

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

**EXPRESSÃO DE  $\beta$  DEFENSINAS POR  
MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS DE  
GESTAÇÕES PRÉ-TERMO COMPLICADAS  
POR CORIOAMNIONITE**

**Juliana Takitane**

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas - Modalidade Médica.

Botucatu

2009

Juliana Takitane

**EXPRESSÃO DE  $\beta$  DEFENSINAS POR  
MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS DE  
GESTAÇÕES PRÉ-TERMO COMPLICADAS POR  
CORIOAMNIONITE**

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas - Modalidade Médica.

Botucatu

2009

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

Takitane, Juliana.

Expressão de  $\beta$  defensinas por membranas corioamnióticas de gestações pré-termo complicadas por corioamnionite / Juliana Takitane. - Botucatu [s.n], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade Médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientadora: Márcia Guimarães da Silva

1. Biologia molecular 2. Parto

Palavras-chave: Corioamnionite; Defensinas; Membranas corioamnióticas; Parto pré-termo; PCR em tempo real

# *Agradecimientos*

*Agradeço a Deus por permitir que eu desfrute diariamente o precioso dom da vida.*

*Agradeço aos meus pais, Luiz e Mariço, pelo amor incondicional. Vocês são os meus maiores exemplos de caráter e determinação.*

*Agradeço aos meus irmãos, Mariana e Roberto, por todo amor ao longo desses anos. Às vezes não notamos, mas a cumplicidade é tal que as palavras se tornam desnecessárias quando queremos dizer algo.*

*Agradeço à minha tia, Izabel, por ter me recebido de braços abertos quando cheguei a Botucatu. Foi muito importante para mim durante esses quatro anos saber que poderia contar com sua ajuda a qualquer momento.*

*Agradeço à minha “veterana”, Michele “Kyoto”, pelo incentivo e pelas palavras de apoio antes da minha aprovação no vestibular. E, superada esta etapa, me ajudou muito durante minha fase de adaptação e continua me ajudando em tudo que preciso.*

*Agradeço à minha orientadora, Profa. Márcia Guimarães da Silva,, que desde o primeiro contato já despertou minha admiração. Sempre com muita competência, garra e otimismo sabe driblar todas as adversidades que porventura venham a surgir.*

*Agradeço à doutoranda, Jossimara Poletini, por todos os ensinamentos, não apenas “acadêmicos”, como também lições de vida. A definição que deram a você, de “uma pessoa com a qual podemos contar para o que quer que seja, a qualquer hora”, não poderia servir a outra pessoa que não você.*

*Agradeço a todas as meninas do Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-fetal pela amizade que nasceu este ano: Bruna “Chandelle” (tudo bem, não vou te perturbar mais por causa da sua fome insaciável), Carol (não, Carol, jamais vou pensar coisas ruins sobre você), Camila, Danielle “Xuxalenha” (uma pessoa que se mostrou muito especial para mim e que tive a felicidade de ter me aproximado ainda mais), Eliane, Heloísa “K-lúnia” (que prometeu me fazer feliz e cumpriu o que disse), Jossimara, Larissa “Mam’s” (companheira de ambulatório e coletas no CSE), Laura, Mariana “Carijó”, Mariana “Pip’s”, Natália “Top’s” (apesar de ser minha amiga secreta, não quero esconder de ninguém a admiração que tenho por você, com esse coração enorme e bondoso. Daqui para frente, nada de altos e baixos, ok!?). Agradeço também aos “agregados”, Maíra e Igor, que sempre com muito bom humor aguentava os momentos de “loucura” de toda essa mulherada.*

*Agradeço aos docentes, residentes e funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, sempre prontamente dispostos a nos auxiliar. Aproveito para deixar registrado meu enorme carinho pelos funcionários do Laboratório de Histologia, José Carlos, Eduvaldo, Ronaldo e Milena. Vocês são demais!*

*Agradeço a todas as gestantes que participaram desse e de outros trabalhos realizados em nosso laboratório.*

*Agradeço aos residentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e às enfermeiras do Centro Obstétrico pela colaboração com a pesquisa.*

*Agradeço ao Prof. João Pessoa Araújo Junior e alunos do Departamento de Microbiologia e Imunologia por permitir e auxiliar o uso do aparelho de PCR em tempo real.*

*Agradeço à minha supervisora, Profa. Vera Lúcia Mores Rall, por ter aceitado estabelecer mais este vínculo entre a Faculdade de Medicina e o Instituto de Biociências.*

*Agradeço a todos os “veteranos”, em especial aos da XLI Turma de Biomedicina, pela “integração” e pela ajuda quando tudo parecia não fazer sentido.*

*Agradeço aos meus amigos da XLII Turma de Biomedicina, especialmente a Karen “Kuentro” (minha “filha” e companheira de casa), Larissa “Akúzada” (muitos momentos, de muita risada) e meninos da República Só-kanela (noites de “The Riddle”, “Imagem e Ação”... Sensacional!), pelos momentos inesquecíveis.*

*Agradeço à “Física-biomédica”, Cristina “Tostines”, pelo companheirismo, amizade e momentos de muita alegria durante esses anos.*

*Agradeço aos meus amigos de Marília, em especial Camila, Mariana, Mariane, Melina e Priscila, por estarem sempre ao meu lado.*

*Agradeço à FAPESP pela concessão da Bolsa de Estudos de Iniciação Científica, processo 2009/50663-0 e Auxílio-Financeiro, processo 2009/52317-2.*

# *Sumário*

## SUMÁRIO

<b>1. Resumo</b> .....	08
<b>2. Introdução</b> .....	10
<b>3. Objetivo</b> .....	13
<b>4. Material e Métodos</b> .....	15
4.1. Constituição dos grupos de estudo.....	15
4.2. Colheita das membranas corioamnióticas.....	16
4.3. Análise histopatológica das membranas corioamnióticas.....	16
4.4. Detecção de $\beta$ defensinas por PCR em tempo real.....	16
4.4.1. Extração de RNA.....	16
4.4.2. Obtenção de cDNA .....	17
4.4.3. PCR.....	17
4.5. Análise Estatística.....	18
<b>5. Resultados</b> .....	20
5.1. Características das pacientes.....	20
5.2. Análise histopatológica das membranas corioamnióticas.....	21
5.3. Expressão de HBD-1, HBD-3 e HBD-4 pelas membranas corioamnióticas.....	23
<b>6. Discussão</b> .....	26
<b>7. Referências</b> .....	30
<b>Anexos</b> .....	35

