RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 14/09/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

Mariana de Castro Silva

Produção de citocinas inflamatórias e indução da transição epitelial-mesenquimal de células amnióticas no cenário de infecção polimicrobiana

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Ciências – Área Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva
Coorientadora: Profa. Dra. Jossimara Polettini, Profa. Dra. Bruna Ribeiro de Andrade Ramos e Dra. Nathalia Mayumi Noda-Nicolau

Botucatu

Mariana de Castro Silva

Produção de citocinas inflamatórias e indução da transição epitelial-mesenquimal de células amnióticas no cenário de infecção polimicrobiana

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Ciências – Área Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva
Coorientadora: Profa. Dra. Jossimara Polettini, Profa. Dra. Bruna Ribeiro de Andrade Ramos e Dra. Nathalia Mayumi Noda-Nicolau

Botucatu
2022

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

Silva, Mariana de Castro.
Produção de citocinas inflamatórias e indução da transição epitelial-mesenquimal de células amnióticas no cenário de infecção polimicrobiana / Mariana de Castro Silva. - Botucatu, 2022

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. Lactobacillus. 2. Micoplasma genital. 3. Células amnióticas epiteliais. 4. Infecção polibacteriana.

Palavras-chave: Células amnióticas epiteliais; Desfecho gestacional adverso; Infecção polibacteriana; Lactobacilos; Micoplasma genital.

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha mãe, meu maior exemplo de força, determinação e inspiração.
Ao meu pai e ao meu avô Ciro, ambos *in memorian*, que por meio de boas lembranças e

ensinamentos se fizeram presente na minha jornada.

Agradecimentos

À minha mãe, **Viviane**, que durante toda a minha trajetória acadêmica sempre acreditou em mim. Nessa longa jornada ela tem sido diariamente minha fonte de força e inspiração. Nenhuma conquista ao longo desses anos de estudo, em especial essa, teria o seu saboroso valor se não fosse pelo seu amor e sua presença.

Ao meu pai, **Marcos**, e ao meu avô, **Ciro**, que embora tenham deixado esse plano muito cedo, ainda assim me ensinaram lições valiosas de honestidade e perseverança. O maior ensinamento que me deixaram é que o amor ultrapassa qualquer limite.

À minha orientadora, **Márcia Guimarães da Silva**, não só pela oportunidade em poder fazer parte da sua equipe, mas por acreditar em mim e diariamente me aconselhar e orientar, conselhos esses que se fizeram além do âmbito profissional. Ao longo desses oito anos trabalhando juntas eu me perco em tentar mensurar quantas vezes fui acolhida e amparada pela sua presença. Muito obrigada por tudo.

À **Jeniffer Sena Baptista Ferreira**, *kode*, minha irmã de consideração, cuja amizade e parceria foram fundamentais para que eu pudesse seguir em frente sem desanimar. Ter alguém como você do meu lado é um presente do universo. Obrigada por me lembrar todos os dias o quanto somos capazes. Você é incrível e eu estarei com você para sempre.

À **Giovana Fernanda Cosi Bento**, minha grande amiga que esteve presente durante todo o curso desse projeto, não há palavras para agradecer sua ajuda e companheirismo durante esses anos de jornada. Nossos obstáculos foram mais suaves por podermos contar uma com a outra. Minha eterna gratidão a você.

Ao **Guilherme**, **Carolina** e **Geovanna**, por terem feito parte desse projeto e contribuído tanto para esse trabalho. Vocês estarão sempre no meu coração, foi gratificante ensinar e aprender com vocês. **Baby**, um agradecimento especial pela grande companheira de trabalho que tive nessa reta final. Nós aprendemos muito juntas.

Aos amigos **Rafael, Júlia Abbade** e **Júlia Morales**, que possibilitaram que o ambiente de trabalho fosse também um ambiente amigo e acolhedor, sempre topando uma cervejinha comigo no final do expediente.

A todos do **Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal**, uma equipe que desde 2015 sempre teve muita paciência e dedicação em ensinar e transpassar o conhecimento para os que estavam chegando, principalmente Bruna, Rosana e Laura.

Ao meu namorado, **Vitor Melo**, cujo companheirismo, apoio e paciência foram essenciais para a conclusão desse trabalho. Agradeço também à torcida dos meus sogros e cunhada, que me acolheram tão fortemente nesse processo.

To Dr. **Ramkumar Menon**, who received me in his lab and allowed me to have one of

my greatest experiences, a year full of work and learning. A special thank you to Ourlad, Ananth, Tuya, Lauren, Talar, Rheanna and Phyllis, they were on my side all the time, giving me a lot of support and good memories.

Agradeço a pessoas especiais e profissionais como a **Amanda** e a **Lurdinha**, que diante de muito diálogo e fé (respectivamente) me mantiveram calma e centrada para superar qualquer adversidade.

Aos alunos e Professores do **Departamento de Imunologia e Microbiologia**, em especial à Ivana e à Professora Vera, pelo grande suporte e ajuda durante esses anos. Obrigada pela disponibilidade e auxílio.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (**CAPES,** N° do processo: 88887.373138 2019-00) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq,** N° do processo: 140076/2018-2) pelas bolsas concedidas nesse período.

Sumário

Resumo ---------- 10
Abstract ---------- 13
Capítulo I ---------- 16
Revisão de Literatura ---------- 17
1. Gestação e trabalho de parto ---------- 18
2. Referências ---------- 29
Capítulo II ---------- 44
Artigo Científico 1 ---------- 45
Abstract ---------- 47
Introduction ---------- 48
Material and Methods ---------- 51
Results ---------- 57
Discussion ---------- 61
References ---------- 66
Figures ---------- 70
Capítulo III ---------- 76
Artigo Científico 2 ---------- 77
Abstract ---------- 79
Introduction ---------- 80
Methods ---------- 83
Results ---------- 87
Discussion ---------- 96
Conclusion ---------- 99
References ---------- 100
Conclusão final ---------- 107

Resumo

Introdução: O parto pré-termo espontâneo (PP) é considerado um dos principais problemas da clínica obstétrica e tem como uma das principais causas associada a infecção polibacteriana e consequente inflamação dos tecidos da interface materno-fetal. Esse desfecho gestacional desfavorável resulta da combinação de vários mecanismos, incluindo a elevada produção de mediadores inflamatórios e a senescência celular. O objetivo desse estudo foi avaliar a produção e cinética de mediadores inflamatórios em modelos *in vitro* de infecção polimicrobiana de células amnióticas na presença de diferentes espécies de lactobacilos, além de avaliar fatores indutores da transição epitelial-mesenquimal em células amnióticas.

Metodologia: Células amnióticas epiteliais imortalizadas foram cultivadas em modelos *in vitro* e submetidas a diferentes estímulos compostos por espécies bacterianas comumente identificadas em gestações complicadas por PP. Os sobrenadantes da cultura foram coletados em cinco momentos diferentes: 0h, 6h, 12h, 18h e 24h. As Interleucinas (IL) -6, IL-8, IL-10, IL-13, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral α (TNF-α) foram mensurados empregando-se ensaio imunoenzimático (ELISA) e a análise morfológica foi realizada por meio de análise de *cell shape index*.

Resultados: A produção de citocinas pró-inflamatórias foi maior nos grupos estimulados com *Lactobacillus iners* em combinações com *Mycoplasma hominis* e diferentes bactérias. A resposta anti-inflamatória foi maior nos grupos de bactérias anaeróbias

estimulados junto com *L. crispatus*. A transição epitelial-mesenquimal foi significativamente maior no grupo estimulado com *L. iners* e *M. hominis*, assim como em combinação com *Fusobacterium nucleatum*, depois de 24h de estímulo. Esse aumento na transição epitelial-mesenquimal não foi observado quando as células eram tratadas com LPS, mas houve um aumento significativo da quantificação de células mesenquimais quando o estímulo era inflamatório, sendo esse tempo e dose dependente.

