

### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Constam do Parecer 1.260.122, uma vez que serão utilizados os mesmos materiais do Projeto maior.

### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Segundo informação do pesquisador no decorrer da execução do projeto maior foram detectadas espécies bacterianas de difícil cultivo no trato genital inferior, viés este que não era contemplado na proposta inicial, o que justifica a presente Emenda.

### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os pesquisadores postaram o Subprojeto com as alterações referente a proposta da Emenda. Informam também que o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido permaneceu o mesmo do projeto inicial, haja vista não ter sofrido nenhuma alteração. No referido TCLE já constava a análise de diferentes tipos de bactérias.

### **Recomendações:**

Solicitamos o envio de Relatório Final de Atividades em separado do Projeto inicial, bem como do Subprojeto ora proposto.

### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sugiro aprovação do Subprojeto “Estudo in vitro de infecção das membranas corioamnióticas com espécies bacterianas de difícil cultivo detectadas no trato genital inferior” que será objeto de Doutorado de Nathalia Mayumi Noda Nicolau sobre orientação da Profª Drª Márcia Guimarães Silva.

**Endereço:** Chácara Butignolli , s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**CEP:** 18.618-970

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1608

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 1.354.209

Solicitamos o envio de Relatório Final de Atividades em separado do Projeto inicial, bem como do Subprojeto ora proposto.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O CEP em reunião de 07/12/2015, APROVOU, sem necessidade de envio à CONEP o Subprojeto “Estudo in vitro de infecção das membranas corioamnióticas com espécies bacterianas de difícil cultivo detectadas no trato genital inferior” que será objeto de Doutorado de Nathalia Mayumi Noda Nicolau sobre orientação da Profª Drª Márcia Guimarães Silva.

Ao final da execução do SubProjeto em questão deverá ser enviado ao CEP na forma de "NOTIFICAÇÃO", o respectivo Relatório Final de Atividades.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_610273 E1.pdf	25/11/2015 11:19:49		Aceito
Outros	Carta_CEP_Subprojeto.doc	25/11/2015 11:18:35	Márcia Guimarães da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_Nathalia_CEP.doc	25/11/2015 10:55:08	Márcia Guimarães da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_1.doc	16/09/2015 16:29:55	Márcia Guimarães da Silva	Aceito
Parecer Anterior	Aprovação CEP.pdf	11/08/2015 17:04:57		Aceito
Outros	Declaração de não envio de amostras para o exterior.pdf	11/08/2015 09:31:01		Aceito
Outros	Declaração e cronograma.JPG	11/08/2015 09:28:43		Aceito
Outros	Tradução da carta de aceite do pesquisador do exterior.JPG	11/08/2015 09:27:47		Aceito
Outros	Declaração pesquisador do exterior.JPG	11/08/2015 09:27:02		Aceito
Outros	Autorização GO.JPG	11/08/2015 09:25:47		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorização para manipular livro de registro.JPG	11/08/2015 09:25:34		Aceito
Declaração de Instituição e	Autorização para manipular prontuários.JPG	11/08/2015 09:25:13		Aceito

**Endereço:** Chácara Butignolli , s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**CEP:** 18.618-970

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1608

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 1.354.209

Infraestrutura	Autorização para manipular prontuários.JPG	11/08/2015 09:25:13		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.JPG	11/08/2015 09:24:46		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE fase2.JPG	11/08/2015 09:24:38		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE fase1.JPG	11/08/2015 09:24:28		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BOTUCATU, 07 de Dezembro de 2015

---

**Assinado por:**  
**SILVANA ANDREA MOLINA LIMA**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Chácara Butignolli , s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**CEP:** 18.618-970

**Telefone:** (14)3880-1608

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br