*Resumo*

## 1. Resumo

**Introdução:** As membranas corioamnióticas são barreiras mecânicas contra a ascensão de microrganismos e possuem papel fundamental no sistema imune inato. Quando é invadida por microrganismos apresenta corioamnionite aguda, que é a infiltração das membranas fetais por leucócitos polimorfonucleares. Entretanto as membranas têm efeito inibitório sobre o crescimento de muitas bactérias, em parte, pela produção de  $\beta$  defensinas. **Objetivo:** Quantificar a expressão de  $\beta$  defensinas (HBD1, 3 e 4) por membranas corioamnióticas de gestações complicadas por corioamnionite. **Material e Métodos:** Foram incluídos no estudo 40 fragmentos de membranas corioamnióticas, com diagnóstico histológico de corioamnionite, provenientes de gestações complicadas por rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT) e/ou trabalho de parto prematuro (TPP) que apresentaram parto prematuro como desfecho gestacional, constituindo o grupo estudo (G1). Como grupo controle (G2), foram avaliadas 40 membranas corioamnióticas, com ausência de corioamnionite e pareadas pela idade gestacional ao grupo estudo. Fragmentos das membranas corioamnióticas foram encaminhados à análise histopatológica para confirmação de corioamnionite histológica. Outros fragmentos de 1cm<sup>2</sup> das membranas foram acondicionados em *RNA later* e submetidos à extração de RNA total. Após a extração do RNA, as amostras com concentração entre 0,02 e 0,2 $\mu$ g/  $\mu$ L de RNA foram submetidas à obtenção de cDNA e posterior utilização na quantificação da expressão de  $\beta$  defensinas pela técnica da PCR em tempo real empregando-se o sistema TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays. **Resultados:** Em relação às variáveis sócio-demográficas, as porcentagens de mulheres que referiram união estável, cor branca e hábito tabagista foram similares entre os grupos estudados. Em relação às variáveis obstétricas não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos G1 e G2. O RNAm de HBD-1, HBD-3 e HBD-4 foi detectado em 90% das amostras do grupo G1 e em 73% do G2. Não houve diferença estatisticamente significativa na quantificação relativa de RNAm de HBD-1, HBD-3 e HBD-4, pelas membranas corioamnióticas, entre os grupos G1 e G2. Em relação à complicação gestacional que originou o parto prematuro como desfecho gestacional, RPM-PT ou TPP, a quantificação relativa de HBD-1, HBD-3 e HBD-4 não mostrou diferença estatisticamente significativa, seja na ausência ou presença de corioamnionite. **Conclusões:** As membranas corioamnióticas são fontes de  $\beta$  defensinas e a expressão de HBD-1, HBD-3 e HBD-4 não está associada com presença de corioamnionite histológica.

# *Introdução*

## 2. Introdução

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, a de manutenção do volume do líquido amniótico e a de proteção do cordão umbilical e do sangue fetal contra compressão, além de servirem como barreira contra infecções advindas do trato genital inferior<sup>1</sup>.

A estrutura multiestratificada das membranas fetais é constituída tanto de elementos de tecido conectivo quanto de elementos de tecido epitelial. O epitélio amniótico é formado por monocamada de células epiteliais colunares que reveste a cavidade amniótica<sup>2</sup>. É a camada mais profunda e está em contato direto com o líquido amniótico. O âmnio e cório são conectados pela matriz extracelular (MEC)<sup>3</sup> e repousam sobre a decídua reflexa, constituindo o cório leve e, acima dos cotilédones, originando a membrana corial. O âmnio, que se localiza internamente e em contato com o feto, apresenta-se liso, translúcido e delgado, enquanto o cório é mais externo, está em proximidade com a cavidade uterina e apresenta-se irregular e opaco, sendo mais espesso na membrana corial e mais delgado no cório leve. A MEC, complexo de proteínas e glicoproteínas que envolvem as células dos mais diversos tecidos, composta principalmente por colágenos, disposta em complexa rede, é responsável pela resistência mecânica desse tecido. Os colágenos dos tipos I, III, IV, V e VI são os principais constituintes da MEC, juntamente com as proteoglicanas, nas quais as fibras de proteínas estão inseridas<sup>4</sup>. Os diversos tipos de colágenos da MEC são submetidos à rotatividade constante durante toda gestação com a finalidade de acomodar o volume e a tensão crescente do feto com o progresso gestacional<sup>5,6</sup>.

Além de revestir a superfície placentária e constituir o saco amniótico, as membranas fetais desempenham as funções de manutenção das condições ideais de esterilidade do líquido amniótico e de ser barreira imunológica. Estudos recentes têm mostrado esse papel das membranas fetais, uma vez que esse tecido expressa agentes antimicrobianos<sup>7</sup> e componentes do sistema imune inato, como os receptores *Toll-like* (TLR)<sup>8</sup>.

A característica principal da imunidade inata é a sua habilidade em reconhecer uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias Gram

positivas e negativas, fungos e vírus. Nesse contexto, os antimicrobianos naturais (AN), produzidos especialmente pelas células epiteliais, participam da defesa primária do hospedeiro, através do reconhecimento e neutralização dos microrganismos invasores<sup>9</sup>.

Alguns pequenos peptídeos catiônicos antimicrobianos, chamados  $\alpha$ -defensinas humanas (HNPs - *human neutrophil peptides*) e  $\beta$ -defensinas humanas (HBDs) têm sido descritos. As HNPs 1-4 estão presentes nos grânulos azurófilos nos neutrófilos e têm um importante papel no extermínio não dependente de oxigênio de bactérias<sup>10</sup>, enquanto as HBDs constituem o maior grupo de antimicrobianos naturais e são produzidas por células epiteliais<sup>11</sup>. Existem 28 sequências de HBDs já detectadas no genoma humano<sup>12</sup>, porém as HBDs 1-4 têm sido estudadas com maiores detalhes na última década<sup>13</sup>. A primeira, HBD1, foi isolada de hemofiltrados<sup>14</sup> e, entre outros tecidos, é expressa no trato geniturinário<sup>15,16</sup>, respiratório<sup>17</sup> e no tecido placentário<sup>7</sup>. A expressão constitutiva da HBD1 está bem estabelecida em diversos tecidos<sup>18,19,20</sup> e nesses casos, sua expressão não é afetada pela produção de mediadores inflamatórios. Por outro lado, estudos recentes mostram que esse antimicrobiano natural pode também ser produzido sob estímulos microbianos<sup>21,22,23</sup>. A HBD2 foi inicialmente identificada em queratinócitos<sup>24</sup> e no epitélio pulmonar<sup>25</sup>, sendo que sua expressão mais prevalente é observada na pele<sup>26</sup> e no trato respiratório<sup>17,25</sup>. Diferente do que ocorre com a HBD1, durante a resposta inflamatória e/ou invasão microbiana as HBD2 são produzidas em resposta às citocinas inflamatórias<sup>27,28</sup> ou aos produtos bacterianos<sup>25</sup>. Com uma particularidade especial de formação de dímeros, a expressão de HBD3 já foi relatada em tecidos não reprodutivos como os da cavidade oral<sup>29</sup>, pulmão<sup>12</sup> e tecido ósseo<sup>30</sup>. Recentemente, a HBD3 foi detectada no útero e no endométrio<sup>31,32</sup>, tendo sua expressão mais elevada nas fases inicial e tardia da fase secretória do ciclo menstrual. A HBD4 foi caracterizada através do genoma e, embora já identificada no endométrio<sup>33</sup>, pouco se sabe sobre a expressão e regulação dessa defensina em outros sistemas.

Em adição ao seu papel antimicrobiano, as HBDs podem também ativar a imunidade adaptativa durante o processo infeccioso, através da ação quimiotática a componentes do sistema imune, como células dendríticas, células T<sup>34</sup> e macrófagos<sup>31</sup>. Além disso, experimentos *in vitro* demonstraram que o recrutamento

de células dendríticas imaturas por  $\beta$  defensina 2 murina depende da ativação de TLR-4, indicando que esse AN é um sinalizador endógeno desse receptor<sup>35</sup>. Recentemente, Funderburg et al.<sup>36</sup> descreveram que a ativação de NF-kB pela HBD3 depende da expressão de TLR-1 e TLR-2 e, através da interação com essas moléculas, pode promover ativação de monócitos e de células dendríticas maduras, consolidando que as HBDs são também pontes entre os sistemas imune inato e adaptativo.