Conclusão: O cenário induzido por estimulação, das células epiteliais amnióticas, com bactérias Gram-variáveis, na presença de *L. iners*, apresentou maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias, assim como a transição epitelial-mesenquimal esteve associada à presença de mediador inflamatório (TNFα) e às combinações específicas de bactérias.

Palavras-chave: células amnióticas epiteliais; lactobacilos; micoplasmas genitais; desfecho gestacional adverso; infecção polibacteriana.

Abstract

Introduction: Preterm birth (PTB) is one of the main problems in the obstetric clinic. Polybacterial invasion and consequent inflammation on the maternal-fetal interface are one of the major causes associated to PTB, resulting in elevated production of inflammatory mediators, as well as cellular senescence. The aim of this study was to evaluate the production and kinetics of inflammatory mediators in *in vitro* models of polybacterial infection of amniotic cells in the presence of different species of lactobacilli.

Methods: Immortalized amnion epithelial cells were cultured in *in vitro* models and subjected to different stimuli composed of bacterial species commonly identified in pregnancies complicated by PTB. Culture supernatants were collected at five different times-points: 0h, 6h, 12h, 18h and 24h. Interleukins (IL) -6, IL-8, IL-10, IL-13, Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) and tumor necrosis factor α (TNF-α) were measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and quantification of cell morphology was performed using cell shape index analysis.

Results: The production of pro-inflammatory cytokines was higher in groups stimulated with *L. iners* in combinations with *M. hominis* and different bacteria. The anti-inflammatory response was greater in the groups of anaerobic bacteria stimulated together with *L. crispatus*. The epithelial-mesenchymal transition was significantly higher in the group stimulated with *L. iners* and *M. hominis*, as well as in combination with *F. nucleatum* after 24h of stimulation. This increase in the epithelial-mesenchymal transition

was not observed when the cells were treated with LPS, but there was a significant increase in the quantification of mesenchymal cells when the stimulus was inflammatory (TNFα), being this time and dose dependent.

Conclusion: The scenario induced by stimulation of amnion epithelial cells, with Gram-variable bacteria, in the presence of *L. iners*, showed higher levels of pro-inflammatory cytokines, as well as the epithelial-mesenchymal transition was associated with the presence of inflammatory mediator (TNFα) and specific combinations of bacteria.

Keywords: immortalized amnion epithelial cells; Lactobacilli; Genital mycoplasmas; pregnancy outcome; polybacterial infection

Capítulo I

Revisão de Literatura

1. Gestação e trabalho de parto

O trabalho de parto (TP) a termo é resultado de uma 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 seu desfecho, que são: o remodelamento cervical (1), o enfraquecimento e rotura das membranas corioamnióticas e a contratilidade miometrial (2), que juntos, viabilizam a expulsão do feto após a 37ª semana de gestação. No entanto, apesar dos inúmeros trabalhos e das técnicas existentes, os mecanismos envolvidos no trabalho de parto a termo ainda não estão completamente elucidados.

São consideradas gestações de termo aquelas que apresentam duração compreendida entre 37 e 42 semanas completas de gestação (2), sendo o parto pré-termo (PPT) definido como o desfecho que ocorre anteriormente a 37ª semana gestacional. A maior consequência do incompleto conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos associados a essa condição é a dificuldade de prevenir o trabalho de parto pré-termo (TPP), considerado um dos principais problemas da Clínica Obstétrica, apresentando altas taxas de mortalidade neonatal, assim como possíveis comorbidades que culminam em severas consequências na vida dos neonatos, resultando em custos econômicos, físicos e psicológicos (3-5).

A ocorrência do PP pode ter duas origens distintas, a induzida e a espontânea. A

primeira situação representa os casos nos quais há alguma indicação materna ou fetal. Já nos casos espontâneos, as duas causas possíveis incluem o trabalho de parto pré-termo com bolsa íntegra ou a rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT) (6). O TPP é quando há a presença de uma ou mais contrações em intervalos de dez minutos, seguidas do esvaecimento cervical e dilatação antes de completar 37 semanas de gestação. Enquanto a RPM-PT é a rotura das membranas fetais, antes do início do trabalho de parto, em idade gestacional inferior a 37 semanas. De acordo com um levantamento feito em 2014, 10,6% do total de partos mundiais ocorreram prematuramente, representando certa de 14,8 milhões de casos (7). Em 2019, das 5,3 milhões de mortes registradas entre crianças menores 5 anos, a principal causa foi a prematuridade e suas complicações decorrentes, representando 17,7% do total de mortes nessa faixa etária (8).

Baseado em diversos trabalhos epidemiológicos e estudos de mecanismos *in vitro* (9-11), a fisiopatologia e os mecanismos moleculares do parto pré-termo tem sido descrito. Entretanto, o aumento global do parto pré-termo nos últimos anos vem demonstrando que a complexidade dos fatores de risco e seu papel em induzir alterações bioquímicas (12), morfológicas (13, 14), inflamatórias e oxidativas (15, 16) que levam ao parto pré-termo envolve uma rede complexa de biomarcadores, o que dificulta o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos e a prevenção dessa intercorrência gestacional.

Durante os mecanismos reprodutivos, como por exemplo ovulação, implantação e deflagração do parto, a resposta imunológica materna e fetal participa direta ou indiretamente desses eventos, estando intimamente ligada ao sucesso gestacional (17,18), para isso, é necessário que ambiente materno-fetal seja capaz de balancear os processos associados os perfis inflamatórios Th1 (T *helper* 1) e Th2.

No primeiro trimestre gestacional o perfil predominante da resposta imunológica é o Th1, que permite a diferenciação e invasão trofoblásticas da decídua, remodelação das arteríolas espiraladas e o reparo do epitélio uterino (19), uma vez que esse precisa se adaptar para que ocorra a nidação. Durante o segundo trimestre há uma mudança do perfil inflamatório, que passa a ser predominantemente Th2, caracterizado pela produção de citocinas anti-inflamatórias, que proporcionam um ambiente propício para a manutenção da gestação (20). Por fim, o último trimestre é marcado pelo retorno do predomínio do perfil Th1, perfil esse que pode ser observado não apenas sistemicamente, mas também no ambiente intrauterino e tecidos gestacionais, marcando assim o momento do parto (20, 21).

Durante o terceiro trimestre é possível identificar uma elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, que passam a ter níveis cada vez mais crescentes com a aproximação do parto. Essas, como por exemplo, interleucinas (IL)-1β, IL-6, IL-8, e Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α) (22), assim como ciclooxigenase-2 (COX-2), prostaglandina E2 (PGE_2), proteína antimicrobiana catiônica humana (hCAP18) são secretados pelos tecidos gestacionais. Além da resposta inflamatória produzida pelos tecidos gestacionais maternos, as alterações celulares e resposta inflamatória provenientes dos tecidos fetais também é de grande relevância para amplificar a cascata inflamatória dos tecidos uterinos e culminar com o parto (23).

O sistema imune participa nos principais eventos fisiológicos associados ao trabalho de parto, que são a contratilidade uterina e esvaecimento cervical. A produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente por células das membranas fetais, estimula a produção de prostaglandinas e proteases, cuja ambas as sínteses são associadas com o

processo de trabalho de parto, como alterações cervicais, rotura das membranas e início das contrações uterinas (24).

Com o reconhecimento do parto como um processo inflamatório, é possível induzir que a presença de patógenos pode estimular a imunidade não programada no ambiente materno-fetal. A vigência de estímulo bacteriano no ambiente uterino pode provocar ativação leucocitária (25), resultando em amplificação da resposta inflamatória, estimulando a produção de prostaglandinas por células das membranas corioamnióticas, endométrio e miométrio (26), além de desencadear o recrutamento leucocitário para as membranas fetais, caracterizando o quadro de corioamnionite histológica, considerada importante indicador de invasão da cavidade amniótica (27).