No trato reprodutivo de mulheres não grávidas os AN estão presentes na vagina, cérvix, endométrio e nas tubas uterinas<sup>37,38</sup>. Na gestação, agentes antimicrobianos são encontrados no líquido amniótico<sup>39,40</sup>, decídua, placenta e membranas fetais<sup>7,20,41,42</sup>. Essa expressão especialmente pelas membranas fetais pode ser importante durante o trabalho de parto e nascimento, quando o muco cervical é perdido e a cérvix está dilatada, tornando o útero mais susceptível a infecções. Células amnióticas e coriônicas, obtidas de gestação de termo, foram descritas como tendo efeito inibitório sobre o crescimento de muitas bactérias e isto foi sugerido, em parte, pela produção de antimicrobianos endógenos por esse tecido<sup>43</sup>. Outros estudos mostraram que vários antimicrobianos incluindo HBD2 são superestimulados por citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$ , seja por tecidos gestacionais<sup>28,44</sup> como em outros sistemas<sup>25,45</sup>. Nesse mesmo contexto, a expressão de RNA mensageiro de HBD2 esteve aumentada, em 104 vezes, em cultura de células trofoblásticas de placentas de termo tratadas com IL-1 $\beta$  na concentração de 10ng/mL<sup>7</sup>. Esses achados mostram a importância dos antimicrobianos naturais na proteção uterina durante infecção da cavidade amniótica, e nesse sentido, já é sugerido que a análise proteômica do líquido amniótico seja uma ferramenta de reconhecimento de presença de corioamnionite histológica<sup>46</sup>.

A corioamnionite histológica, definida pela infiltração das membranas fetais por leucócitos polimorfonucleares, ocorre na maioria dos casos, na ausência de sinais clínicos e sintomas de infecção, e este diagnóstico pode ser feito em mais de 20% das gestações de termo e em mais de 50% dos partos pré-termo<sup>47-49</sup>. Estudos recentes encontraram relação positiva entre a presença de defensinas neutrofílicas no líquido amniótico e no plasma materno, de gestação pré-termo, na presença de infecção intrauterina<sup>50,51</sup>. Soto et al.<sup>40</sup> descreveram aumento de HBD2 no líquido amniótico em casos de infecção e/ou inflamação na cavidade amniótica em casos de

trabalho de parto pré-termo (TPP) e rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT), demonstrando que essa defensina é um constituinte do líquido amniótico e participa da resposta antimicrobiana. A fonte de HBD2 no líquido amniótico ainda é incerta, porém é possível que as membranas corioamnióticas contribuam como fonte desse antimicrobiano natural, uma vez que a expressão de seu RNAm já foi relatada no cório e em células derivadas de epitélio amniótico<sup>38,44</sup>. Sob estímulos inflamatórios, a HBD3 é a  $\beta$ -defensina mais abundante e mais expressa em células de epitélio amniótico<sup>42</sup>. Nesse contexto, Szukiewicz et al.<sup>52</sup> descreveram que na presença de RPM-PT e corioamnionite, as células amnióticas estimuladas com LPS apresentam significativo aumento de expressão de HBD3 em relação à gestação de termo. No entanto, a literatura ainda é escassa em relação à atividade e expressão das HBDs nos tecidos gestacionais pré-termo e / ou na presença de infecção da cavidade amniótica.

Considerando que eventos inflamatórios na cavidade amniótica estão pronunciados nas gestações pré-termo como em gestações complicadas por RPM-PT e TPP associados à corioamnionite histológica e que as membranas corioamnióticas têm efeito inibitório sobre o crescimento de muitas bactérias, em parte, pela produção de  $\beta$  defensinas, a avaliação da produção e expressão desses antimicrobianos naturais pelas membranas corioamnióticas poderão contribuir para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nessas complicações gestacionais.

### **3. Objetivo**

O objetivo desse estudo foi quantificar a expressão de  $\beta$  defensinas por membranas corioamnióticas de gestações complicadas por corioamnionite histológica.

# *Material e métodos*

## **4. Material e métodos**

### **4.1. Constituição dos grupos de estudo**

Foram incluídos no estudo 40 fragmentos de membranas corioamnióticas, com diagnóstico histológico de corioamnionite, provenientes de gestações complicadas por rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT) e/ou trabalho de parto prematuro (TPP) que apresentaram parto prematuro como desfecho gestacional, constituindo o grupo estudo (G1). Como grupo controle (G2), foram avaliadas 40 membranas corioamnióticas, com ausência de corioamnionite e pareadas pela idade gestacional ao grupo estudo. Todas essas membranas foram coletadas no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  no Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Foram excluídas do estudo as membranas corioamnióticas de gestações complicadas por diabetes, anomalias fetais congênitas comprovadas, gemelaridade e placenta prévia.

A idade gestacional das pacientes incluídas no estudo foi estabelecida pela data da última menstruação e/ou por exame ultrassonográfico precoce (até 20 semanas). Nas gestantes que apresentaram RPM-PT, o diagnóstico foi confirmado pela história clínica e constatação de líquido amniótico na cavidade vaginal ou quando isto não foi possível, por meio de testes realizados na secreção do fundo de saco vaginal: cristalização do esfregaço em lâmina seca, queima de esfregaço em lâmina, pH vaginal e pesquisa de células fetais pela coloração do azul de Nilo. O diagnóstico de TPP foi confirmado pela presença de uma ou mais contrações a cada 10 minutos com ritmo e frequência regulares e esvaecimento cervical igual ou superior a 50% e/ou dilatação cervical igual ou superior a 2 cm<sup>53</sup>. Nesses casos, as pacientes permaneceram internadas na Enfermaria de Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, sendo controladas clinicamente por meio de avaliação da frequência cardíaca e temperatura a cada 6 horas e, laboratorialmente, por hemograma em dias alternados até a resolução da gestação.

Todas as gestantes envolvidas no estudo foram informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido,

após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (Anexo 1).

#### **4.2. Colheita das membranas corioamnióticas**

No momento da resolução da gestação, logo após a dequitação, foram colhidas membranas corioamnióticas de todas as gestantes incluídas no estudo. Foram retirados fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> da borda das membranas, com bisturi, que foram acondicionados em tubos de 1,5 mL tipo *ependorf* contendo RNA later<sup>TM</sup> (RNA Stabilization Reagent - Qiagen) por 4 horas. Após esse período, os fragmentos foram transferidos para novo tubo e imediatamente armazenados a -80°C até o processamento. Após esse procedimento, o restante das membranas foi acondicionado em recipiente apropriado, contendo formalina a 10%, por 24 horas para fixação. Fragmentos das membranas corioamnióticas foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol e a seguir incluídos em blocos de parafina. Os blocos obtidos foram seccionados em micrótomo comum, obtendo-se cortes de 6  $\mu$ m de espessura que foram montados em lâminas de vidro. As lâminas foram coradas pelo método clássico de Hematoxilina-Eosina (HE) para a análise histopatológica das membranas.

#### **4.3. Análise histológica das membranas corioamnióticas**

A corioamnionite histológica foi diagnosticada através da presença de infiltração neutrofílica presente nas membranas corioamnióticas, de acordo com Yoon et al.<sup>54</sup>.

#### **4.4. Detecção de $\beta$ defensinas por PCR em tempo real**

##### **4.4.1. Extração de RNA**

Os fragmentos de membranas corioamnióticas coletados conforme descrito no item 4.2 foram retirados dos tubos tipo *ependorf* e submetidos à extração de RNA total, usando o kit RNASpin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare), seguindo

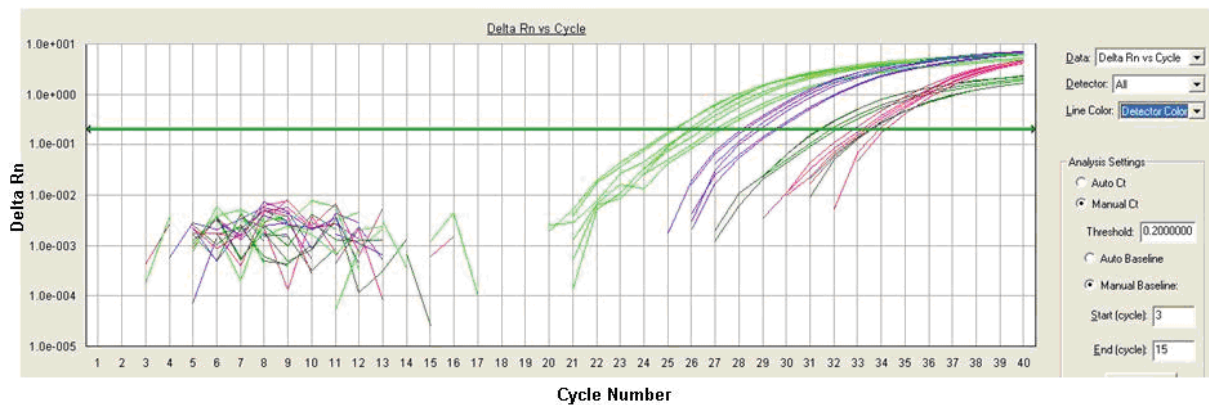
as instruções do fabricante. Após o término da extração, a eficácia do tratamento com a DNase foi verificada por amplificação do gene constitutivo da  $\beta$ -globina por PCR direta, seguida de visualização em gel de agarose 1,5%. As amostras que não apresentaram essa amplificação foram incluídas no estudo e o RNA extraído foi quantificado pela leitura em aparelho NanoDrop, na absorvância de 260nm (A260). A pureza do RNA obtido foi determinada pela razão da absorvância de 260nm pela absorvância de 280nm (A260/A280). Foram consideradas aceitáveis as razões entre 1,8 e 2,1.

#### 4.4.2. Obtenção de cDNA

Em seguida à extração do RNA, as amostras com concentração entre 0,02 e 0,2 $\mu$ g/ $\mu$ L de RNA foram submetidas à obtenção de cDNA utilizando-se o *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA produzido foi armazenado a -80°C para posterior utilização na detecção e quantificação das  $\beta$  defensinas pela técnica de PCR em tempo real.

#### 4.4.3. PCR

A partir do cDNA obtido foi efetuada a amplificação dos genes das  $\beta$  defensinas de interesse. Os *primers* e sondas específicos para HBDs 1, 3 e 4 foram obtidos do sistema TaqMan<sup>®</sup> da Applied Biosystems (Hs00174765\_m1, Hs00218678\_m1, Hs00175474\_m1) e, paralelamente, foi realizada a amplificação do gene da TBP (TATA box binding protein) (Hs99999910\_m1) como controle endógeno da reação. A amplificação foi realizada em aparelho ABI *Prism* 7300 que contém uma unidade ótica que permite monitorar o aumento da concentração de produto de PCR em tempo real (Figura 1). O *Threshold cycle* foi determinado através do 7000 System SDS Software 1.2.3, e os níveis de expressão do RNAm das  $\beta$  defensinas avaliadas foram normalizados com a expressão de TBP com a fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , segundo Pfaffl<sup>55</sup>.



**Figura 1.** Amplificação da PCR em tempo real dos genes TBP (verde claro), HBD-1 (roxo), HBD-3 (verde escuro) e HBD-4 (rosa).

#### 4.5. Análise Estatística

Os dados referentes à idade materna, idade gestacional no momento do parto e concentração relativa de RNAm das defensinas nos grupos estudados foram submetidos ao teste de Mann-Whitney. As variáveis estado civil, raça, hábito de fumar, ocorrência de RPM-PT e TPP, via de parto, paridade e frequência de intercorrências gestacionais anteriores foram submetidas ao teste de comparação de proporção (Teste z). O nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5%. O software utilizado para as análises foi o SigmaStat 3.1 (Jandel Corporation).

*Resultados*

## 5. Resultados

### 5.1. Características das pacientes

As variáveis sócio-demográficas e obstétricas das pacientes incluídas no estudo estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. A mediana da idade materna e da idade gestacional, no momento do parto, não foi estatisticamente diferente entre os grupos estudados.

Em relação às variáveis sócio-demográficas, as porcentagens de mulheres que referiram união estável, cor branca e hábito tabagista foram similares entre os grupos de estudo. Em relação às variáveis obstétricas: ocorrência de RPM-PT, TPP, via de parto, paridade, intercorrências em gestações anteriores e peso do recém-nascido, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos G1 e G2.

**Tabela 1.** Variáveis sócio-demográficas das gestantes incluídas no estudo.

Variáveis	G1 (n=39)	G2 (n=38)
<b>Idade (anos)*</b>	24 (14-40) <sup>a</sup>	20 (14-56) <sup>a</sup>
<b>Estado civil**</b>		
<b>Solteira</b>	10 (25,6%) <sup>a</sup>	5 (13,2%) <sup>a</sup>
<b>União estável</b>	29 (74,4%) <sup>a</sup>	33 (86,8%) <sup>a</sup>
<b>Raça**</b>		
<b>Branca</b>	34 (87,2%) <sup>a</sup>	32 (84,2%) <sup>a</sup>
<b>Não-branca</b>	5 (12,8%) <sup>a</sup>	6 (15,8%) <sup>a</sup>
<b>Tabagismo**</b>	10 (25,6%) <sup>a</sup>	4 (10,5%) <sup>a</sup>

Na comparação dos grupos foram utilizadas letras minúsculas, considerando-se que as proporções seguidas de, pelo menos, uma mesma letra não diferem.

\* Mediana (min-máx)

\*\* n (%)

**Tabela 2.** Características obstétricas das gestantes incluídas no estudo.

Características obstétricas	G1 (n=39)	G2 (n=38)
Ocorrência de RPM-PT**	25 (64%) <sup>a</sup>	20 (53%) <sup>a</sup>
Ocorrência de TPP **	14 (36%) <sup>a</sup>	18 (47%) <sup>a</sup>
Via de parto**		
Vaginal	22 (56,4%) <sup>a</sup>	24 (63,2%) <sup>a</sup>
Cesárea	17 (43,6%) <sup>a</sup>	14 (36,8%) <sup>a</sup>
Idade gestacional no momento do parto*	34s (25s2d – 36s6d) <sup>a</sup>	33s1d (25s5d – 36s6d) <sup>a</sup>
Paridade**		
Primigesta	17 (43,6%) <sup>a</sup>	19 (50%) <sup>a</sup>
Secundigesta	11 (28,2%) <sup>a</sup>	9 (23,7%) <sup>a</sup>
Multigesta	11 (28,2%) <sup>a</sup>	10 (26,3%) <sup>a</sup>
Peso do recém-nascido (g)*	2020 (695-3175) <sup>a</sup>	2047,5 (590-3245) <sup>a</sup>
Intercorrências gestacionais anteriores		
RPM	8/22 <sup>a</sup>	5/19 <sup>a</sup>
Aborto	10/22 <sup>a</sup>	6/19 <sup>a</sup>
TPP	8/22 <sup>a</sup>	10/19 <sup>a</sup>