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 (28, 29). A imunidade inata, diferentemente da imunidade adquirida, reconhece patógenos pela 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, os TLRs, e cada um dos 10 tipos já descritos na literatura (TLR1-10) são específicos para os diferentes padrões moleculares associados à patógenos (PAMPS) (30). Bactérias Gram-positivas, lipoproteínas associadas à micobactérias, peptidioglicano e ácido lipoteicóico são alguns PAMPs reconhecidos pelo TLR-2 (31, 32), enquanto o TLR-4 é o principal mediador da resposta inflamatória relacionada a bactérias Gram-negativas, que expressam endotoxinas como o lipopolissacarídeo (LPS) (33). Ambos os receptores são especialmente expressos pelo

epitélio amniótico, células coriônicas e deciduais (34), constituindo a primeira linha de defesa contra infecção durante a gestação (35).

O reconhecimento dos constituintes microbianos pelos TLRs leva a transdução de sinais celulares que desencadeiam a produção de citocinas pró-inflamatórias, sendo que a ativação precoce desses receptores na interface materno-fetal pode perturbar perfil anti-inflamatório necessário para a manutenção da gestação no segundo trimestre. Esse desequilíbrio causado por um agente microbiano pode acarretar a produção de IL-6 (36), IL-8 (37), IL-10 (38) e TNF-α (39). Um perfil inflamatório semelhante também foi identificado em cultura de células trofoblásticas humanas estimuladas com bactérias inativadas por calor, sendo que esse estímulo foi capaz de aumentar a expressão de RNAm de citocinas pró e anti-inflamatórias (40), resultando em desequilíbrio entre os dois perfis de citocinas, causado por infecção intramniótica, que pode potencializar a indução de parto pré-termo.

Dentre as citocinas inflamatórias, a IL-6 é a mais amplamente utilizada como biomarcador da inflamação intramniótica (IAI – *intra-amniotic inflammation*) e da invasão microbiana da cavidade amniótica (MIAC - *microbial invasion of the amniotic cavity*), sendo muitas vezes utilizada como preditor para o parto pré-termo (41-43). A identificação de um biomarcador para IAI e MIAC ainda é controversa dentro da literatura, uma vez que fatores como carga e espécie bacteriana, tipo de amostra, coleta e análise sejam possíveis vieses.

Além disso, alguns estudos demonstraram que a detecção de IL-8 e IL-1β estava elevada em amostras do conteúdo cervicovaginal de pacientes com RPM-PT (44). O TNF-α também se apresentou aumentado quando analisado em líquido amniótico de pacientes

acometidas por parto pré-termo espontâneo e que testaram positivo para a presença de micoplasmas genitais (45). Alguns estudos apontam que a produção dessa citocina possa estar relacionada com casos mais severos de infecção, sugerindo que sua produção dependa de carga bacteriana maior (46, 47).

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 (48). Camundongos deficientes na produção de IL-10 foram mais suscetíveis ao parto pré-termo mesmo em baixa concentração de LPS (49), uma vez que a contrarregulação da ação do TNF-α, IL-6 e IL-1 não pode ser realizada prejudicando a modulação da resposta inflamatória (50, 51).

Diversos fatores de risco podem estar associados ao parto pré-termo, como por exemplo os fatores genéticos, relacionados por exemplo aos polimorfismos associados a genes envolvidos na resposta inflamatória (52, 53), fatores paternos (54, 55) e fatores maternos, que representam os fatores de risco mais fortemente relacionados ao desfecho gestacional adverso, como por exemplo, a idade materna em seus extremos (56) etnia afro-americana (57, 58) e estilo de vida (59, 60). Mas ainda que sua etiologia seja considerada multifatorial, a invasão microbiana da cavidade amniótica e a resposta inflamatória associada a essa condição representam a principal causa do parto pré-termo espontâneo (61, 62).

Vários microrganismos têm sido associados à patogênese do PP, especialmente pela ascensão transcervical a partir das alterações de microbiota vaginal (63), com subsequente recrutamento neutrofílico e instalação de corioamnionite histológica. Em estudo do nosso grupo de pesquisa, Marconi et al. (64) demonstraram infecção da

cavidade amniótica em gestantes que apresentaram essa intercorrência gestacional. Segundo esse estudo, tal infecção é de natureza polibacteriana e que, na maioria dos casos, há combinação de microrganismos aeróbios e anaeróbios. Da mesma forma, Jones et al. (65) detectaram duas ou mais espécies bacterinas em mais de 60% das membranas fetais e placenta de gestações pré-termo.

O modelo de ascensão bacteriana mais aceito atualmente foi proposto por Kim et al. (66), no qual a invasão microbiana no ambiente intramniótico se dá através de uma infecção focal e discreta na região das membranas corioamnióticas. Em seguida, essas bactérias são capazes de atingir a cavidade amniótica, se proliferarem no líquido amniótico e, posteriormente, atingem toda a extensão das membranas, iniciando-se pelo âmnion (Figura 1). Além disso, ainda se propõe que a principal via de ascensão dessas bactérias seja através do trato genital feminino inferior, uma vez que os patógenos mais frequentemente isolados no líquido amniótico de pacientes com IAI são as espécies bacterianas que fazem parte do *core* patológico da vaginose bacteriana (VB) (67).

A VB é considerada uma clássica disbiose de mulheres em idade reprodutiva (68), sendo caracterizada pela substituição da microbiota lactobacilar por uma microbiota cocobacilar gram variável e predominantemente anaeróbia (69, 70). Essa disbiose está presente em cerca de 15-42% das gestantes e aumenta em quatro vezes o risco de parto pré-termo e de RPM-PT (71-73). Considerando o cenário polibacteriano da VB, existe uma grande diversidade de espécies bacterianas identificadas na infecção da cavidade amniótica (67), sendo que nos casos de TPP e RPM-PT podem estar envolvidos cerca de 21 e 18 gêneros bacterianos, respectivamente.

Dentre esses gêneros, no parto pré-termo com bolsa íntegra os principais

envolvidos são *Fusobacterium* spp., *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma* spp., *Sneathia* spp.,

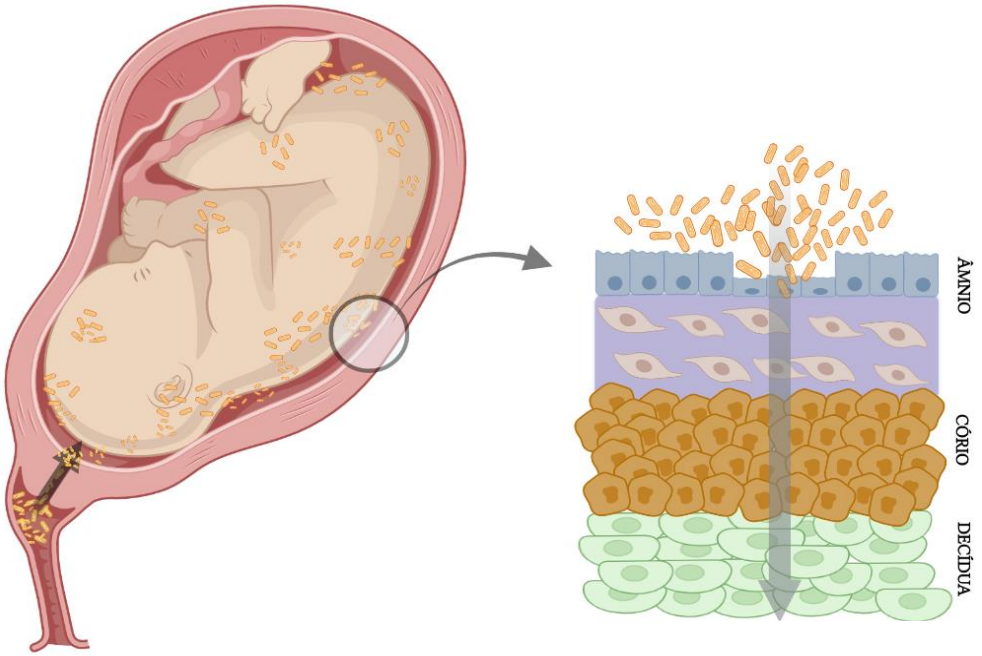

Figura 1. Modelo de infecção bacteriana ascendente. Após a invasão microbiana focal (1), os microrganismos se espraiam pela cavidade amniótica e posteriormente infectam as membranas corioamnióticas, começando pelo âmnion (2). Figura adaptada de Kim et al. (66).