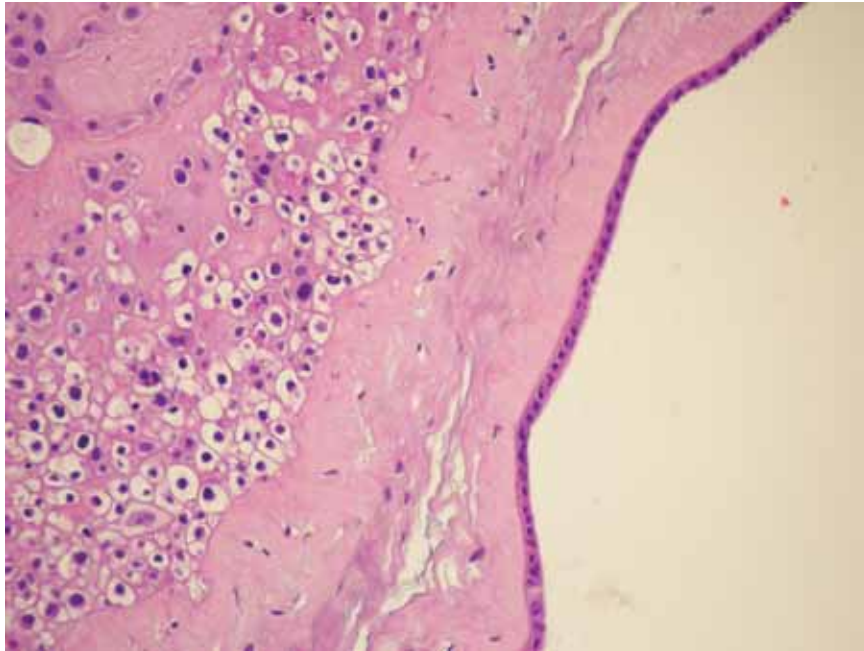
Na comparação dos grupos foram utilizadas letras minúsculas, considerando-se que as proporções seguidas de, pelo menos, uma mesma letra não diferem.

\*Mediana (min-máx)

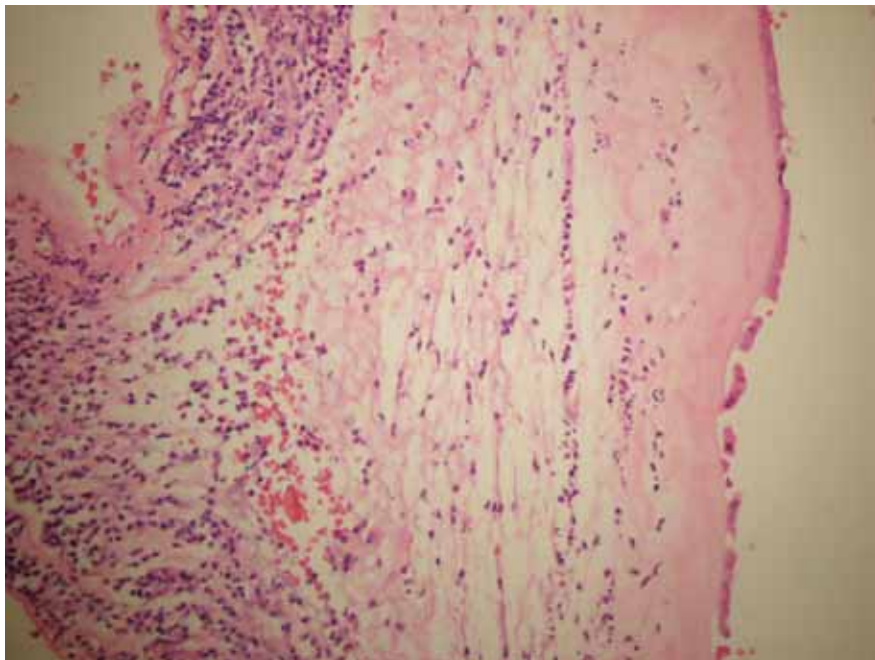
\*\* n (%)

## 5.2. Análise histopatológica das membranas corioamnióticas

As análises histopatológicas referentes à ausência ou presença de infiltrado inflamatório agudo nas membranas corioamnióticas estão representadas nas Figuras 2 e 3.



**Figura 2.** Fotomicrografia de membrana corioamniótica demonstrando o cório e o âmnio livres de infiltrado inflamatório. HE. 200X.

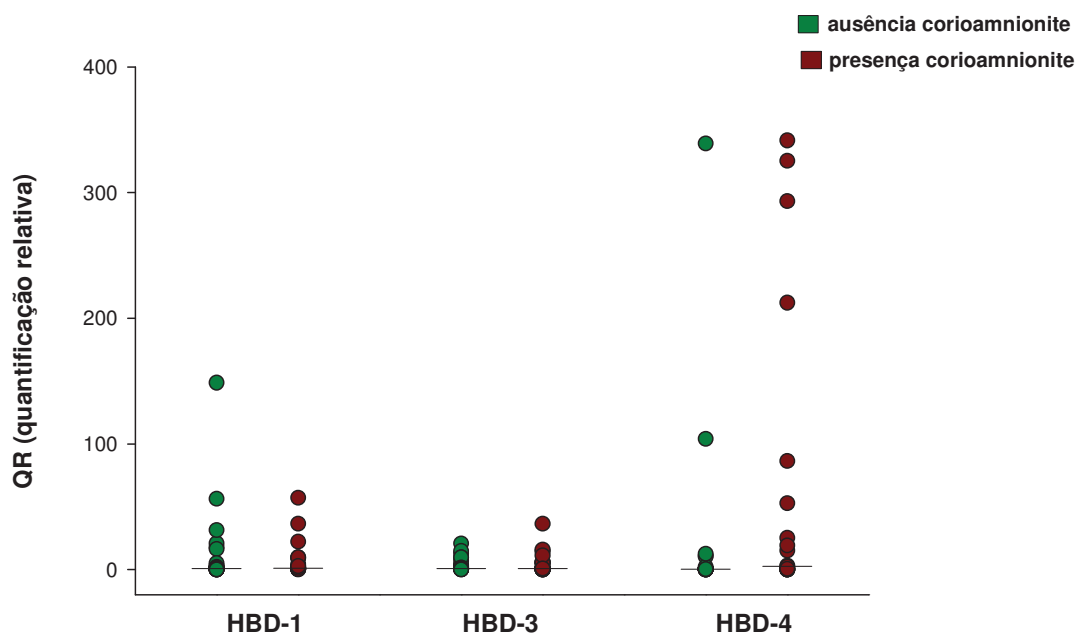


**Figura 3.** Fotomicrografia de membrana corioamniótica demonstrando o cório e o âmnio com extenso infiltrado polimorfonuclear. HE. 200X.

### 5.3. Expressão de HBD-1, HBD-3 e HBD-4 pelas membranas corioamnióticas

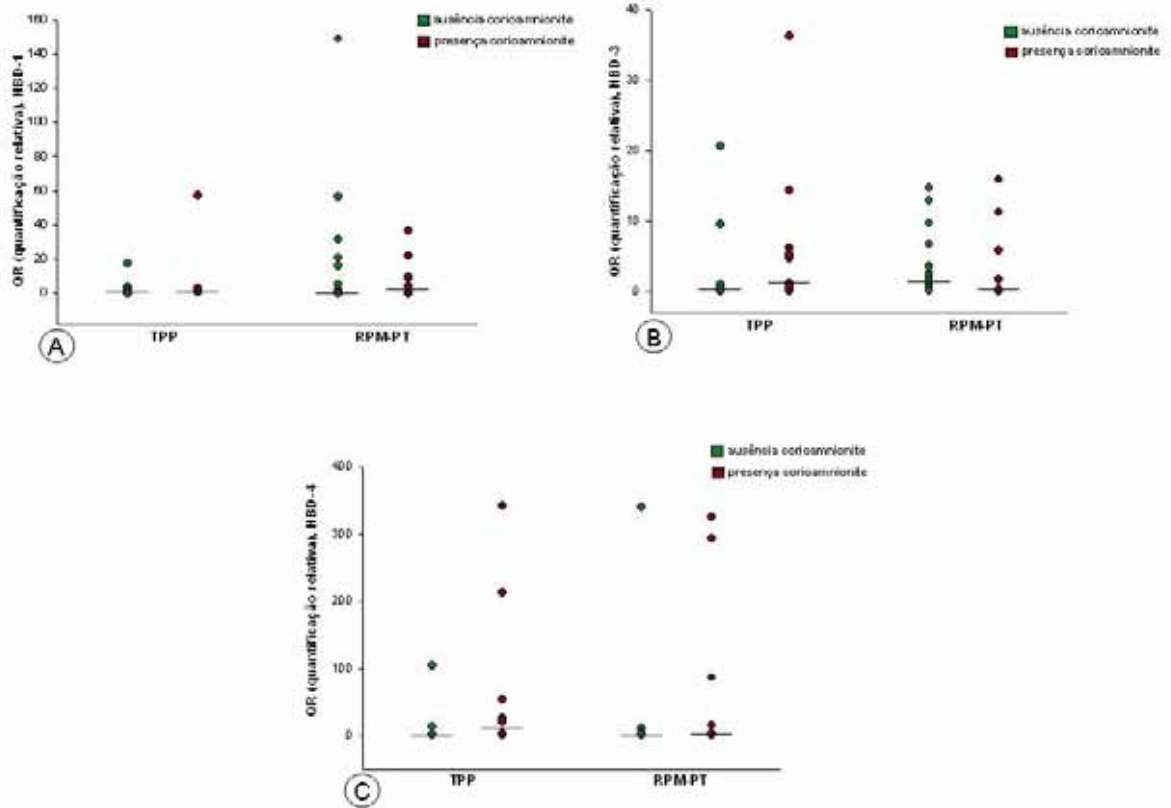
A expressão de HBD-1, HBD-3 e HBD-4 foi avaliada em 30 amostras do grupo G1 e em 30 amostras do grupo G2. Deste total, o RNAm foi detectado em 90% das amostras do primeiro grupo e em 73% do G2.

A quantificação relativa de RNAm de HBD-1, HBD-3 e HBD-4 nas membranas corioamnióticas das gestantes incluídas no estudo está apresentada na Figura 4. Pode-se observar que não houve diferença estatística significativa entre os grupos G1 e G2 na expressão das defensinas avaliadas.



**Figura 4.** Quantificação relativa (QR) de RNAm de HBD-1, HBD-3 e HBD-4 nas membranas corioamnióticas incluídas no estudo; Teste de Mann-Whitney ( $p > 0,05$ ).

Em relação à complicação gestacional que originou o parto prematuro como desfecho gestacional, RPM-PT ou TPP, a quantificação relativa de HBD-1, HBD-3 e HBD-4 não mostrou diferença estatisticamente significativa, seja na ausência ou presença de corioamnionite (Figura 5).



**Figura 5.** Quantificação relativa (QR) de RNAm de HBD-1 (A), HBD-3 (B) e HBD-4 (C) nas membranas corioamnióticas de gestações complicadas por TPP ou RPM-PT, na presença ou não de corioamnionite histológica.

*Discussão*

## 6. Discussão

O parto prematuro é um dos desfechos gestacionais desfavoráveis mais importantes na Clínica Obstétrica, em cuja etiologia multifatorial pode-se destacar a infecção da cavidade amniótica e a inflamação intra-amniótica<sup>56</sup>. Microrganismos presentes na microbiota vaginal ascendem transcervicalmente atingindo e infectando a cavidade amniótica. A morbidade perinatal resultante da liberação de endotoxinas e exotoxinas desses microrganismos e da estimulação da produção de citocinas inflamatórias, prostaglandinas e metaloproteinases incluem, principalmente, a prematuridade com aumento da suscetibilidade a complicações cerebrais<sup>57</sup> e pulmonares<sup>58</sup>. Apesar das novas terapias farmacológicas e dos programas de prevenção, a incidência de parto prematuro não tem diminuído nas últimas décadas.

A corioamnionite histológica, definida pela infiltração das membranas fetais por leucócitos polimorfonucleares é diagnóstico que pode ser feito em mais de 50% dos partos prematuros<sup>47-49</sup> caracterizando que eventos inflamatórios na cavidade amniótica estão pronunciados nas gestações pré-termo.

Considerando que pequenos peptídeos catiônicos antimicrobianos,  $\beta$  defensinas humanas, são efetivas moléculas do sistema imune inato para defesa do hospedeiro e que exibem atividades antimicrobianas contra um largo espectro de bactérias, incluindo Gram positivas e Gram negativas<sup>9</sup>, que são os principais microrganismos envolvidos nas complicações gestacionais, que deflagram o parto prematuro associados à corioamnionite, o estudo da expressão das  $\beta$  defensinas poderia contribuir para o entendimento da fisiopatologia das complicações gestacionais. Nós hipotetizamos que a quantificação relativa de  $\beta$  defensinas seria mais elevada nas membranas corioamnióticas complicadas por corioamnionite, pois na presença de infecção e resposta inflamatória, maiores concentrações desses antimicrobianos naturais seriam importantes na interface materno-fetal. Sustentando essa hipótese, Heine et al.<sup>59</sup> descreveram que níveis de defensinas neutrofílicas aumentam exponencialmente no líquido amniótico com o aumento da severidade da corioamnionite histológica e Gankovskaia et al.<sup>16</sup>, descreveram que a presença de infecção urogenital foi associada com aumento na expressão de HBD-1 pela mucosa cervical.

É consenso na literatura que a presença de microrganismos na cavidade amniótica leva à ativação do sistema imune inato, que constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos. Nesse sentido, os componentes bacterianos são reconhecidos pelos receptores *toll-like* presentes na superfície celular de leucócitos e trofoblastos, que emitem, para o interior destas, sinais celulares para produção e liberação de citocinas, proteases e outros fatores<sup>60</sup> que medeiam a produção e liberação de defensas em diversos tipos celulares<sup>28,45,61</sup>. No contexto da gestação, Buhimschi et al<sup>42</sup>. descreveram que a produção de HBD-3 aumenta após estímulo de células amnióticas com LPS, mimetizando a infecção intra-amniótica. Nesse mesmo sentido, Szukiewicz et al<sup>52</sup>, analisando placentas de termo, encontraram aumento da concentração de HBD-3 devido à presença de corioamnionite. No entanto, contrariando nossa hipótese inicial, a quantificação relativa de RNAm de HBD-1, HBD-3 e HBD-4 nas membranas corioamnióticas estudadas não foi estatisticamente superior às membranas sem corioamnionite, independente da complicação gestacional que originou o parto prematuro como desfecho gestacional, RPM-PT ou TPP.