Bacterioides spp., *Prevotella* spp., e na RPM-PT, *Ureaplasma* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Mycoplasma* spp. e *Fusobacterium* spp. Apesar desse cenário polibacteriano, as principais bactérias que vem sendo descritas e detectadas no líquido amniótico tanto no parto pré-termo como na RPM-PT são *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* (67). A prevalência de *U. urealyticum* e *M. hominis* tem grande variabilidade que depende primariamente das características demográficas como localização geográfica, nível socioeconômico e número de parceiros sexuais, e

secundariamente ao tipo de estudo como desenho do estudo, tipo de amostra e método diagnóstico (74). Portanto, a presença de *U. urealyticum* e *M. hominis* pode variar no líquido amniótico de 3,3% a 63,0% e 1,4% a 35,5%, e no conteúdo vaginal de 3,7% a 89,7% e 2,5% a 55,0%, respectivamente (74).

Alguns trabalhos têm associado à infecção por *M. hominis* ao parto pré-termo espontâneo em amostras vaginais (75-76), de líquido amniótico (77-79) e membranas fetais (80). Embora o *U. urealyticum* seja mais prevalente na RPM-PT comparado ao *M. hominis* (78), a coocorrência dessas espécies no conteúdo vaginal suscita um resultado adverso gestacional mais severo comparado à infecção somente por *U. urealyticum* (81). Entretanto, os resultados adversos gestacionais em associação com micoplamas genitais nem sempre são consistentes. Lamont et al. (82) não mostraram associação significativa da presença de *M. hominis* em amostras vaginais e TPP, enquanto Harada et al. (83) demostraram associação significativa de TPP e *M. hominis* usando o mesmo método de cultura e tipo de amostra. Sendo assim, a real contribuição dos micoplasmas genitais na patogênese do TPP e da RPM-PT ainda não está completamente elucidada.

Adicionalmente, outras espécies bacterianas, também presentes no cenário da vaginose bacteriana, já foram identificadas e associadas ao parto pré-termo por meio de técnicas moleculares, como por exemplo, espécies bacterianas do gênero *Peptostreptococcus* spp., que são cocos gram positivos anaeróbios, cuja presença no líquido amniótico e membranas fetais já foi associada ao parto pré-termo (84, 85).

Além das bactérias descritas do *core* patológico da vaginose bacteriana, mas dentro do cenário da infecção no parto pré-termo, o *Streptococcus agalactiae* (GBS), espécie bacteriana patogênica oportunista tem ganhado destaque. Sua colonização no trato reprodutivo feminino pode estar relacionada com o desfecho gestacional adverso, assim

como óbito neonatal. Modelos animais demonstraram que fatores de virulência da GBS, como β-hemolisina, hialuronidase e Cas9 podem acarretar partos pré-termo (86). Da mesma forma, *Staphylococcus aureus*, componente da microbiota da pele humana, também tem sido associado tanto a corioamnionite como ao parto pré-termo (87-89).

Adicionalmente, *Fusobacterium nucleatum*, que é um patógeno oral, está sendo frequentemente identificado por cultura em gestantes com TPP e RPM-PT (90). Em alguns estudos de desfecho gestacional adverso esse microrganismo surge como um dos mais prevalentes, sendo identificado em amostras de tecido placentários, fetais, líquido amniótico e cordão umbilical (91, 92). Sua abundância relativa na placenta suporta a ideia de propagação hematogênica da cavidade oral para a placenta (93), o que é reforçada pela sua presença no cordão umbilical de gestantes normais (94).

Por outro lado, *Lactobacillus* spp. desempenham papel protetor na microbiota vaginal por meio de diferentes mecanismos como, produção de compostos antibacterianos, exclusão competitiva, imunomodulação e sinalização entre bactérias que podem levar a diminuição de produção de toxinas pelos patógenos (95). Nesse sentido, estudos de microbioma vêm demonstrando a alta prevalência de espécies de lactobacilos na vagina de gestantes durante toda a gestação (71), aumento que pode ser explicado pelo aumento de estrogênio nessa fase. Kervinen et al. (96), utilizando técnica de sequenciamento de nova geração, demonstrou que mulheres que tinham microbiota dominada por *L. crispatus* tinham maiores chances de terem parto a termo, sem complicações. Em uma coorte de mulheres afro-americanas, a predominância de *L. iners* na microbiota vaginal no início da gestação foi associada a um risco aumentado de parto pré-termo (97).

Nesse cenário polibacteriano, a chave principal que suscita ou não o parto pré-termo deve ser a natureza e a diversidade das bactérias envolvidas na infecção, mais do que a frequência de colonização bacteriana (99), ou seja, a simples presença da espécie bacteriana não seria de fato o que suscita o parto pré-termo, mas sim a interação da comunidade bacteriana envolvida que inicia a infecção intrauterina. Dessa forma, trabalhos *in vitro* que sejam capazes de reconstituir o cenário de infecção polibacteriana no ambiente materno-fetal são de grande relevância para compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia do parto, principalmente com relação aos desfechos gestacionais adversos.

As membranas fetais, constituídas pelo córion e âmnion, representam o revestimento mais interno da cavidade amniótica, desempenhando um importante papel na imunidade e no suporte mecânico necessários para garantir a viabilidade da gestação (99). A camada amniótica faz contato direto com o líquido amniótico, sendo constituída por uma camada de células epiteliais cúbica (AEC – *amnion epithelial cells*) que comporta o crescimento fetal devido a sua capacidade elástica. Essa capacidade de sustentar e acompanhar o desenvolvimento fetal durante toda a gestação é possível devido ao surgimento de microfraturas, que representam um processo de degradação da matriz extracelular (MEC) (100). Para reparar esses pequenos *gaps* formados no epitélio amniótico, as AECs são capazes de realizar o processo de transição reversível entre os morfotipos epitelial e mesenquimal, constituindo o que conhecemos como transição epitelial-mesenquimal (EMT – *epithelial-mesenchymal transition*) e transição mesenquimal-epitelial (MET – *mesenchymal-epithelial transition*) (13).

Em gestações de termo há a geração de um perfil pró-inflamatório no momento do parto devido ao acúmulo de células mesenquimais, isso porque, o processo de senescência celular e consequentemente superprodução de estresse oxidativo elevam a produção de TGF-β, promovendo EMT, aumentando o número de células mesenquimais e inflamação, o que aumenta a produção de progesterona, contribuindo tanto para trabalho de parto como a rotura das membranas fetais (13, 101, 102). Portanto, se o cenário inflamatório é capaz estimular MET, fica evidente a relevância de estudos que possam correlacionar a presença de processos inflamatórios e infecciosos com a possibilidade de transição morfológica das células amnióticas.

2. REFERÊNCIAS

1. Vink J, Myers K. Cervical alterations in pregnancy. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2018 Oct;52:88-102. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.03.007. Epub 2018 Apr 11. PMID: 30314740; PMCID: PMC6282836.
2. Liao JB, Buhimschi CS, Norwitz ER. Normal labor: mechanism and duration. Obstet Gynecol Clin North Am. 2005 Jun;32(2):145-64, vii. doi: 10.1016/j.ogc.2005.01.001. PMID: 15899352.
3. Torosyan N, Aziz D, Quesada O. Long-term sequelae of adverse pregnancy outcomes. Maturitas. 2022 Jul 2;165:1-7. doi: 10.1016/j.maturitas.2022.06.012. Epub ahead of print. PMID: 35816901.
4. Meltzer R, Markus AR. An Analysis of Payment Mix Patterns of Preterm Births in a Post-Affordable Care Act Insurance Market: Implications for the Medicaid Program. Womens Health Issues. 2020 Jul-Aug;30(4):248-259. doi: 10.1016/j.whi.2020.04.003. Epub 2020 Jun 4. PMID: 32505430.
5. Institute of Medicine (US) Committee on Understanding Premature Birth and Assuring Healthy Outcomes. Preterm Birth: Causes, Consequences, and Prevention. Behrman RE, Butler AS, editors. Washington (DC): National Academies Press (US); 2007. PMID: 20669423.

6. Vogel JP, Chawanpaiboon S, Moller AB, Watananirun K, Bonet M, Lumbiganon P. The global epidemiology of preterm birth. Best Pract Res Clin ObstetGynaecol. 2018 Oct;52:3-12. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.04.003. Epub 2018 Apr 26. PMID: 29779863.
7. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller AB, Lumbiganon P, Petzold M, Hogan D, Landoulsi S, Jampathong N, Kongwattanakul K, Laopaiboon M, Lewis C, Rattanakanokchai S, et al. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. Lancet Glob Health. 2019 Jan;7(1):e37-e46. doi: 10.1016/S2214-109X(18)30451-0. Epub 2018 Oct 30. PMID: 30389451; PMCID: PMC6293055.
8. Perin J, Mulick A, Yeung D, Villavicencio F, Lopez G, Strong KL, Prieto-Merino D, Cousens S, Black RE, Liu L. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-19: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. Lancet Child Adolesc Health. 2022 Feb;6(2):106-115. doi: 10.1016/S2352-4642(21)00311-4. Epub 2021 Nov 17. Erratum in: Lancet Child Adolesc Health. 2022 Jan;6(1):e4. PMID: 34800370; PMCID: PMC8786667.
9. Sandoval-Colin DE, Godines-Enriquez MS, Espejel-Núñez A, Beltrán-Montoya JJ, Picazo-Mendoza DA, de la Cerda-Ángeles JC, Bello-Chavolla OY, Meraz-Cruz N, Chavira-Suárez E, Vadillo-Ortega F. Cervicovaginal Cytokines to Predict the Onset of Normal and Preterm Labor: a Pseudo-longitudinal Study. Reprod Sci. 2022 Jul 7. doi: 10.1007/s43032-022-01007-9. Epub ahead of print. PMID: 35799020.
10. 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.
11. Farladansky-Gershnabel S, Dekel N, Biron-Shental T, Shechter-Maor G, Amiel A, Weisz A, Benchetrit S, Zitman-Gal T. Spontaneous Preterm Birth: Elevated Galectin-3 and Telomere Shortening May Reflect a Common Pathway of Enhanced Inflammation and Senescence. Reprod Sci. 2022 May 24. doi: 10.1007/s43032-022-00972-5. Epub ahead of print. PMID: 35608796.

12. Tantengco OAG, Richardson LS, Vink J, Kechichian T, Medina PMB, Pyles RB, Menon R. Progesterone alters human cervical epithelial and stromal cell transition and migration: Implications in cervical remodeling during pregnancy and parturition. Mol Cell Endocrinol. 2021 Jun 1;529:111276. doi: 10.1016/j.mce.2021.111276. Epub 2021 Apr 3. PMID: 33823217; PMCID: PMC8491272.
13. Richardson LS, Taylor RN, Menon R. Reversible EMT and MET mediate amnion remodeling during pregnancy and labor. Sci Signal. 2020 Feb 11;13(618):eaay1486. doi: 10.1126/scisignal.aay1486. PMID: 32047115; PMCID: PMC7092701.
14. Richardson LS, Radnaa E, Urrabaz-Garza R, Lavu N, Menon R. Stretch, scratch, and stress: Suppressors and supporters of senescence in human fetal membranes. Placenta. 2020 Sep 15;99:27-34. doi: 10.1016/j.placenta.2020.07.013. Epub 2020 Jul 25. PMID: 32750642; PMCID: PMC7530028.
15. Couture C, Brien ME, Boufaied I, Duval C, Dal Soglio D, Enninga EAL, Cox B, Girard S. Pro-inflammatory changes in the maternal circulation, maternal-fetal interface, and placental transcriptome in preterm birth. Am J Obstet Gynecol. 2022 Aug 23:S0002-9378(22)00677-9. doi: 10.1016/j.ajog.2022.08.035. Epub ahead of print. PMID: 36027951.
16. Wang WS, Lin YK, Zhang F, Lei WJ, Pan F, Zhu YN, Lu JW, Zhang CY, Zhou Q, Ying H, Sun K. Single cell transcriptomic analysis of human amnion identifies cell-specific signatures associated with membrane rupture and parturition. Cell Biosci. 2022 May 18;12(1):64. doi: 10.1186/s13578-022-00797-4. PMID: 35585644; PMCID: PMC9118831.
17. True H, Blanton M, Sureshchandra S, Messaoudi I. Monocytes and macrophages in pregnancy: The good, the bad, and the ugly. Immunol Rev. 2022 Jul;308(1):77-92. doi: 10.1111/imr.13080. Epub 2022 Apr 21. PMID: 35451089.
18. Campanile G, Baruselli PS, Limone A, D'Occhio MJ. Local action of cytokines and immune cells in communication between the conceptus and uterus during the critical period of early embryo development, attachment and implantation - Implications for embryo survival in cattle: A review. Theriogenology. 2021

Jun;167:1-12. doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.02.020. Epub 2021 Mar 9. PMID: 33743503.

19. Mihu CM, Suşman S, Rus Ciucă D, Mihu D, Costin N. Aspects of placental morphogenesis and angiogenesis. Rom J Morphol Embryol. 2009;50(4):549-57. PMID: 19942949.
20. Spence T, Allsopp PJ, Yeates AJ, Mulhern MS, Strain JJ, McSorley EM. Maternal Serum Cytokine Concentrations in Healthy Pregnancy and Preeclampsia. J Pregnancy. 2021 Feb 23;2021:6649608. doi: 10.1155/2021/6649608. PMID: 33680514; PMCID: PMC7925069.
21. Wang W, Sung N, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. T Helper (Th) Cell Profiles in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells. Front Immunol. 2020 Aug 18;11:2025. doi: 10.3389/fimmu.2020.02025. PMID: 32973809; PMCID: PMC7461801.
22. Jacobs SO, Sheller-Miller S, Richardson LS, Urrabaz-Garza R, Radnaa E, Menon R. Characterizing the immune cell population in the human fetal membrane. Am J Reprod Immunol. 2021 May;85(5):e13368. doi: 10.1111/aji.13368. Epub 2020 Nov 24. PMID: 33145922.
23. Menon R. Fetal inflammatory response at the fetomaternal interface: A requirement for labor at term and preterm. Immunol Rev. 2022 Jul;308(1):149-167. doi: 10.1111/imr.13075. Epub 2022 Mar 14. PMID: 35285967; PMCID: PMC9188997.
24. Hansen WR, Drew A, Helsby N, Keelan JA, Sato TA, Mitchell MD. Regulation of cytosolic phospholipase A2 expression by cytokines in human amnion cells. Placenta. 1999 May;20(4):303-8. doi: 10.1053/plac.1998.0376. PMID: 10329351.
25. 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 Sep;195(3):803-8. doi: 10.1016/j.ajog.2006.06.083. PMID: 16949415.
26. Phillips RJ, Fortier MA, López Bernal A. Prostaglandin pathway gene expression in human placenta, amnion and choriodecidua is differentially affected by preterm and term labour and by uterine inflammation. BMC Pregnancy Childbirth. 2014

Jul 22;14:241. doi: 10.1186/1471-2393-14-241. PMID: 25048443; PMCID: PMC4223419.

27. Lee JE, Dan K, Kim HJ, Kim YM, Park KH. Plasma proteomic analysis to identify potential biomarkers of histologic chorioamnionitis in women with preterm premature rupture of membranes. PLoS One. 2022 Jul 7;17(7):e0270884. doi: 10.1371/journal.pone.0270884. PMID: 35797368; PMCID: PMC9262229.
28. Huang Q, Jin X, Li P, Zheng Z, Jiang Y, Liu H. Elevated inflammatory mediators from the maternal-fetal interface to fetal circulation during labor. Cytokine. 2021 Dec;148:155707. doi: 10.1016/j.cyto.2021.155707. Epub 2021 Sep 21. PMID: 34560611.
29. 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.
30. Bauer S, Müller T, Hamm S. Pattern recognition by Toll-like receptors. Adv Exp Med Biol. 2009;653:15-34. doi: 10.1007/978-1-4419-0901-5_2. PMID: 19799109.
31. Patni S, Flynn P, Wynen LP, Seager AL, Morgan G, White JO, Thornton CA. An introduction to Toll-like receptors and their possible role in the initiation of labour. BJOG. 2007 Nov;114(11):1326-34. doi: 10.1111/j.1471-0528.2007.01488.x. Epub 2007 Sep 27. PMID: 17903232.
32. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006 Feb 24;124(4):783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015. PMID: 16497588.
33. Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. Exp Mol Med. 2013 Dec 6;45(12):e66. doi: 10.1038/emm.2013.97. PMID: 24310172; PMCID: PMC3880462.
34. Olmos-Ortiz A, Flores-Espinosa P, Mancilla-Herrera I, Vega-Sánchez R, Díaz L, Zaga-Clavellina V. Innate Immune Cells and Toll-like Receptor-Dependent Responses at the Maternal-Fetal Interface. Int J Mol Sci. 2019 Jul 26;20(15):3654. doi: 10.3390/ijms20153654. PMID: 31357391; PMCID: PMC6695670.

35. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol. 2002;20:197-216. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359. Epub 2001 Oct 4. PMID: 11861602.
36. Lee SM, Park KH, Jung EY, Kook SY, Park H, Jeon SJ. Inflammatory proteins in maternal plasma, cervicovaginal and amniotic fluids as predictors of intra-amniotic infection in preterm premature rupture of membranes. PLoS One. 2018 Jul 6;13(7):e0200311. doi: 10.1371/journal.pone.0200311. PMID: 29979758; PMCID: PMC6034889.
37. Lee SM, Park KH, Jung EY, Kook SY, Park H, Jeon SJ. Inflammatory proteins in maternal plasma, cervicovaginal and amniotic fluids as predictors of intra-amniotic infection in preterm premature rupture of membranes. PLoS One. 2018 Jul 6;13(7):e0200311. doi: 10.1371/journal.pone.0200311. PMID: 29979758; PMCID: PMC6034889.
38. Kim SA, Park KH, Lee SM, Kim YM, Hong S. Inflammatory Proteins in the Amniotic Fluid, Plasma, and Cervicovaginal Fluid for the Prediction of Intra-Amniotic Infection/Inflammation and Imminent Preterm Birth in Preterm Labor. Am J Perinatol. 2022 May;39(7):766-775. doi: 10.1055/s-0040-1718575. Epub 2020 Oct 14. PMID: 33053591.
39. Leroy MJ, Dallot E, Czerkiewicz I, Schmitz T, Breuiller-Fouché M. Inflammation of choriodecidua induces tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis of human myometrial cells. Biol Reprod. 2007 May;76(5):769-76. doi: 10.1095/biolreprod.106.058057. Epub 2007 Jan 10. PMID: 17215489.
40. Griesinger G, Saleh L, Bauer S, Husslein P, Knöfler M. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines of human placental trophoblasts in response to pathogenic bacteria. J Soc Gynecol Investig. 2001 Nov-Dec;8(6):334-40. PMID: 11750868.
41. Joo E, Park KH, Kim YM, Ahn K, Hong S. Maternal Plasma and Amniotic Fluid LBP, Pentraxin 3, Resistin, and IGFBP-3: Biomarkers of Microbial Invasion of Amniotic Cavity and/or Intra-amniotic Inflammation in Women with Preterm Premature Rupture of Membranes. J Korean Med Sci. 2021 Nov 15;36(44):e279. doi: 10.3346/jkms.2021.36.e279. PMID: 34783213; PMCID: PMC8593411.

42. Kacerovsky M, Pliskova L, Bolehovska R, Lesko D, Gerychova R, Janku P, Matlak P, Simetka O, Stranik J, Faist T, Mls J, Vescicik P, Jacobsson B, Musilova I. Cervical Gardnerella vaginalis in women with preterm prelabor rupture of membranes. PLoS One. 2021 Jan 22;16(1):e0245937. doi: 10.1371/journal.pone.0245937. PMID: 33481958; PMCID: PMC7822511.
43. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, Chaiworapongsa T, Mazor M. The preterm parturition syndrome. BJOG. 2006 Dec;113 Suppl 3(Suppl 3):17-42. doi: 10.1111/j.1471-0528.2006.01120.x. Erratum in: BJOG. 2008 Apr;115(5):674-5. PMID: 17206962; PMCID: PMC7062298.
44. Ryu A, Park KH, Oh KJ, Lee SY, Jeong EH, Park JW. Predictive value of combined cervicovaginal cytokines and gestational age at sampling for intra-amniotic infection in preterm premature rupture of membranes. Acta Obstet Gynecol Scand. 2013 May;92(5):517-24. doi: 10.1111/aogs.12073. Epub 2013 Feb 9. PMID: 23324124.
45. Jacobsson B, Aaltonen R, Rantakokko-Jalava K, Morken NH, Alanen A. Quantification of Ureaplasma urealyticum DNA in the amniotic fluid from patients in PTL and pPROM and its relation to inflammatory cytokine levels. Acta Obstet Gynecol Scand. 2009;88(1):63-70. doi: 10.1080/00016340802572646. PMID: 19031281.
46. Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera H, Espejel-Nuñez A, Flores-Pliego A, Soriano-Becerril D, Maida-Claros R, Merchant-Larios H, Vadillo-Ortega F. 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 Dec 13;5:46. doi: 10.1186/1477-7827-5-46. PMID: 18078521; PMCID: PMC2175507.
47. Manimtim WM, Hasday JD, Hester L, Fairchild KD, Lovchik JC, Viscardi RM. Ureaplasma urealyticum modulates endotoxin-induced cytokine release by human monocytes derived from preterm and term newborns and adults. Infect Immun. 2001 Jun;69(6):3906-15. doi: 10.1128/IAI.69.6.3906-3915.2001. PMID: 11349058; PMCID: PMC98421.

48. Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, Padbury J, Sharma S. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. J Immunol. 2000 Jun 1;164(11):5721-8. doi: 10.4049/jimmunol.164.11.5721. PMID: 10820249.
49. Robertson SA, Skinner RJ, Care AS. Essential role for IL-10 in resistance to lipopolysaccharide-induced preterm labor in mice. J Immunol. 2006 Oct 1;177(7):4888-96. doi: 10.4049/jimmunol.177.7.4888. PMID: 16982931.
50. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. Crit Rev Immunol. 2012;32(1):23-63. doi: 10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30. PMID: 22428854; PMCID: PMC3410706.
51. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. J Immunol. 1991 May 15;146(10):3444-51. PMID: 1827484.
52. Chawla D. Genetic Polymorphism and Preterm Birth. Indian J Pediatr. 2018 Feb;85(2):83-84. doi: 10.1007/s12098-017-2571-2. Epub 2017 Dec 14. PMID: 29238938.
53. Cao XL, Zhou XY, Xu NX, Chen SC, Xu CM. Association of IL-4 and IL-10 Polymorphisms With Preterm Birth Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. Front Immunol. 2022 Jul 4;13:917383. doi: 10.3389/fimmu.2022.917383. PMID: 35860261; PMCID: PMC9289468.
54. Mao Y, Liu Z, Zhang C, Wang Y, Meng Y, Chen L, Sheng J, Wu Y, Huang H. Association between paternal age and subtypes of preterm birth: a retrospective study. Reprod Biomed Online. 2022 Jun;44(6):1101-1109. doi: 10.1016/j.rbmo.2021.12.012. Epub 2021 Dec 21. PMID: 35400578.
55. Mao Y, Liu Z, Zhang C, Wang Y, Meng Y, Chen L, Sheng J, Wu Y, Huang H. Association between paternal age and subtypes of preterm birth: a retrospective study. Reprod Biomed Online. 2022 Jun;44(6):1101-1109. doi: 10.1016/j.rbmo.2021.12.012. Epub 2021 Dec 21. PMID: 35400578.
56. Esposito G, Mauri PA, Cipriani S, Franchi M, Corrao G, Parazzini F. The role of maternal age on the risk of preterm birth among singletons and multiples: a retrospective cohort study in Lombardy, Norther Italy. BMC Pregnancy Childbirth. 2022 Mar 22;22(1):234. doi: 10.1186/s12884-022-04552-y. Erratum

in: BMC Pregnancy Childbirth. 2022 Apr 28;22(1):366. PMID: 35317757; PMCID: PMC8941739.

57. Thoma ME, Drew LB, Hirai AH, Kim TY, Fenelon A, Shenassa ED. Black-White Disparities in Preterm Birth: Geographic, Social, and Health Determinants. Am J Prev Med. 2019 Nov;57(5):675-686. doi: 10.1016/j.amepre.2019.07.007. Epub 2019 Sep 25. PMID: 31561920.
58. Ekwo E, Moawad A. The risk for recurrence of premature births to African-American and white women. J Assoc Acad Minor Phys. 1998;9(1):16-21. PMID: 9585671.
59. Cobo T, Kacerovsky M, Jacobsson B. Risk factors for spontaneous preterm delivery. Int J Gynaecol Obstet. 2020 Jul;150(1):17-23. doi: 10.1002/ijgo.13184. PMID: 32524595.
60. Kumar S, Sharma S, Thaker R. Occupational, Environmental, and Lifestyle Factors and their Contribution to Preterm Birth - An Overview. Indian J Occup Environ Med. 2017 Jan-Apr;21(1):9-17. doi: 10.4103/ijoem.IJOEM_155_16. PMID: 29391742; PMCID: PMC5763842.
61. Di Renzo GC, Tosto V, Giardina I. The biological basis and prevention of preterm birth. Best Pract Res Clin ObstetGynaecol. 2018 Oct;52:13-22. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.01.022. Epub 2018 Feb 16.
62. Glover AV, Manuck TA. Screening for spontaneous preterm birth and resultant therapies to reduce neonatal morbidity and mortality: A review. Semin Fetal Neonatal Med. 2018 Apr;23(2):126-132. doi: 10.1016/j.siny.2017.11.007. Epub 2017 Dec 9.
63. 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 Oct;11(5):317-26. doi: 10.1016/j.siny.2006.05.001. Epub 2006 Jul 12. PMID: 16839830; PMCID: PMC8315239.
64. 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 Jun;65(6):549-56. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00940.x. Epub 2011 Jan 9. PMID: 21214658.

65. Jones HE, Harris KA, Azizia M, Bank L, Carpenter B, Hartley JC, Klein N, Peebles D. Differing prevalence and diversity of bacterial species in fetal membranes from very preterm and term labor. PLoS One. 2009 Dec 8;4(12):e8205. doi: 10.1371/journal.pone.0008205. PMID: 19997613; PMCID: PMC2785424.
66. Kim MJ, Romero R, Gervasi MT, Kim JS, Yoo W, Lee DC, Mittal P, Erez O, Kusanovic JP, Hassan SS, Kim CJ. Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection. Lab Invest. 2009 Aug;89(8):924-36. doi: 10.1038/labinvest.2009.49. Epub 2009 Jun 8. PMID: 19506551; PMCID: PMC2743483.
67. DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. Semin Fetal Neonatal Med. 2012 Feb;17(1):2-11. doi: 10.1016/j.siny.2011.10.001. Epub 2011 Dec 3. PMID: 22137615.
68. Redelinghuys MJ, Geldenhuys J, Jung H, Kock MM. Bacterial Vaginosis: Current Diagnostic Avenues and Future Opportunities. Front Cell Infect Microbiol. 2020 Aug 11;10:354. doi: 10.3389/fcimb.2020.00354. PMID: 32850469; PMCID: PMC7431474.
69. Onderdonk AB, Delaney ML, Fichorova RN. The Human Microbiome during Bacterial Vaginosis. Clin Microbiol Rev. 2016 Apr;29(2):223-38. doi: 10.1128/CMR.00075-15. PMID: 26864580; PMCID: PMC4786887.
70. Coudray MS, Madhivanan P. Bacterial vaginosis-A brief synopsis of the literature. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2020 Feb;245:143-148. doi: 10.1016/j.ejogrb.2019.12.035. Epub 2019 Dec 24. PMID: 31901667; PMCID: PMC6989391.
71. Hernández-Rodríguez C, Romero-González R, Albani-Campanario M, Figueroa-Damián R, Meraz-Cruz N, Hernández-Guerrero C. Vaginal microbiota of healthy pregnant Mexican women is constituted by four Lactobacillus species and several vaginosis-associated bacteria. Infect Dis Obstet Gynecol. 2011;2011:851485. doi: 10.1155/2011/851485. Epub 2011 Sep 22. PMID: 21960733; PMCID: PMC3179877.
72. Hyman RW, Fukushima M, Jiang H, Fung E, Rand L, Johnson B, Vo KC, Caughey AB, Hilton JF, Davis RW, Giudice LC. Diversity of the vaginal

microbiome correlates with preterm birth. Reprod Sci. 2014 Jan;21(1):32-40. doi: 10.1177/1933719113488838. Epub 2013 May 28. PMID: 23715799; PMCID: PMC3857766.

73. Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, De Backer E, Temmerman M, Vaneechoutte M. Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that L. crispatus promotes the stability of the normal vaginal microflora and that L. gasseri and/or L. iners are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. BMC Microbiol. 2009 Jun 2;9:116. doi: 10.1186/1471-2180-9-116. PMID: 19490622; PMCID: PMC2698831.
74. Capoccia R, Greub G, Baud D. Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis and adverse pregnancy outcomes. Curr Opin Infect Dis. 2013 Jun;26(3):231-40. doi: 10.1097/QCO.0b013e328360db58. PMID: 23587772.
75. 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 May;32(3):194-200. doi: 10.3343/alm.2012.32.3.194. Epub 2012 Apr 18. PMID: 22563554; PMCID: PMC3339299.
76. Romero R, Gomez-Lopez N, Winters AD, Jung E, Shaman M, Bieda J, Panaitescu B, Pacora P, Erez O, Greenberg JM, Ahmad MM, Hsu CD, Theis KR. Evidence that intra-amniotic infections are often the result of an ascending invasion - a molecular microbiological study. J Perinat Med. 2019 Nov 26;47(9):915-931. doi: 10.1515/jpm-2019-0297. PMID: 31693497; PMCID: PMC7147941.
77. Allen-Daniels MJ, Serrano MG, Pflugner LP, Fettweis JM, Prestosa MA, Koparde VN, Brooks JP, Strauss JF 3rd, Romero R, Chaiworapongsa T, Eschenbach DA, Buck GA, Jefferson KK. Identification of a gene in Mycoplasma hominis associated with preterm birth and microbial burden in intraamniotic infection. Am J Obstet Gynecol. 2015 Jun;212(6):779.e1-779.e13. doi: 10.1016/j.ajog.2015.01.032. Epub 2015 Jan 28. PMID: 25637842; PMCID: PMC4457590
78. Nguyen DP, Gerber S, Hohlfeld P, Sandrine G, Witkin SS. Mycoplasma hominis in mid-trimester amniotic fluid: relation to pregnancy outcome. J Perinat Med. 2004;32(4):323-6. doi: 10.1515/JPM.2004.060. PMID: 15346817.

79. Kacerovsky M, Pliskova L, Menon R, Kutova R, Musilova I, Maly J, Andrys C. Microbial load of umbilical cord blood Ureaplasma species and Mycoplasma hominis in preterm prelabor rupture of membranes. J Matern Fetal Neonatal Med. 2014 Nov;27(16):1627-32. doi: 10.3109/14767058.2014.887068. Epub 2014 Feb 17. PMID: 24450299.
80. Cahill RJ, Tan S, Dougan G, O'Gaora P, Pickard D, Kennea N, Sullivan MH, Feldman RG, Edwards AD. Universal DNA primers amplify bacterial DNA from human fetal membranes and link Fusobacterium nucleatum with prolonged preterm membrane rupture. Mol Hum Reprod. 2005 Oct;11(10):761-6. doi: 10.1093/molehr/gah234. Epub 2005 Oct 27. PMID: 16254004.
81. Kwak DW, Hwang HS, Kwon JY, Park YW, Kim YH. 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. 2014 Mar;27(4):333-7. doi: 10.3109/14767058.2013.818124. Epub 2013 Jul 18. PMID: 23796000.
82. 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 Nov;24(3):253-7. doi: 10.1099/00222615-24-3-253. PMID: 3669058.
83. Harada K, Tanaka H, Komori S, Tsuji Y, Nagata K, Tsutsui H, Koyama K. Vaginal infection with Ureaplasma urealyticum accounts for preterm delivery via induction of inflammatory responses. Microbiol Immunol. 2008 Jun;52(6):297-304. doi: 10.1111/j.1348-0421.2008.00039.x. PMID: 18577163.
84. Romero R, Gomez-Lopez N, Winters AD, Jung E, Shaman M, Bieda J, Panaitescu B, Pacora P, Erez O, Greenberg JM, Ahmad MM, Hsu CD, Theis KR. Evidence that intra-amniotic infections are often the result of an ascending invasion - a molecular microbiological study. J Perinat Med. 2019 Nov 26;47(9):915-931. doi: 10.1515/jpm-2019-0297. PMID: 31693497; PMCID: PMC7147941.
85. Doyle RM, Harris K, Kamiza S, Harjunmaa U, Ashorn U, Nkhoma M, Dewey KG, Maleta K, Ashorn P, Klein N. Bacterial communities found in placental tissues are associated with severe chorioamnionitis and adverse birth outcomes.

PLoS One. 2017 Jul 12;12(7):e0180167. doi: 10.1371/journal.pone.0180167. PMID: 28700642; PMCID: PMC5507499.

86. Kurian NK, Modi D. Mechanisms of group B Streptococcus-mediated preterm birth: lessons learnt from animal models. Reprod Fertil. 2022 Jun 7;3(3):R109-R120. doi: 10.1530/RAF-21-0105. PMID: 35794927; PMCID: PMC9254271.
87. Singh N, Pattnaik L, Panda SR, Jena P, Panda J. Fetomaternal Outcomes in Women Affected With Preterm Premature Rupture of Membranes: An Observational Study From a Tertiary Care Center in Eastern India. Cureus. 2022 May 31;14(5):e25533. doi: 10.7759/cureus.25533. PMID: 35800788; PMCID: PMC9246467.
88. Ambalpady PA, Samantroy S, Mishra A, Panda J, Pattnaik D, Jena P. Microbiome Diversity in Vaginal Fluid and Sensitivity Patterns in Preterm Premature Rupture of Membrane Cases. Cureus. 2022 Jan 6;14(1):e20999. doi: 10.7759/cureus.20999. PMID: 35154973; PMCID: PMC8820494.
89. Doster RS, Kirk LA, Tetz LM, Rogers LM, Aronoff DM, Gaddy JA. Staphylococcus aureus Infection of Human Gestational Membranes Induces Bacterial Biofilm Formation and Host Production of Cytokines. J Infect Dis. 2017 Feb 15;215(4):653-657. doi: 10.1093/infdis/jiw300. PMID: 27436434; PMCID: PMC5853272.
90. Han YW, Fardini Y, Chen C, Iacampo KG, Peraino VA, Shamonki JM, Redline RW. Term stillbirth caused by oral Fusobacterium nucleatum. Obstet Gynecol. 2010 Feb;115(2 Pt 2):442-445. doi: 10.1097/AOG.0b013e3181cb9955. PMID: 20093874; PMCID: PMC3004155.
91. Scheible M, Nguyen CT, Luong TT, Lee JH, Chen YW, Chang C, Wittchen M, Camacho MI, Tiner BL, Wu C, Tauch A, Das A, Ton-That H. The Fused Methionine Sulfoxide Reductase MsrAB Promotes Oxidative Stress Defense and Bacterial Virulence in Fusobacterium nucleatum. mBio. 2022 Jun 28;13(3):e0302221. doi: 10.1128/mbio.03022-21. Epub 2022 Apr 14. PMID: 35420473; PMCID: PMC9239216.
92. Han YW. Fusobacterium nucleatum: a commensal-turned pathogen. Curr Opin Microbiol. 2015 Feb;23:141-7. doi: 10.1016/j.mib.2014.11.013. Epub 2015 Jan 8. PMID: 25576662; PMCID: PMC4323942.

93. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. Sci Transl Med. 2014 May 21;6(237):237ra65. doi: 10.1126/scitranslmed.3008599. PMID: 24848255; PMCID: PMC4929217.
94. Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, Narbad A, Olivares M, Xaus J, Rodríguez JM. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. Curr Microbiol. 2005 Oct;51(4):270-4. doi: 10.1007/s00284-005-0020-3. Epub 2005 Sep 20. PMID: 16187156.
95. Reid G, Younes JA, Van der Mei HC, Gloor GB, Knight R, Busscher HJ. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. Nat Rev Microbiol. 2011 Jan;9(1):27-38. doi: 10.1038/nrmicro2473. Epub 2010 Nov 29. PMID: 21113182.
96. Kervinen K, Holster T, Saqib S, Virtanen S, Stefanovic V, Rahkonen L, Nieminen P, Salonen A, Kalliala I. Parity and gestational age are associated with vaginal microbiota composition in term and late term pregnancies. EBioMedicine. 2022 Jul;81:104107. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104107. Epub 2022 Jun 24. PMID: 35759916; PMCID: PMC9250009.
97. Dunlop AL, Satten GA, Hu YJ, Knight AK, Hill CC, Wright ML, Smith AK, Read TD, Pearce BD, Corwin EJ. Vaginal Microbiome Composition in Early Pregnancy and Risk of Spontaneous Preterm and Early Term Birth Among African American Women. Front Cell Infect Microbiol. 2021 Apr 29;11:641005. doi: 10.3389/fcimb.2021.641005. PMID: 33996627; PMCID: PMC8117784.
98. Jones HE, Harris KA, Azizia M, Bank L, Carpenter B, Hartley JC, Klein N, Peebles D. Differing prevalence and diversity of bacterial species in fetal membranes from very preterm and term labor. PLoS One. 2009 Dec 8;4(12):e8205. doi: 10.1371/journal.pone.0008205. PMID: 19997613; PMCID: PMC2785424.
99. Richardson LS, Menon PR, Menon R. The effects of extracellular matrix rigidity on 3-dimensional cultures of amnion membrane cells. Placenta. 2020 Jan 15;90:82-89. doi: 10.1016/j.placenta.2019.12.008. Epub 2019 Dec 6. PMID: 32056556; PMCID: PMC8050838.

100. Richardson LS, Radnaa E, Urrabaz-Garza R, Lavu N, Menon R. Stretch, scratch, and stress: Suppressors and supporters of senescence in human fetal membranes. Placenta. 2020 Sep 15;99:27-34. doi: 10.1016/j.placenta.2020.07.013. Epub 2020 Jul 25. PMID: 32750642; PMCID: PMC7530028.
101. Menon R. Initiation of human parturition: signaling from senescent fetal tissues via extracellular vesicle mediated paracrine mechanism. Obstet Gynecol Sci. 2019 Jul;62(4):199-211. doi: 10.5468/ogs.2019.62.4.199. Epub 2019 Jun 28. PMID: 31338337; PMCID: PMC6629986.
102. Sato BL, Collier ES, Vermudez SA, Junker AD, Kendal-Wright CE. Human amnion mesenchymal cells are pro-inflammatory when activated by the Toll-like receptor 2/6 ligand, macrophage-activating lipoprotein-2. Placenta. 2016 Aug;44:69-79. doi: 10.1016/j.placenta.2016.06.005. Epub 2016 Jun 11. PMID: 27452440; PMCID: PMC4964608.

Capítulo II

,