Nossos resultados podem ser explicados, em parte, pela constituição dos grupos de estudo. Apesar de não apresentarem corioamnionite, o grupo controle foi formado por membranas corioamnióticas de gestações pré-termo, pois o objetivo era avaliar membranas com a mesma idade gestacional. Para pareamento dessa idade gestacional, os grupos foram constituídos de gestações que apresentaram RPM-PT e/ou TPP. Assim, a expressão de  $\beta$  defensas pode estar aumentada também no grupo controle, em função do resultado adverso da gestação. Nesse sentido, Lavazzo et al.<sup>62</sup> não encontraram diferença na concentração de  $\beta$  defensas no líquido amniótico quando comparadas gestantes com RPM-PT e TPP.

Outro fato a ser considerado é que a regulação da síntese de  $\beta$  defensas não é a mesma nos diferentes sistemas, e em membranas corioamnióticas *in vivo* é pouco conhecida. Em alguns tipos celulares como macrófagos uterinos, monócitos de sangue periférico<sup>61</sup> e até células amnióticas em cultura<sup>44</sup>, o estímulo com citocinas inflamatórias induz síntese de  $\beta$  defensas. King et al.<sup>28</sup> descreveram que células epiteliais endometriais aumentam a produção de AN após estímulo com IL-1 $\beta$ , citocina rapidamente produzida após exposição de macrófagos a endotoxinas<sup>63</sup>. Por outro lado, anos mais tarde, esses mesmos autores não encontraram aumento

de HBD-1 após estimular células trofoblásticas com IL-1 $\beta$ <sup>7</sup>. Em membranas corioamnióticas, a expressão de  $\beta$  defensinas pode ser influenciada por citocinas, porém independentemente da presença de corioamnionite, uma vez que, em estudo anterior<sup>49</sup>, nosso grupo avaliou a concentração de RNAm de citocinas inflamatórias nessas mesmas amostras e não encontrou diferença significativa de RNAm de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 ou TNF- $\alpha$ , na presença ou não de infiltrado inflamatório nas membranas corioamnióticas.

Além das diferenças teciduais e celulares de presença e produção de  $\beta$  defensinas, o fator transcricional pode justificar os resultados obtidos, uma vez que a diferença na quantidade de um RNAm específico entre duas amostras biológicas, não é necessariamente refletido por uma diferença quantitativa equivalente no nível de quantidade da proteína, que muitas vezes está implícito nos estudos. Existem, portanto, limitações intrínsecas da técnica, dentre as quais, a quantidade do RNA mensageiro nem sempre está correlacionado à quantidade da proteína; a sensibilidade e variação dinâmica dos métodos existentes são tais que os RNAm que estão em menor quantidade, potencialmente codificando as proteínas regulatórias mais importantes, não são facilmente medidos como acontece com os RNAm em maior quantidade; e a atividade das proteínas codificadas pelo RNAm é regulada em vários níveis após a sua expressão. Por exemplo, a localização subcelular e/ou a extensão em que as proteínas são pós-traducionalmente modificadas, podem não ser reveladas pela medição da quantidade do RNAm<sup>64</sup>.

Assim, considerando as amostras analisadas e a metodologia empregada, os achados do presente estudo revelam que as membranas corioamnióticas de gestações pré-termo são fontes de  $\beta$  defensinas e a expressão de HBD-1, HBD-3 e HBD-4 não está associada com a presença de corioamnionite histológica.

# *Referências*

## 7. Referências

1. Parry S, Strauss JF. Mechanisms of disease: premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998;338:663-70.
2. French JI, McGregor JA. The pathobiology of premature rupture of membranes. *Semin Perinatol* 1996;20:344-68.
3. Hay ED. Extracellular matrix. *J Cell Biol* 1981;9:205s-23s.
4. Malak T, Ockleford CD, Bell SC, Dalgleish R, Bright N, MacVicar J. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term fetal membranes. *Placenta* 1993;14:385-406.
5. Kanayama N, Terao T, Kawashima Y, Horiuchi K, Fujimoto D. Collagen types in normal and prematurely ruptured amniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1985;153:899-903.
6. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 2003;101:178-93.
7. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JRG. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta* 2007;28:161-9.
8. Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. *Hum Pathol* 2004;35:47-54.
9. Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* 2000;8:402-10.
10. Ashitani J, Mukae H, Hiratsuka T, Nakazato M, Kumamoto K, Matsukura S. Plasma and BAL fluid concentrations of antimicrobial peptides in patients with mycobacterium avium -intracellulare infection. *Chest* 2001;119:1131-7.
11. Huttner KM, Bevins CL. Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. *Ped Res* 1999;45:785-94.
12. Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, Walters JD, Jia HP, Welsh MJ, et al. Discovery of five conserved beta-defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2129-33.
13. Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Human  $\beta$ -defensins. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:1294-313.
14. Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 1995;368:331-5.
15. Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB Jr., Ganz T. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 1998;101:1633-42.
16. Gankovskaia OA, Koval'chuk LV, Gankovskaia LV, Lavrov VF, Romanovskaia VV, Kartashov DD, et al. Role of Toll-like receptors and defensins in antimicrobial protection of urogenital tract in females. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2008;1:46-50.
17. Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BA, et al. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14961-6.
18. Ali RS, Falconer A, Ikram M, Bissett CE, Cerio R, Quinn AG. Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J Invest Dermatol* 2001;117:106-11.

19. Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun* 1998;66:4222-8.
20. Zhao C, Wang I, Lehrer RI. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* 1996;396:319-22.
21. Joly S, Organ CC, Johnson GK, McCray PB Jr, Guthmiller JM. Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. *Mol Immunol* 2005;42:1073-84.
22. Sorensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T. Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J Immunol* 2005;174:4870-9.
23. Zhu BD, Feng Y, Huang N, Wu Q, Wang BY. Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin (BCG) enhances human beta-defensin-1 gene transcription in human pulmonary gland epithelial cells. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24:907-12.
24. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997;387:861.
25. Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, et al. Mucoid Pseudomonas aeruginosa, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:714-21.
26. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2002;347:1151-60.
27. Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka, I. Modulation of human beta-defensin-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production. *J Immunol* 2003;170:4226-36.
28. King AE, Fleming DC, Critchley HOD, Kelly RW. Regulation of natural antibiotic expression by inflammatory mediators and mimics of infection in human endometrial epithelial cells. *Molecular Human Reproduction* 2002;8:341-49.
29. Dunsche A, Acil Y, Dommisch H, Siebert R, Schroder JM, Jepsen S. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci* 2002;110:121-4.
30. Varoga D, Wruck CJ, Tohidnezhad M, Brandenburg L, Paulsen F, Mentlein R, et al. Osteoblasts participate in the innate immunity of the bone by producing human beta defensin-3. *Histochem Cell Biol* 2008;131:207-18.
31. Garcia JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodriguez-Jimenez J, Forssmann U, et al. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of Xenopus oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res* 2001;306:257-64.
32. King AE, Critchley HO, Kelly RW. Innate immune defences in the human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:116.
33. King AE, Fleming DC, Critchley HO, Kelly RW. Differential expression of the natural antimicrobials, beta-defensins 3 and 4, in human endometrium. *J Reprod Immunol* 2003;59:1-16.
34. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, et al. Beta-defensins: linking innate and adaptative immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999;286:525-8.
35. Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* 2002;298:1025-9.

36. 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 USA* 2007;104:18631-5.
37. Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev* 2000;21:514-50.
38. Feng Y, Pan X, Huang N, Feng Y, Wu Q, Wang B. The human beta-defensins expression in female genital tract and pregnancy-related tissues. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2003;34:217-9.
39. Akinbi HT, Narendran V, Pass AK, Markart P, Hoath SB. Host defense proteins in vernix caseosa and amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:2090-6.
40. Soto E, Espinoza J, Nien JK, Kusanovic JP, Erez O, Richani K, et al. Human beta-defensin-2: a natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007;20:15-22.
41. Svinarich DM, Gomez R, Romero R. Detection of human defensins in the placenta. *Am J Reprod Immunol* 1997;38:252-5.
42. Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, Petkova AP, Weiner CP, Saed GM. The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:1678-87.
43. Kjaergaard N, Hein M, Hvttel L, Helming RB, Schonheyder HC, Ulbjerg N, et al. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;94:224-9.
44. Stock SJ, Kelly RW, Riley SC, Calder AA. Natural antimicrobial production by the amnion. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:255 e1-6.
45. Bando M, Hiroshima Y, Kataoka M, Shinohara Y, Herzberg MC, Ross KF, et al. Interleukin-1alpha regulates antimicrobial peptide expression in human keratinocytes. *Immunol Cell Biol* 2007;85:532-7.
46. Buhimschi IA, Zambrano E, Pettker CM, Bahtiyar MO, Paidas M, Rosenberg VA, et al. Using proteomic analysis of the human amniotic fluid to identify histologic chorioamnionitis. *Obstet Gynecol* 2008;111:403-12.
47. Silva MG, Peracoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Peracoli MT. Cervical Lactobacillus and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynaecol Obstet* 2003;81:175-82.
48. Edwards RK. Chorioamnionitis and labor. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2005;32:287-96.
49. 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* 2009;144:27-31.
50. Espinoza J, Chaiworapongsa T, Romero R, Edwin S, Rathnasabapathy C, Gomez R, et al. Antimicrobial peptides in amniotic fluid: defensins, calprotectin and bacterial/permeability-increasing protein in patients with microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, preterm labor and premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003;13:2-21.
51. Grable IA, Heine RP. Neutrophil granule products: can they identify subclinical chorioamnionitis in patients with preterm premature rupture of membranes? *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:808-12.

52. 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:S67-8.
53. *Gestação de Alto Risco / Secretaria de Políticas, Área Técnica da Saúde da Mulher. Brasília: Ministério da Saúde, 2000. 164 p.*
54. Yoon BH, Romero R, Kim CJ, Jun JK, Gomez R, Choi JH, et al. Amniotic fluid interleukin-6: a sensitive test for antenatal diagnosis of acute inflammatory lesions of preterm placenta and prediction of perinatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol* 1995;16:731-44.
55. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:2002-7.
56. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000;342:1500-7.
57. Hagberg B, Hagberg G, Beckung E, Uvebrant P. Changing panorama of cerebral palsy in Sweden. VIII. Prevalence and origin in the birth year period 1991-94. *Acta Paediatr* 2001;90:271-7.
58. Hitti J, Hillier SL, Agnew KJ, Krohn MA, Reisner D, Eschenbach DA. Vaginal indicators of amniotic fluid infection in preterm labor. *Obstet Gynecol* 2001;97:211-9.
59. Heine RP, Wiesenfeld H, Mortimer L, Greig PC. Amniotic fluid defensins: potential markers of subclinical intrauterine infection. *Clin Infect Dis* 1998;27:513-8.
60. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-76.
61. Pioli PA, Weaver LK, Schaefer TM, Wright JA, Wira CR, Guyre PM. Lipopolysaccharide-induced IL-1 production by human uterine macrophages up-regulates uterine epithelial cell expression of human-defensin 2. *J Immunol* 2006;176:6647-55.
62. Iavazzo C, Tassis K, Gourgiotis D, Boutsikou M, Baka S, Hassiakos D, et al. The role of human beta defensins 2 and 3 in the second trimester amniotic fluid in predicting preterm labor and premature rupture of membranes. *Arch Gynecol Obstet* DOI 10.1007/s00404-00901155-4.
63. Higgins GC, Foster JL, Postlethwaite AE. Interleukin 1 propeptide is detected intracellularly and extracellularly when human monocytes are stimulated with LPS in vitro. *J Exp Med* 1994;180:607-14.
64. Binneck E. As ômicas: integrando a bioinformação. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* (serial online). 2004; 32:28-37 [cited 2006 Dec 20]. Available from: [www.biotecnologia.com.br/revista/bio32/omicas\\_32.pdf](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio32/omicas_32.pdf)

*Anexos*

---

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos a senhora a participar da pesquisa “**Expressão de  $\beta$  defensinas em membranas corioamnióticas de gestações pré-termo complicadas por corioamnionite**” que tem por objetivo quantificar a expressão de antimicrobianos naturais por membranas que formam a bolsa das águas de gestações prematuras, associadas ou não à infecção dessas membranas. No momento do parto, após retirada da placenta, as membranas foram coletadas para análise. Após retirada do fragmento necessário para a pesquisa, o restante da placenta foi encaminhado para incineração. Esta pesquisa é de responsabilidade da graduanda Juliana Takitane, sob orientação da Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Márcia Guimarães da Silva, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, com a participação da Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Lúcia Mores Rall, do Prof. Adjunto José Carlos Peraçoli e da doutoranda Jossimara Poletini.

Pelo presente instrumento, eu \_\_\_\_\_  
devidamente esclarecida, ciente da autorização a mim solicitada, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, e ciente, também, de que as informações serão utilizadas exclusivamente pelas pesquisadoras, que manterão sigilo sobre minha identidade, e que as mesmas estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas e de que **posso retirar este consentimento a qualquer hora sem prejuízo do meu atendimento neste serviço**, firmo meu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**, concordando em participar da pesquisa proposta. Estou ciente também que este estudo não trará benefício imediato para minha gestação e que não receberei nenhum benefício financeiro por participar do estudo.

Botucatu, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2009.

\_\_\_\_\_  
Assinatura da paciente

\_\_\_\_\_  
Juliana Takitane  
Rua Dr. Ranimiro Lotufo, 593- Apto. 42-A  
Vila Santana - Botucatu, 18606-770  
Fone: (14) 96012090  
e-mail: [julianatakitane@yahoo.com.br](mailto:julianatakitane@yahoo.com.br)

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Márcia Guimarães da Silva  
Rua Izidoro Bertaglia, 746  
Jardim Paraíso II, Botucatu, 18610-140  
Fone: (14) 3815 24 17  
e-mail: [mgsilva@fmb.unesp.br](mailto:mgsilva@fmb.unesp.br)



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br  
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde  
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 06 de abril de 2009.

Of. 123/09-CEP

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

Prezada Drª Márcia,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa, (Protocolo 3161-2009-CEP) "Expressão de  $\beta$  defensinas em membranas corioamnióticas de gestantes pré termo complicadas por corioamnionite", a ser conduzido por Juliana Takitane, orientada por Vossa Senhoria, com a participação dos Profs. Drs. Vera Lúcia Moraes Rall, José Carlos Peraçoli e da doutoranda Jossimara Poletini, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 06/04/2009.

Recomendação: O CEP recomenda que em trabalhos posteriores seja prevista o uso de material em outros trabalhos científicos.

Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP.