

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

**INTERLEUCINA 1 β E INTERLEUCINA 6 NO LÍQUIDO AMNIÓTICO: RELAÇÃO
COM INVASÃO MICROBIANA DA CAVIDADE AMNIÓTICA EM GESTANTES EM
TRABALHO DE PARTO PREMATURO**

CAMILA MARCONI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

BOTUCATU

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Marconi, Camila.

Interleucina 1 β e Interleucina 6 no líquido amniótico: relação com invasão microbiana da cavidade amniótica em gestantes em trabalho de parto prematuro / Camila Marconi. – Botucatu : [s.n.], 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2008.

Orientadora: Profa, Dra. Márcia Guimarães da Silva

Assunto CAPES: 40101150

1. Gravidez 2. Parto prematuro

CDD 618.397

Palavras-chave: Citocinas; Gestação; Infecção; Líquido amniótico; Trabalho de parto prematuro

Sumário

Capítulo I

Revisão de literatura.....	06
Referências bibliográficas.....	13

Capítulo II - Manuscrito

Resumo.....	20
Abstract.....	21
1. Introdução.....	22
2. Material e Métodos	24
2.1. Desenho do estudo.....	24
2.2. Pacientes.....	24
2.3. Colheita de líquido amniótico.....	25
2.4. Pesquisa de invasão microbiana na cavidade amniótica.....	26
2.4.1. Detecção de <i>Ureaplasma urealyticum</i> e <i>Mycoplasma hominis</i> no líquido amniótico	26
2.4.1.1. Extração do ácido nucléico.....	26
2.4.1.2. Controles positivos das PCRs.....	26
2.4.1.3. Amplificação da sequência de 429bp do gene da urease de <i>Ureaplasma urealyticum</i>	27
2.4.1.4. Amplificação da sequência de 334bp do gene RNA ribossômico 16S de <i>Mycoplasma hominis</i>	27
2.4.1.5. Visualização dos produtos amplificados.....	27
2.4.2. Pesquisa de infecção do LA por outras espécies bacterianas através da detecção do gene RNAr 16S.....	28
2.4.2.1. Extração do ácido nucléico com solução de CTAB (cetyltrimethylammonium bromide).....	28
2.4.2.2. Amplificação da sequência de aproximadamente 1500bp do gene bacteriano RNAr 16S.....	29
2.4.2.3. Visualização dos produtos amplificados.....	29
2.4.3. Seqüenciamento do gene bacteriano RNAr 16S.....	30
2.4.3.1. Reação de seqüenciamento.....	30
2.4.3.2. Reação de precipitação.....	30
2.4.3.3. Seqüenciamento.....	30
2.5. Determinação de citocinas no LA por ensaio imunoenzimático (ELISA).....	30

2.6. Análise estatística.....	32
3. Resultados	33
3.1. Incidência de TPP e características das gestantes.....	33
3.2. Detecção de invasão microbiana na cavidade amniótica.....	34
3.2.1. Detecção de <i>Mycoplasma hominis</i> e <i>Ureaplasma urealyticum</i> no líquido amniótico.....	34
3.2.2. Detecção de infecção do líquido amniótico por outras espécies bacterianas.....	35
3.2.3. Identificação das espécies bacterianas no líquido amniótico pelo sequenciamento do gene RNAr 16S....	36
3.3. Análise de citocinas no líquido amniótico.....	37
3.4. Análise de citocinas no líquido amniótico em relação à presença de infecção da cavidade amniótica.....	38
4. Discussão.....	39
5. Referências Bibliográficas.....	43

Revisão de literatura

O Trabalho de Parto Prematuro (TPP) é uma importante intercorrência obstétrica que acomete de 5 a 10% das gestações¹⁻³ e, apesar dos novos tratamentos e estratégias de prevenção, sua incidência não tem diminuído nos últimos anos⁴. O TPP é caracterizado pela presença de uma ou mais contrações a cada 10 minutos, com ritmo e frequência regulares, acompanhadas de esvaecimento cervical igual ou superior a 50% e/ou dilatação cervical igual ou superior a 2 cm, no período em que a idade gestacional encontra-se entre 22 e 37 semanas⁵. A principal complicação relacionada aos episódios de TPP é a prematuridade, que é responsável por 70% dos índices de morbidade e mortalidade perinatal⁶.

A etiologia do TPP é multifatorial, já que muitos fatores de risco podem estar envolvidos e atuando conjuntamente até a instalação deste processo. Muitos fatores associados à ocorrência de TPP são conhecidos, como a ocorrência de TPP em gestações prévias, múltiplas gestações, polidramnia, sangramento vaginal durante a gestação, rotura prematura de membranas (RPM), vaginose bacteriana (VB), entre outros^{5,7-9}. A diversidade de fatores potencialmente envolvidos na etiologia do TPP é, sem dúvida, uma dificuldade para o desenvolvimento de medidas efetivas para sua prevenção¹⁰.

Atualmente, inúmeros estudos têm buscado elucidar causas e mecanismos envolvidos no desenvolvimento do TPP. No entanto, apesar das várias contribuições realizadas, a patogênese do TPP ainda não é completamente conhecida^{1,11,12}.

Entre os fatores que são conhecidamente relacionados ao desenvolvimento do TPP, a infecção da cavidade amniótica (CA) merece destaque por estar freqüentemente associada a episódios de TPP^{1,13,14}. Define-se como infecção da CA a presença de microrganismos no líquido amniótico (LA), na presença ou ausência de sinais clínicos de infecção¹⁵.

Trabalhos da literatura relatam diferentes taxas de cultura positiva do líquido amniótico, variando de 10 a 40% dos casos de TPP^{14,16-18}. Somado a isso, já foi demonstrado que pacientes com infecção da CA, no segundo trimestre de gestação, têm risco aumentado para o desenvolvimento dessa complicação¹⁹. Segundo Goldenberg et al.¹⁴, a infecção da cavidade

amniótica está relacionada a 80% dos casos de TPP com idade gestacional inferior a 30 semanas, comparado com apenas 30% das gestantes, em trabalho de parto, com idade superior a 37 semanas. Outros estudos, porém, têm relatado a presença de vírus²⁰ e inúmeras espécies de bactérias²¹ no líquido amniótico de pacientes assintomáticas.

Acredita-se que as taxas de infecção do LA relatadas por estudos que utilizam métodos de cultura convencionais podem ser subestimados, visto a inexistência de métodos capazes de suprir todas as exigências dos inúmeros microrganismos potencialmente presentes no LA²². No entanto, a introdução de novas metodologias moleculares, que possibilitam a pesquisa de seqüências conservadas inter-espécies, como o gene RNA ribossômico 16S, têm se mostrado muito eficiente para a determinação das frequências reais de positividade de infecção do LA²³⁻²⁵.

Os microrganismos podem ter acesso às membranas corioamnióticas e ao LA por algumas vias: ascendente transcervical, hematogênica através da placenta, iatrogênica no momento da amniocentese e outros procedimentos invasivos ou oriundo da cavidade peritoneal por meio das tubas uterinas¹.

O conceito que a invasão microbiana da cavidade amniótica segue a via ascendente é apoiado pela observação de que, em geral, os microrganismos isolados do líquido amniótico de gestantes com RPM, são similares aos encontrados no trato genital inferior (TGI)²⁶. Sustentando esse conceito, Galask et al.²⁷ descreveram que os microrganismos presentes no TGI apresentam capacidade de atingir as membranas e infectar a cavidade amniótica. A importância da infecção, por via ascendente, também pode ser demonstrada pelos resultados que revelam presença de bactéria nas membranas corioamnióticas, associadas à resposta inflamatória, em 80% de gestantes em TPP que tiveram a resolução da gestação por cesárea²⁸.

Gyr et al.²⁹ demonstraram que as espécies bacterianas que colonizam o TGI apresentam diferença quanto à capacidade de invasão das membranas corioamnióticas. Somado a isso, já é conhecido que algumas espécies bacterianas encontradas colonizando o TGI, principalmente aquelas associadas à VB, liberam sialidases e prolidases. As sialidases são enzimas que clivam o ácido siálico de glicoproteínas, dentre elas a IgA, mucinas e receptores celulares e, dessa forma, está associada à evasão da imunidade inata e adquirida, pela degradação da IgA cervical e

alteração de receptores da membrana celular, respectivamente³⁰. As prolidases são enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular, facilitam a infiltração celular e, portanto, contribuem para a quebra da barreira de proteção das mucosas³¹. Segundo Cauci et al.³², mulheres, no segundo trimestre de gestação, com maiores atividades de sialidase e prolidase, acompanhadas de aumento de pH vaginal apresentam maior risco de desenvolver parto prematuro. Ainda segundo esses autores, as inter-relações sinérgicas entre os fatores de virulência produzidos por bactérias, presentes na microbiota vaginal alterada, estiveram associados ao risco elevado de resultados gestacionais adversos.

Inúmeras espécies bacterianas são encontradas colonizando o TGI como: *Lactobacillus* sp, *Gardnerella vaginalis*, *Bacterioides* sp., *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, entre outros^{33,34}. Dentre os microrganismos citados, as espécies *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*, merecem destaque por serem freqüentemente encontrados no líquido amniótico e associados aos casos de TPP^{19,35-37}.

Estudos recentes têm detectado a presença de micoplasmas em líquido amniótico pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), que além de ser mais rápida, apresenta aumento da sensibilidade quando comparada com as técnicas de culturas convencionais^{38,39}. Diferentes espécies de micoplasmas podem ser isoladas do TGI, porém apenas as espécies *M. hominis* e *U. urealyticum* são consideradas importantes patógenos humanos⁴⁰. Esses microrganismos estão associados ao desenvolvimento de inúmeras complicações como cervicite, doença inflamatória pélvica, RPM, corioamnionite, parto prematuro, além de infecções em recém-nascidos⁴¹.

A presença de microrganismos na CA leva a 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* (TLR) 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 fatores⁴². Assim, a presença de microrganismos no LA,

reconhecidos pelos TLR presentes nas membranas corioamnióticas, pode ser considerada a base patológica de muitos casos de TPP e/ou RPM associados à infecção.

Já é aceito na literatura que os microrganismos e seus produtos podem ascender do trato genital inferior para a cavidade amniótica¹⁵ e suscitar resposta inflamatória local, levando ao TPP e ao parto prematuro^{16,43}. Em concordância com esses achados, estudo recente demonstrou que 80% das gestantes em TPP apresentavam presença de bactéria nas membranas corioamnióticas associada à resposta inflamatória no LA²⁸.

Na presença de infecção do LA, células amnióticas, coriônicas e deciduais secretam citocinas inflamatórias que podem atuar indiretamente, induzindo aumento da atividade uterina. Níveis elevados de interleucina (IL) 1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no LA dessas gestantes, também sugerem presença de infecção, mesmo quando sinais clínicos estão ausentes, havendo correlação entre infecção intra-amniótica e corioamnionite histológica¹⁶. Portanto, a presença de microrganismos na cavidade amniótica leva à ativação da imunidade inata, mediada por células, que se caracteriza pela produção de citocinas e, portanto, o estudo de mediadores inflamatórios tem mostrado desempenhar importante papel para a compreensão da fisiopatologia do TPP.

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular secretadas por leucócitos e outras inúmeras células do organismo em resposta a diferentes estímulos, atuando como mediadoras das células do sistema imune⁴⁴.

A IL-1 β é um produto de monócitos/macrófagos, que atua como estimulador para linfócitos e timócitos, sendo ainda secretada por células de Hofbauer da placenta, desempenhando papel fundamental na regulação da resposta inflamatória em tecidos lesados. A IL-1 β foi a primeira citocina implicada no início do TPP associado à infecção⁴⁵. A evidência que sustenta a participação de IL-1 nessa complicação gestacional é que essa citocina é produzida por células deciduais em resposta a produtos bacterianos^{46,47}. Além disso, a IL-1 pode estimular produção de prostaglandina pelo epitélio amniótico e pelas células deciduais⁴⁸ e estimular contratilidade miometrial⁴⁹. Já é conhecido que a administração de IL-1 em animais prenhes induz TPP⁴⁶,

fenômeno este que pode ser bloqueado através da administração de seu receptor antagonista⁵⁰. Em pacientes com corioamnionite histológica a IL-1 β é expressa em células inflamatórias do cório e da decídua, sendo os macrófagos a principal fonte dessa citocina nesses tecidos⁵¹.

A IL-6, a exemplo da IL-1 β , também é secretada por vários tipos celulares dentre eles células endometriais, deciduais e macrófagos. Lockwood et al.⁵², determinando a concentração de IL-6 na secreção cervical de pacientes com parto prematuro, concluíram que níveis aumentados dessa citocina, quantificados entre a 24^a e 36^a semanas de gestação, estão relacionados com RPM, sendo que, em metade dos casos, níveis maiores que 250 pg/mL estão relacionados a RPM. Estudos^{13,53,54} têm sugerido que a IL-6 é a citocina mais envolvida na fisiopatologia do TPP associado a infecção da cavidade amniótica. Concentrações acima de 1,5 ng/mL foram detectadas no líquido amniótico de 88% das mulheres com parto prematuro em idade gestacional inferior a 34 semanas, quando comparadas com 12% das mulheres com parto prematuro após 34 semanas de gestação¹².

De acordo com Jacobsson et al.⁵⁵, pacientes com invasão microbiana da cavidade amniótica apresentaram níveis significativamente elevados de IL-6 em relação àquelas sem infecção do LA. Ainda segundo esses autores, as pacientes que tiveram resolução da gestação em até sete dias do início do TPP apresentaram níveis superiores de IL-6 no LA em comparação às gestantes com período superior a sete dias entre o início do TPP e o parto. Em conjunto, esses dados sugerem que a concentração IL-6, cervical ou no LA, é um dos melhores preditores de parto prematuro.

A IL-8 é uma citocina que induz quimiotaxia neutrofílica, tendo função importante no mecanismo de defesa do hospedeiro. É produzida pela placenta humana durante a gestação⁵⁶ e detectada no líquido amniótico, a partir do segundo trimestre da gestação normal⁵⁷. Níveis elevados de IL-8 são observados no líquido amniótico, durante infecções por microrganismos presentes nos tecidos materno-fetais⁵⁸, havendo correlação entre a concentração dessa citocina e o número de neutrófilos presentes no líquido amniótico⁵⁷. Segundo Jacobsson et al.¹⁸, níveis elevados de IL-8 são detectados no LA de gestantes com rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT), mas essa detecção apresenta baixa sensibilidade e especificidade no grupo de

gestantes com TPP. Para Fortunato et al.⁵⁹, essa diferença no valor preditivo entre TPP e RPM-PT não é surpreendente, pois mecanismos diferentes parecem estar envolvidos na patogênese dessas complicações gestacionais.

O TNF- α tem sido detectado nas células de Hofbauer e decíduais, atuando como regulador da proliferação celular na unidade feto-placentária, já que o papel dessa citocina no aumento de apoptose está bem documentado⁶⁰. O TNF- α tem propriedades similares a IL-1 β , sendo secretado por macrófagos ativados. A identificação de TNF- α na decídua humana e de seus receptores nas células placentárias sugere que o TNF- α desempenha papel fundamental na rede de citocinas produzidas na gestação⁶¹. No líquido amniótico de gestantes com infecção intra-amniótica, os níveis dessa citocina encontram-se mais elevados do que em gestantes sem infecção⁶². Além disso, a presença de TNF- α na secreção cervical de mulheres com contrações uterinas é fator preditivo de parto prematuro⁶³.

Trabalhos recentes têm mostrado que a administração de antibióticos não tem prevenido com sucesso muitos casos de TPP^{64,65}. O parto prematuro, assim como a injúria fetal no contexto da infecção, podem requerer não somente a administração de antimicrobianos, como também a administração de mediadores modificadores da resposta inflamatória como IL-10^{66,67}, fator inibidor da migração de macrófagos⁶⁸, anti-oxidantes⁶⁹ e bloqueadores de TNF- α ⁷⁰.

É conhecido que alta porcentagem de gestantes em trabalho de parto prematuro apresentam corioamnionite ou, pelo menos, evidências de infecção subclínica. Segundo Menon et al.⁷¹, as membranas corioamnióticas são locais de produção de citocinas inflamatórias. Ainda segundo estes autores, a detecção de RNA mensageiro de IL-1 e IL-6 está aumentada em membranas infectadas ou estimuladas com endotoxinas. Nesta mesma linha, Fortunato et al.⁷² descrevem que o LPS induz produção de TNF- α em membranas corioamnióticas. Porém, quando há associação de estímulo com LPS e imunorregulação com IL-10, ocorre diminuição dose-dependente da produção de RNA mensageiro de TNF- α .

Portanto, a presença de citocinas produzidas nos tecidos gestacionais, sugerem que mecanismos de imunidade, importantes na defesa contra infecções, estejam agindo na interface

materno-fetal. Muitas dessas citocinas estão envolvidas na indução da síntese de prostaglandina e/ou expressão do receptor para ocitocina, desencadeando o TPP⁵⁷.

Inúmeros autores têm relatado que pacientes que apresentam infecção da CA são menos responsivas à terapia de tocolise, devido à resposta inflamatória^{16,73}. Logo, devido à ausência de um tratamento efetivo ao TPP, há a necessidade de esclarecer as causas e os mecanismos envolvidos nesta intercorrência, para que se possa definir os grupos de risco, permitindo, desta forma, tomar medidas preventivas efetivas.

Apesar dos avanços obtidos na Neonatologia, a morbidade e mortalidade resultantes das altas taxas de nascimentos prematuros têm permanecido constantes nas últimas décadas⁴. São muitas as complicações perinatais resultantes da prematuridade, os recém-nascidos prematuros têm maiores riscos para morbidades neurológicas, complicações respiratórias e gastro-intestinais⁷⁴. Além disso, há um conseqüente aumento do período de hospitalização e internação em Unidade de Terapia Intensiva, bem como o aumento de utilização de medicamentos de alto custo que, em conjunto, resultam na elevação dos gastos do serviço de saúde nessas situações.

Assim, a comparação da freqüência de infecção na cavidade amniótica entre gestantes em TPP e fora de trabalho de parto, e a correlação com os níveis de citocinas pró-inflamatórias são conhecimentos importantes para compreensão dos mecanismos envolvidos no TPP.

Referências bibliográficas*

1. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008;371:75-84.
2. Tracy SK, Tracy MB, Dean J, Laws P, Sullivan E. Spontaneous preterm birth of liveborn infants in women at low risk in Australia over 10 years: a population-based study. *BJOG* 2007;114:731-5.
3. McPheeters ML, Miller WC, Hartmann KE, Savitz DA, Kaufman JS, Garrett JM, et al. The epidemiology of threatened preterm labor: A prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:1325-30.
4. Martin JA, Kochanek KD, Strobino DM, Guyer B, MacDorman MF. Annual summary of vital statistics-2003. *Pediatrics* 2005;115:619-34.
5. Gestação de Alto Risco / Secretaria de Políticas, Área Técnica da Saúde da Mulher. Brasília: Ministério da Saúde, 2000.
6. McCormick MC. The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity. *N Engl J Med* 1985;312:82-90.
7. Hitti J, Nugent R, Boutain D, Gardella C, Hillier SL, Eschenbach DA. Racial disparity in risk of preterm birth associated with lower genital tract infection. *Pediatr and Perinat Epidemiol* 2007;21:330-7.
8. Lo CC, Hsu JJ, Hsieh CC, Hsieh TT, Hung TH. Risk factors for spontaneous preterm delivery before 34 weeks of gestation among Taiwanese women. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2007;46:389-94.
9. Varma R, Gupta JK, James DK, Kilby MD. Do screening-preventative interventions in asymptomatic pregnancies reduce the risk of preterm delivery – A critical appraisal of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;127:145-59.
10. Ancel PY. Perspectives in the prevention of premature birth. *Eur J Obstet Gynecol and Reprod Biol* 2004;117S:S2-5.
11. McNamara HM. Problems and challenges in the management of preterm labor. *BJOG* 2003;110:79-85.
12. Hirsch E, Wang H. The molecular pathophysiology of bacterially induced preterm labor: insights from the murine model. *J Soc Gynecol Investig* 2005;12:145-55.
13. Gibbs RS, Romero R, Hillier SL, Eschenbach DA, Sweet RL. A review of premature birth and subclinical infection. *Am J Obst Gynecol* 1992;166:1515-28.
14. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000;342:1500-7.
15. Romero R, Marzor M. Infection and preterm labor. *Clin Obstet Gynecol* 1988;31:553-84.

* Elaboradas de acordo com o International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals. *Ann Intern Med* 1997; 126:36-47.

16. Hillier SL, Witkin SS, Krohn MA, Watts H, Kiviat NB, Eschenbach DA. The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnion infection. *Obst Gynecol* 1993;81:941-8.
17. Gonçalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002;8:3-13.
18. Jacobsson B, Mattsby-Baltzer I, Andersch B, Bokstrom H, Holst RM, Wennerholm IB, et al. Microbial invasion and cytokine response in amniotic fluid in a Swedish population of women in preterm labor. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82:120-8.
19. Horowitz S, Mazor M, Romero R, Horowitz J, Glezerman M. Infection of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* in the midtrimester of pregnancy. *J Reprod Med* 1995;40:375-9.
20. Wenstrom KD, Andrews WW, Bowles NE, Towbin JA, Hauth JC, Goldenberg RL. Intrauterine viral infection at time of second-trimester genetic amniocentesis. *Obstet Gynecol* 1998;92:420-4.
21. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG* 2002;109:527-33.
22. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel MD, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med* 2007;25:21-39.
23. Jalava J, Mäntymaa ML, Ekblad U, Toivanen P, Skurnik M, Lassila O, et al. Bacterial 16S rDNA polymerase chain reaction in the detection of intra-amniotic infection. *Br J Obstet Gynecol* 1996;103:664-9.
24. Gardella C, Riley DE, Hitti J, Agnew K, Krieger JN, Eschenbach D. Identification and sequencing of bacterial rDNA in culture-negative amniotic fluid from woman in preterm labor. *Am J Perinatol* 2004;21:319-23.
25. Miralles R, Hodge R, McParland PC, Field DJ, Bell SC, Taylor DJ, et al. Relationship between antenatal inflammation and antenatal infection identified by detection of microbial genes by polymerase chain reaction. *Pediatr Res* 2005;57:570-7.
26. Romero R, Hanaoka S, Mazor M, Athanassiadis AP, Callahan R, Hsu YC, et al. Meconium-stained amniotic-fluid: a risk factor for microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:859-62.
27. Galaski RP, Varner MW, Petzold CR, Wilbur SL. Bacterial attachment to the chorioamniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1984;148:915-28.

28. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 2006;113:17-42.
29. Gyr TN, Malek A, Mathez Loic F, Altermatt HJ, Bodmer T, Nicolaidis K, et al. Permeation of human chorioamniotic membranes by *Escherichia coli* in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:223-7.
30. Cauci S, Monte R, Driussi S, Lanzafame P, Quadrifoglio F. Impairment of the mucosal immune system: IgA and IgM cleavage detected in vaginal washings of a subgroup of patients with bacterial vaginosis. *J Infect Dis* 1998;178:1698-706.
31. McGregor JA, French JI, Jones W, Milligan K, McKinney PJ, Patterson E, et al. Bacterial vaginosis is associated with prematurity and vaginal fluid mucinase and sialidase: results of a controlled trial of topical clindamicyn cream. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:1048-59.
32. Cauci S, McGregor J, Thorsen P, Grove J, Guaschino S. Combination of vaginal sialidase and prolidase activities for prediction of low birth weight and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:489-96.
33. Newton ER, Piper JM, Shain RN, Perdue ST, Peairs W. Predictors of the vaginal microflora. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:845-55.
34. Silva MG, Peraçoli JC, Sadatsune T, Abreu ES, Peraçoli MTS. Cervical *Lactobacillus* and leukocyte infiltration in preterm premature rupture of membranes. *Int J Gynecol Obstet* 2003;81:175-82.
35. Yoon BH, Chang JW, Romero R. Isolation of *Ureaplasma urealyticum* from the amniotic cavity and adverse outcome in preterm labor. *Obstet Gynecol* 1998;92:77-82.
36. Shimada M, Kotani T, Sameshima H, Nagamine Y, Kodama Y, Ikenoue T, et al. Two patients with premature labor associated with *Mycoplasma hominis* infection. *J Med Microbiol* 1998;47:179-82.
37. Gerber S, Vial Y, Hohlfeld P, Wikin SS. Detection of *Ureaplasma urealyticum* in second-trimester amniotic fluid by polymerase chain reaction correlates with subsequent preterm labor and delivery. *J Infect Dis* 2003;187:518-21.
38. Yoon BH, Romero R, Kim M, Kim EC, Kim T, Park JS, et al. Clinical implications of detection of *Ureaplasma urealyticum* in the amniotic cavity with the polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1130-7.
39. Yoon BH, Romero R, Lim JH, Shim SS, Hong JS, Shim JY, et al. The clinical significance of detecting *Ureaplasma urealyticum* by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:919-24.

40. Cassel GH, Cole BC. Mycoplasmas as agents of human disease. *N Engl J Med* 1981;304:80-3.
41. Taylor-Robinson D. Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: an update. *Clin Infect Dis* 1996;23:671-84.
42. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-76.
43. Dudley DJ. Immunoendocrinology of preterm labor: The link between corticotrophin-releasing hormone and inflammation. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:251-6.
44. Laham N, Brennecke SP, Rice GE. Interleukin-8 release from human gestational tissue explants: effect of gestation, labor, chorioamnionitis. *Biol Reprod* 1999;61:823-7.
45. Romero R, Brody DT, Oyarzun E, Mazor M, Wu YK, Hobbins JC, et al. Infection and labor. III. Interleukin-1: A signal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:1117-23.
46. Romero R, Wu YK, Brody DT, Oyarzum E, Duff GW, Durum SK. Human decidua: A source of interleukin-1. *Obstet Gynecol* 1989;73:31-4.
47. Axemo P, Brauner A, Petterson M, Erikson L, Rwamushaija E, Bergström A. Amniotic fluid interleukins in Swedish and Mozambican pregnant women. *Gynecol Obstet Invest* 1996;41:113-7.
48. Romero R, Durum SK, Dinarello CA, Oyarzum E, Hobin JC, Mitchell MD. Interleukin-1 stimulates prostaglandin biosynthesis by human amnion. *Prostaglandins* 1989;37:13-22.
49. Sadowsky DW, Novy MS, Witikin SS, Gravett MG. Dexamethasone or interleukin-10 blocks interleukin-1 beta-induced uterine contractions in pregnancy rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:252-63.
50. Romero R, Tartakovsky B. The natural interleukin-1 receptor antagonist prevents interleukin-1 induced preterm delivery in mice. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:1041-5.
51. Kauma SW, Johnson DE. The expression and localization of IL-1 β mRNA in chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 1994;163:1430-7.
52. Lockwood CJ, Ghidini A, Wein R, Lapinski R, Casae D, Berkowitz RL. Increased interleukin-6 concentrations in cervical secretions are associated with preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:1097-102.
53. Saito S, Kasahara T, Kato Y, Ishihara Y, Ichijo M. Elevation of amniotic fluid interleukin 6 (IL-6), IL-8, and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in term

and preterm parturition. *Cytokine* 1993;5:81-8.

54. El-Bastawissi AY, Williams MA, Riley DE, Hitti J, Krieger JN. Amniotic fluid interleukin-6 and preterm delivery: a review. *Obstet Gynecol* 2000;95:1056-64.
55. Jacobsson B, Mattsby-Baltzer I, Andersch B, Bokstrom H, Holst RM, Nikolaitchouk N, et al. Microbial invasion and cytokine response in amniotic fluid in a Swedish population of women with premature prelabor rupture of membranes. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82:423-31.
56. Shimoya K, Moriyama A, Matsuzaki N, Ogata I, Koyama M, Azuma C, et al. Human placental cells show enhanced production of interleukin (IL)-8 in response to lipopolysaccharide (LPS), IL-1 and tumor necrosis factor (TNF-alpha), but not to IL-6. *Mol Hum Reprod* 1999;5:885-91.
57. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T. Cytokine production in chorioamnionitis. *J Reprod Immunol* 2000;47:185-96.
58. Hsu CD, Meaddough E, Aversa K, Copel JA. The role of amniotic L-secretin, GRO- α , and interleukin-8 in the pathogenesis of intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:428-32.
59. Fortunato SJ, Menon R. Distinct molecular events suggest different pathways for preterm labor and premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:1399-405.
60. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Role of tumor necrosis factor-alpha in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:1159-62.
61. Eades DK, Corneium P, Pekala PH. Characterization of tumor necrosis factor receptor in human placenta. *Placenta* 1988;9:247-51.
62. Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, Wu YK, Oyarzun E, Hobbins JC, et al. Infection and labor. IV. Cachetin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:336-41.
63. Inglis SR, Jeremias J, Kuno K, Lescale K, Peeper Q, Ehervnak FA, et al. Detection of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 6 and fetal fibronectin in the lower genital tract during pregnancy: relation to outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:5-10.
64. Romero R, Espinoza J, Chaiworapongsa T, Kalache K. Infection and prematurity and the role of preventive strategies. *Semin Neonatol* 2002;7:259-74.
65. Romero R, Chaiworapongsa T, Kuivaniemi H, Tromp G. Bacterial vaginosis, the inflammatory response and the risk for preterm birth: A role for genetic

- epidemiology in the prevention of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:1509-19.
66. Terrone DA, Rinehart BK, Granger JP, Barrilleaux OS, Martin JN Jr, Bennett WA. Interleukin-10 administration and bacterial endotoxin-induced preterm birth in a rat model. *Obstet Gynecol* 2001;98:476-80.
 67. Rodts-Palenik S, Yi P, Barrilleaux P, Thigpen B, Cai Z, Rhodes P, et al. Maternal interleukin-10 /antibiotic therapy suppresses the fetal brain inflammation response. *Am J Obstet Gynecol* 2002;S55.
 68. Chaiworapongsa T, Espinoza J, Kim YM. A novel mediator of septic shock, macrophage migration inhibitory factor, is increased in intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:S73.
 69. Beloosesky R, Gayle D, Amidi F, Babu J, Desai M, Ross M. N-acetyl-cysteine (NAC) protects the fetal brain from inflammatory cytokine responses to lipopolysaccharide (LPS). *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:S10.
 70. Silver RM, Hamblin S, LaCoursier Y, Peltier M, Esplin MS, Molenda MR. Prophylactic administration of TNF alpha antibodies reduces the morbidity of LPS-induced preterm birth in a murine model. *J Soc Gynecol Invest* 2005;301A.
 71. Menon R, Swan KF, Lyden TW, Rote NS, Fortunato S. Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1 β and interleukin-6) in amniochorionic membranes. *Am J Gynecol* 1995;172:493-500.
 72. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. The effect of transforming growth factor and interleukin-10 on interleukin-8 release by human amniochorion may regulate histologic chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:794-9.
 73. Wesdrom KD, Andrews WW, Haugh JC, Goldenberg RL, DuBard MB, Cliver SP. Elevated second-trimester amniotic fluid interleukin-6 levels predict preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:546-50.
 74. Saigal S, Doyle LW. An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. *Lancet (in press)*.

Interleucina 1 β e interleucina 6 no líquido amniótico: relação com invasão microbiana da cavidade amniótica em gestantes em trabalho de parto prematuro

Resumo

Introdução: O Trabalho de Parto Prematuro (TPP) é uma grave intercorrência obstétrica que acomete de 5-10% das gestações. Embora sua etiologia seja multifatorial, a infecção da cavidade amniótica (CA) é um importante fator associado ao seu desencadeamento. **Objetivo:** Comparar a frequência de infecção na cavidade amniótica de gestantes em TPP em relação a gestantes fora de trabalho de parto e correlacionar com os níveis de citocinas pró-inflamatórias no líquido amniótico (LA). **Material e Métodos:** Foram incluídas neste estudo 20 gestantes em TPP e 20 gestantes fora de trabalho de parto, com idades gestacionais pareadas. No grupo TPP, amostras de LA foram obtidas no momento da resolução da gestação ou durante amniocentese transabdominal. O grupo de gestantes fora de trabalho de parto foi constituído de pacientes com indicação de amniocentese transabdominal. Para avaliação da infecção na CA foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e do gene bacteriano RNAr 16S. Os produtos de RNAr 16S foram seqüenciados para a identificação da espécie bacteriana. Os níveis das citocinas inflamatórias, interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF- α) no LA foram quantificados por ensaio imunoenzimático (ELISA). **Resultados:** A incidência de TPP no período do estudo foi de 5,8%. No grupo TPP, a pesquisa de invasão microbiana da CA foi positiva para *M. hominis* (35,0%), *U. urealyticum* (10,0%) e gene RNAr 16S (30,0%), sendo todas as frequências superiores às encontradas no grupo fora de trabalho de parto ($p < 0,05$). Quanto às citocinas, níveis aumentados de IL-1 β ($p = 0,03$), IL-6 ($p < 0,001$) e IL-8 ($p < 0,001$) foram detectados no LA das pacientes em TPP em relação às gestantes fora de trabalho de parto. Além disso, amostras de LA, com presença de infecção, apresentaram níveis significativamente aumentados de IL-1 β e IL-6 ($p = 0,03$). **Conclusão:** Pacientes em TPP apresentaram alta frequência de infecção no LA quando comparadas às gestantes fora de trabalho de parto e existe correlação entre essa infecção e níveis aumentados de IL-1 β e IL-6.

Abstract

Introduction: Preterm labor (PL) represents a serious obstetric complication whose rate is 5-10%. Although the PL etiology is multifactorial, intraamniotic infection is strongly associated to its occurrence. **Objective:** To compare the frequency of intraamniotic infection in women presenting PL with women not in labor and to correlate with inflammatory cytokines levels in amniotic fluid (AF). **Material and Methods:** Twenty women with PL and 20 women with same gestational age, but not in labor, were included in this study. AF samples of women in PL were collected at delivery or by amniocentesis. The control group was composed by women with indication for amniocentesis. The evaluation of intraamniotic infection was performed detecting *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and the bacterial rRNA 16S gene using polymerase chain reaction (PCR). The PCR rRNA 16S products were sequenced for bacterial species identification. The IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α levels in AF were measured by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). **Results:** During the study period, PL rate was 5,8%. Intraamniotic infection in women with PL was positive for *M. hominis* (35,0%), *U. urealyticum* (10,0%) and bacterial rRNA 16S (30,0%). AF infection rates for all tested microorganism were superior in PL when compared to women not in labor ($p < 0,05$). Regarding to the cytokine measurement, AF of PL women showed increased IL-1 β ($p = 0,03$), IL-6 ($p < 0,001$) and IL-8 ($p < 0,001$) levels in comparison to AF samples from women not in labor. Additionally, AF with infection presented increased levels of IL-1 β e IL-6 ($p = 0,03$). **Conclusion:** Women with PL present high frequency of intraamniotic infection when compared with women not in labor and such infection correlates with increased IL-1 β e IL-6 AF levels.

1. Introdução

O Trabalho de Parto Prematuro (TPP) é uma importante intercorrência obstétrica que acomete de 5 a 10% das gestações¹⁻³ e, apesar dos novos tratamentos e estratégias de prevenção, sua incidência não tem diminuído nos últimos anos⁴. A principal complicação relacionada ao TPP é a prematuridade, que é responsável por 70% dos índices de morbimortalidade perinatal⁵.

Muitos fatores de risco associados ao TPP são conhecidos, como trabalho de parto prematuro anterior, anomalias uterinas, múltiplas gestações, polidramnia, sangramento vaginal durante a gestação, rotura prematura de membranas, vaginose bacteriana, entre outros⁶⁻¹⁰. Entretanto, a infecção intrauterina é freqüente e importante mecanismo desencadeante do trabalho de parto prematuro.

Recentes estudos têm mostrado que a prevalência de invasão microbiana da cavidade amniótica entre gestantes em TPP varia de 16 a 40%^{11,12}. Diferentes espécies de bactérias incluindo *Staphylococcus aureus*, *Bacterioides* sp., *Streptococcus mitis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* foram identificadas no líquido amniótico^{11,13}. Dentre esses microrganismos, as espécies *M. hominis* e *U. urealyticum* são freqüentemente detectadas no líquido amniótico e associadas aos casos de TPP^{14,15}.

Evidências sugerem que a infecção da cavidade amniótica é um processo crônico, pois gestantes no segundo trimestre de gestação, com pesquisa positiva para *U. urealyticum* no líquido amniótico, freqüentemente desenvolvem TPP ou rotura prematura de membranas pré-termo, semanas após a detecção¹⁶. Nesse sentido, já é conhecido que quanto menor a idade gestacional em que ocorre o TPP, a freqüência de infecção intrauterina é maior¹⁷.

Os mecanismos pelos quais a infecção intrauterina leva ao TPP estão relacionados à ativação do sistema imune inato¹⁸. Microrganismos são reconhecidos pelos receptores *Toll-like* presentes na superfície celular de leucócitos e trofoblastos que suscitam liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8 e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α).

Endotoxinas bacterianas e citocinas pró-inflamatórias estimulam a produção de prostaglandinas que induzem a contratilidade uterina^{12,18}.

Estudos anteriores têm mostrado níveis elevados de IL-6 e IL-8 no líquido amniótico na presença de invasão microbiana da cavidade amniótica e das membranas corioamnióticas de gestantes em TPP^{13,19}.

Considerando que o conhecimento da relação entre infecção da cavidade amniótica e produção de citocinas inflamatórias é importante para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento do TPP, o objetivo desse estudo foi comparar a frequência de infecção na cavidade amniótica de gestantes em TPP em relação a gestantes fora de trabalho de parto e correlacionar com os níveis de citocinas pró-inflamatórias no líquido amniótico.

2. Material e Métodos

2.1. Desenho do estudo

Foi realizado estudo clínico e prospectivo. Para o cálculo do tamanho amostral, fixando-se $\alpha=0,05$ e $\beta=0,10$ e a menor variação da concentração de citocinas no líquido amniótico que apresenta diferença estatisticamente significativa entre os grupos de gestantes em trabalho de parto prematuro (TPP) e fora de trabalho de parto (Grupo controle), além da variabilidade das dosagens de citocinas em cada um dos grupos, que não segue distribuição normal, o tamanho calculado da amostra foi de, no mínimo, 20 gestantes por grupo.

2.2. Pacientes

No período de junho de 2006 a dezembro de 2007, foram incluídas no estudo 20 pacientes em TPP, com idade gestacional entre 26 e 36 semanas, atendidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. A idade gestacional foi estabelecida pela data da última menstruação e por exame ultra-sonográfico precoce (até 20 semanas).

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 cm⁶.

As pacientes com diagnóstico de TPP foram internadas na Enfermaria de Obstetrícia, sendo controladas clinicamente por meio de avaliação da frequência cardíaca e temperatura a cada 6 horas. Foram excluídas deste estudo pacientes com gestação múltipla, rotura prematura de membranas, placenta prévia, incompetência istmo-cervical, fertilização *in vitro*, presença de corioamnionite histológica ou presença de sangue no líquido amniótico.

Cinco pacientes em TPP, que tiveram indicação de avaliação de maturidade pulmonar fetal, foram puncionadas através da amniocentese transabdominal guiada por ultra-sonografia, seguindo o protocolo estabelecido pelo Serviço de Obstetrícia. Nas 15 pacientes em TPP, que não havia indicação para amniocentese, o líquido amniótico (LA) foi coletado no momento da

resolução da gestação por cesárea ou punção transvaginal. As pacientes em que as amostras de LA foram coletadas durante o parto somente foram incluídas no estudo se a resolução da gestação ocorreu em intervalo de tempo de, no máximo, sete dias do início do trabalho de parto.

Como grupo controle, foram incluídas no estudo 20 gestantes com idade gestacional inferior a 37 semanas, pareadas em relação à idade gestacional das pacientes com TPP, que tiveram indicação de amniocentese transabdominal para avaliação da maturidade pulmonar fetal, por apresentarem diabetes e/ou hipertensão arterial.

Todas as gestantes envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram os termos de consentimento livre e esclarecido (Anexos 1 e 2), tendo sido o projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, sob o protocolo 448/2005 (Anexos 3 e 4).

2.3. Colheita de líquido amniótico

As amostras de líquido amniótico obtidas no momento da resolução da gestação ou por amniocentese guiada por ultra-sonografia foram imediatamente transportadas ao Laboratório de Patologia Placentária no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. As amostras coletadas foram fracionadas em alíquotas de 1 mL e centrifugadas a 15.000 g à temperatura ambiente. Os sobrenadantes e os *pellets* obtidos foram armazenados separadamente a -80°C até o processamento.

2.4. Pesquisa de invasão microbiana na cavidade amniótica

A pesquisa de invasão microbiana da cavidade amniótica foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e para o gene bacteriano RNAr 16S.

2.4.1. Detecção de *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* no líquido amniótico

2.4.1.1. Extração do ácido nucléico

O *pellet* do LA obtido por centrifugação foi ressuspenso em 1 mL de Tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline Solution*) e centrifugado por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado, e adicionado 20µL de água Milli-Q. Em seguida, a solução foi levada à ebulição por 10 minutos, sendo imediatamente resfriada em gelo²⁰.

2.4.1.2. Controles positivos das PCRs

Como controles positivos, foram utilizadas as linhagens padrão adquiridas de *Ureaplasma urealyticum* (ATCC 27813) e *Mycoplasma hominis* (ATCC 15488). Essas cepas foram cultivadas utilizando, respectivamente, os meios de cultura B-10 e Hayflick modificado²¹. Após o período de incubação, de aproximadamente seis dias, alíquotas de 1 mL das culturas foram centrifugadas a 15.000 g por 60 minutos a 4°C. Após o procedimento de descarte dos sobrenadantes, os *pellets* foram ressuspendidos em PBS e submetidos a incubação por 10 minutos a 95°C, com posterior resfriamento para liberação do ácido nucléico.

2.4.1.3. Amplificação da seqüência de 429bp do gene da urease de *Ureaplasma urealyticum*

As reações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL em volumes totais de 25µL, contendo 1µL de cada *primer* (25µM) (Tabela 1), 12,5µL de *GoTaq[®] Green Master Mix* (*Promega*) e 5 µL de amostra. Controles positivos (*U. urealyticum* ATCC 27813) e negativos (água Milli-Q) foram utilizados em todas reações. A incubação foi realizada em termociclador (*Eppendorf Mastercycler Personal*), com um ciclo inicial de desnaturação a 98°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 98° C por 30 segundos, anelamento a 61°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, além de um ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos.

2.4.1.4. Amplificação da seqüência de 334bp do gene RNA ribossômico 16S de *Mycoplasma hominis*

As reações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL em volumes totais de 25µL, contendo 1µL de cada *primer* (25µM) (Tabela 1), 12,5µL de *GoTaq[®] Green Master Mix* (Promega) e 5 µL da amostra. Controles positivos (*M. hominis* ATCC 15488) e negativos (água Milli-Q) foram utilizados em todas reações. A incubação foi realizada em termociclador (*Eppendorf Mastercycler Personal*), com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 61°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos, além de um ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos.

2.4.1.5. Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações do gene da urease de *U. urealyticum* e RNAr 16S de *M. hominis* foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5% preparado em tampão 1X TBE (0,09M Tris-Borato; 0,002 EDTA) e corado com Brometo de Etídeo (0,1µg/mL), em 100 V por 30 minutos. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100bp e posteriormente fotografado sob transiluminação UV.

2.4.2. Pesquisa de infecção do LA por outras espécies bacterianas através da detecção do gene RNAr 16S

2.4.2.1. Extração do ácido nucléico com solução de CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*)

Os *pellets* de LA obtidos por centrifugação foram submetidos a etapa prévia de digestão com 5µL de proteinase K (400µg/mL) por 3 horas a 56°C. Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 96°C para inativação da enzima. Foram adicionados aos produtos digeridos 100 µL de solução de NaCl 5M e 100µL da solução CTAB/NaCl pré-aquecida a 56°C. As amostras foram incubadas a 56°C por 10 minutos e, em seguida, foram adicionados 750µL de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1. O material foi agitado por 10 segundos e centrifugado por 5 minutos a 15.700 g a 4° C. Posteriormente, os sobrenadantes foram transferidos para novo microtubo e adicionados 450µL de etanol absoluto a -20°C, seguido de uma incubação por 10 minutos a -20°C. Após essa incubação, as amostras foram novamente centrifugadas, o álcool

eliminado e adicionados 450 μ L de etanol a 70%. Seguido de nova centrifugação, o álcool foi eliminado e os microtubos transferidos para o concentrador (*Concentrator 5301, Eppendorf*) por 30 minutos. Nesse momento, as amostras foram ressuspensas em 50 μ L de tampão TE (Tris/EDTA).

O protocolo de extração utilizado foi padronizado no Laboratório de Patologia Placentária e a eficiência das extrações realizadas foi confirmada através da detecção, por PCR, do gene da β -globina de todas amostras avaliadas.

2.4.2.2. Amplificação da seqüência de aproximadamente 1500bp do gene bacteriano RNAr 16S

As reações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL em volumes totais de 25 μ L, contendo 1 μ L de cada *primer* (25 μ M) (Tabela 1), 12,5 μ L de *GoTaq[®] Green Master Mix (Promega)* e 5 μ L da amostra. Controles positivos (*Staphylococcus aureus* ATCC 19095) e negativos (água Milli-Q) foram utilizados em todas reações. A incubação foi realizada em termociclador (*Eppendorf Mastercycler Personal*), com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, além de um ciclo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

2.4.2.3. Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5% preparado em tampão 1X TBE (0,09M Tris-Borato; 0,002 EDTA) e corado com Brometo de Etídeo (0,1 μ g/mL), em 100 V por 40 minutos. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 250bp e posteriormente fotografado sob transiluminação UV.

Tabela 1. Sequências iniciadoras para a detecção do gene da urease de *Ureaplasma urealyticum*²², do gene RNAr 16S de *Mycoplasma hominis*²³ e do gene bacteriano RNAr 16S¹³.

GENES	MICROORGANISMOS	SEQÜÊNCIAS INICIADORAS	PRODUTOS
Urease	<i>U. urealyticum</i>	U5 5'-CAA TCT GCT CGT GAA GTA TTA C-3'	429bp
		U4 5'-ACG ACG TCC ATA AGC AAC T-3'	429bp
RNAr 16S	<i>M. hominis</i>	M1 5'-CAA TGG CTA ATG CCG GAT ACG C-3'	334bp
		M2 5'-GGT ACC GTC AGT CTG CAA T-3'	334bp
RNAr 16S	Várias spp.	FD1 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	~1.500bp
		RP1 5'-ACG GHT ACC TTG TTA CGA CTT-3'	~1.500bp

2.4.3. Seqüenciamento do gene bacteriano RNAr 16S

2.4.3.1. Reação de seqüenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o *ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)* que contém iniciadores que flanqueiam nas direções *foward* (5'- 3') e *reverse* (3'- 5').

As reações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL com volumes totais de 10µL, contendo 2,0µL de *ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)*, 0,5µL do *primer foward* (10µM) e 2,0µL do produto obtido na PCR. As mesmas reações foram repetidas utilizando o *primer reverse* (10µM). A incubação foi realizada em termociclador (*PTC 200, MJ Research*), com um ciclo inicial de desnaturação a 96 C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 96 C por 30 segundos, anelamento a 58 C por 60 segundos e extensão a 60 C por 4 minutos.

2.4.3.2. Reação de precipitação

Os produtos obtidos na reação de seqüenciamento foram submetidos à precipitação. Inicialmente foram adicionados 80 µg de isopropanol 80% nos microtubos contendo os produtos da reação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 16.100 g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Após a adição de 150µg de etanol 70%, foi realizada nova

centrifugação e descarte do sobrenadante. A eliminação do álcool excedente foi realizada no concentrador (*Concentrator 5301, Eppendorf*).

2.4.3.3. Seqüenciamento

As amostras foram diluídas em 2,2 μ L de Blue Dextran acrescido de 5° Dye (*Applied Biosystems*) em concentração 1:8 para posterior aplicação em gel desnaturante de uréia-poliacrilamida 5% (*Long Ranger Singel Packs/BMA*).

O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático de DNA, *DNA Sequencer ABI Prism 377 (Applied Biosystems)*, com voltagem fixada em 300V e o intervalo de tempo para a coleta de sinais fluorescentes em 2400 *scans* por hora. A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 1X (0,09M Tris-Borato; 0,002 EDTA) por 3 horas e 30 minutos a 200W com temperatura aproximada de 51°C.

Durante a eletroforese, a fluorescência detectada na região do *laser scanner* foi coletada e estocada pelo *software Data Collection 2.6 (Applied Biosystems)*. Posteriormente, os dados foram analisados pelo *software Sequencing Analysys 3.4 (Applied Biosystems)*, através da transformação da intensidade de fluorescência em picos correspondentes aos nucleotídeos (cromatograma).

As seqüências obtidas foram analisadas utilizando o BLAST (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para avaliação da porcentagem de identidade e determinação da espécie bacteriana referente ao gene RNAr 16S analisado. Para a identificação de espécies foi adotada uma identidade mínima de 90% entre a seqüência submetida à análise e as existentes no banco de dados.

2.5. Determinação de citocinas no LA por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Inicialmente, placas de poliestireno com 96 orifícios e fundo plano de alta afinidade (*MaxSorp, Nunc, Life Tech. Inc. Maryland, USA*) foram sensibilizadas por 18 horas a 4° C, em câmara úmida, com anticorpo de captura: IL-1 β (Lote GY0907011); IL-6 (Lote HD 3207023); IL-8

(Lote ASJ 2107031); TNF- α (Lote AVR 1107021) *R&D Systems, DuoSet, (Minneapolis, MN)* diluído em tampão PBS, pH 7,2. Após incubação, foram realizadas 3 lavagens da placa com solução de PBS pH 7,2 contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T). Esse procedimento foi repetido em todas as etapas de lavagem até a fase anterior à adição do substrato. O bloqueio dos sítios livres da placa foi realizado com solução de PBS-T contendo leite desnatado (Molico-Nestlé) na concentração de 5% (PBST-M) durante três horas à temperatura ambiente. Após a lavagem da placa, foram adicionados na primeira coluna 100 μ L das citocinas recombinantes humanas: IL-1 β (Lote 1009887); IL-6 (Lote HD 1069976); IL-8 (Lote 1070207); TNF- α (Lote 1070237) em concentrações indicadas pelo fabricante para obtenção da curva padrão. Nos demais orifícios foram distribuídos 100 μ L do líquido amniótico com posterior incubação por quatro horas à temperatura ambiente. Após esse período e lavagem, foram adicionados 100 μ L de anticorpo de detecção: IL-1 β (Lote UB1407011); IL-6 (Lote SV 1407022); IL-8 (Lote UM 0907031); TNF- α (Lote ST 2107021) e as placas foram mantidas por três horas à temperatura ambiente. Em seguida à lavagem, foram adicionados 100 μ L de streptoavidina (Lote AEM 4907032) na diluição 1:200 em cada orifício da placa e a reação incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o procedimento de lavagem, foram adicionados 100 μ L do substrato constituído de 12,5mL de tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0, 10 mg de ortofenilenodiamina (*Sigma, Chemical Co, USA*) e a reação incubada por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara escura. A reação foi interrompida por adição de 50 μ L de solução de ácido sulfúrico 2N e as densidades ópticas avaliadas em leitor automático de ELISA (*Titertek Multiskan*), em comprimento de onda de 492nm. As concentrações das citocinas no líquido amniótico foram calculadas sobre a curva padrão obtida com diferentes concentrações das citocinas recombinantes humanas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α .

Os coeficientes de variação intra-ensaio foram de 10% para IL-1 β , 0,15% para IL-6, 4,5% IL-8 e 23% para TNF- α . O limite de detecção dos ensaios para IL-1 β , IL-6 e IL-8 e TNF- α foram, respectivamente, 13,0 pg/mL, 0,3 pg/mL, 4,0 pg/mL e 7,9 pg/mL.

2.6. Análise estatística

Os dados relativos às características das gestantes em relação às variáveis sócio-demográficas e gestacionais foram submetidos ao teste z de comparação entre proporções. A idade materna, a idade gestacional no momento da obtenção do líquido amniótico e as concentrações das citocinas inflamatórias foram submetidas ao teste não paramétrico de Mann Whitney para comparação entre os grupos controle e TPP. O nível de significância adotado para os testes empregados foi de 5%²³. O software utilizado para as análises foi o SigmaStat 3.1.

3. Resultados

3.1. Incidência de TPP e características das gestantes

No período do estudo, foram realizados 1785 partos no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Nesse período, a incidência de TPP com bolsa íntegra foi de 5,8%. Os dados referentes às variáveis sócio-demográficas, à gestação atual e aos antecedentes obstétricos foram avaliados em todas as gestantes incluídas no estudo. Os dados relativos aos antecedentes obstétricos revelaram que as pacientes do grupo TPP apresentaram maior frequência de episódios de TPP em gestações prévias. As gestantes em TPP eram mais jovens no momento da inclusão no estudo, quando comparadas às do grupo controle. Quanto às demais variáveis avaliadas não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos estudados (Tabela 2).

Em relação à idade gestacional no momento da inclusão no estudo, a mediana do grupo controle foi de 34s2d (30s2d-36s2d) e no grupo TPP foi de 33s1d (26s2d-36s), não apresentando diferença significativa entre os grupos.

Tabela 2. Variáveis sócio-demográficas e obstétricas de gestantes dos grupos controle e TPP.

Variáveis	Controle (N=20)	TPP (N=20)	p
Idade (anos)*	30 (20-43)	25 (14-39)	0,09
Estado civil			
Solteira	3 (15,0%)	4 (20,0%)	1,00
União Estável	17 (75,0%)	16 (80,0%)	1,00
Etnia			
Branca	17 (85,0%)	17 (85,0%)	0,66
Não branca	3 (15,0%)	3 (15,0%)	0,66
Tabagismo	2/18 (11,1%)	3/14 (21,4%)	0,78
Paridade			
Primigesta	5 (25,0%)	7 (35,0%)	0,73
Multigesta	15 (75,0%)	13 (65,0%)	0,73
Intercorrências gestacionais anteriores	-	-	-
RPM			
Abortos	3/15 (20,0%)	3/13 (23,1%)	0,73
TPP	2/15 (13,3%)	8/13 (61,5%)	0,02

*valores expressos em mediana e (valores mínimos e máximos)

3.2. Detecção de invasão microbiana na cavidade amniótica

3.2.1. Detecção de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* no líquido amniótico

A pesquisa de *M. hominis* foi positiva em sete amostras de líquido amniótico de gestantes pertencentes ao grupo TPP (35,0%) e em apenas uma amostra do grupo controle (5,0%) ($p=0,04$). Em relação à detecção de *U. urealyticum*, foram observadas duas amostras positivas (10,0%), sendo que ambas foram provenientes de gestantes do grupo TPP e apresentaram co-infecção por *M. hominis* (Figura 1), não havendo diferença de positividade entre os grupos estudados ($p=0,33$).

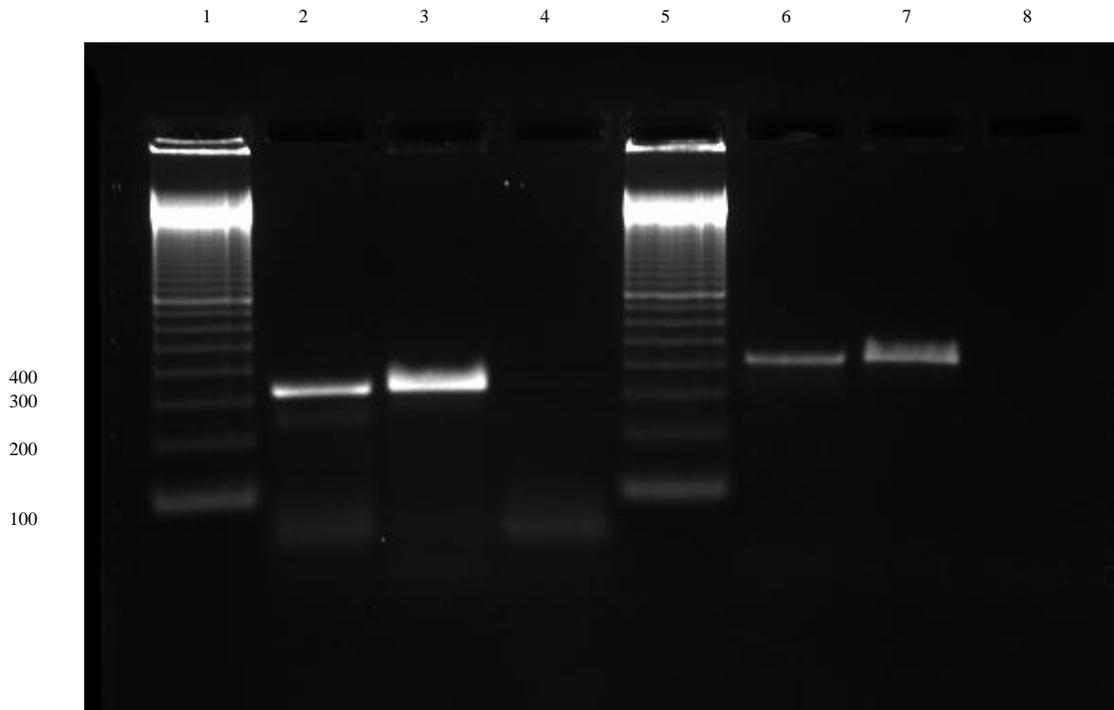


Figura 1. Eletroforese de gel de agarose dos produtos obtidos por PCR. Colunas 1 e 5 marcador de peso molecular (100bp). Colunas 2 e 3 gene RNAr 16S de *Mycoplasma hominis* (334bp) do controle positivo (ATCC 15488) e de amostra do grupo TPP, respectivamente. Colunas 6 e 7 gene da urease de *Ureaplasma urealyticum* (429bp) do controle positivo (ATCC 27813) e de amostra do grupo TPP, respectivamente. Colunas 4 e 8; controles negativos das reações.

3.2.2. Detecção de infecção do líquido amniótico por outras espécies bacterianas

A presença do gene bacteriano RNAr 16S foi observada em 30,0% das amostras de LA das gestantes do grupo TPP. Dentre as seis amostras positivas para o RNAr 16S, cinco (83,3%) foram positivas para, pelo menos, uma espécie de micoplasma (Tabela 3). Os resultados obtidos nessa análise não revelaram positividade dentre as amostras de LA grupo controle ($p=0,03$).

3.2.3. Identificação das espécies bacterianas no líquido amniótico pelo seqüenciamento do gene RNAr 16S

A avaliação das seqüências do gene RNAr 16S detectados nas amostras de LA somente possibilitou a determinação do gênero *Bacterioides* em única amostra que não apresentou

infecção por mais de uma espécie bacteriana. Nas demais amostras avaliadas não foi possível a determinação das espécies relacionadas ao gene de interesse.

Sendo assim, considerando os resultados da detecção de todos os genes bacterianos pesquisados, foram observadas oito amostras de LA de pacientes em TPP positivas para um ou mais dos genes bacterianos pesquisados (Tabela 3). Portanto, a frequência de infecção da CA em pacientes em TPP foi de 40,0%, enquanto que apenas uma amostra (5,0%) do grupo controle apresentou positividade para infecção ($p < 0,05$).

Tabela 3. Microrganismos identificados no líquido amniótico de gestantes em TPP pela técnica da PCR para pesquisa de *M. hominis* e *U. urealyticum* e do gene bacteriano RNAr 16S.

LA de pacientes em TPP	Pesquisa de micoplasma	Pesquisa de RNAr 16S bacteriano	Sequenciamento do RNAr 16S bacteriano
Amostra 1	Mh, Uu	Positiva	Nd
Amostra 2	Mh, Uu	Positiva	Nd
Amostra 3	Mh	Positiva	Nd
Amostra 4	Negativa	Positiva	<i>Bacterioides</i> sp.
Amostra 5	Mh	Negativa	Nd
Amostra 6	Mh	Positiva	Nd
Amostra 7	Mh	Negativa	Nd
Amostra 8	Mh	Positiva	Nd

Mh= *Mycoplasma hominis*, Uu= *Ureaplasma urealyticum*, Nd= Não determinada.

3.3. Análise de citocinas no líquido amniótico

Os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α no líquido amniótico das gestantes do grupo controle e TPP estão representados na Tabela 4. Gestantes do grupo TPP apresentaram níveis significativamente mais elevados de IL-1 β ($p=0,03$), IL-6 ($p<0,001$) e IL-8 ($p<0,001$) em comparação às gestantes do grupo controle.

Em relação às dosagens de TNF- α , 88,9% das amostras de líquido amniótico de gestantes do grupo TPP e 100% das amostras do grupo controle apresentaram concentrações inferiores ao limite de detecção do ensaio. Para IL-1 β , a porcentagem de amostras com concentrações abaixo do limite de detecção foi de 78,8% e 100% para os grupos TPP e controle, respectivamente.

Tabela 4. Medianas das concentrações de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α (pg/mL) e valores mínimos e máximos no líquido amniótico de gestantes do grupo controle e TPP.

Citocinas	Controle	TPP	p
IL-1 β	0	43,0(13,0-100,2)	0,03
IL-6	43,8 (1,1-84,3)	135,0 (27,6-182,3)	<0,001
IL-8	39,1 (16,8- 61,3)	114,0 (33,7- 261,0)	<0,001
TNF- α	Nd	10,5(7,9-13,1)	-

Nd= Valores não detectados.

3.4. Análise de citocinas no líquido amniótico em relação à presença de infecção da cavidade amniótica

Para o grupo TPP, a avaliação dos níveis de IL-8 e TNF- α em relação à positividade para infecção no LA não mostrou diferença significativa. Com relação a IL-1 β e IL-6, os níveis detectados nas amostras de LA positivas para infecção microbiana foram significativamente superiores às com ausência de infecção.

Tabela 5. Medianas das concentrações de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α (pg/mL) e valores mínimos e máximos no líquido amniótico de gestantes do grupo TPP, em relação à presença de infecção da cavidade amniótica determinada pela positividade para, pelo menos, um dos genes microbianos pesquisados.

Citocinas	Infecção da cavidade amniótica		p
	Presente	Ausente	
IL-1β	43,0 (13,0-100,2)	0,0	0.03
IL-6	166,4 (34,6-182,3)	112,6 (27,6-159,7)	0.03
IL-8	132,4 (53,4-189,0)	114,4 (33,7-261,0)	0.75
TNF-α	7,9	13,1	-

5. Discussão

O TPP é uma grave intercorrência obstétrica, em cuja etiologia multifatorial pode-se destacar a infecção da cavidade amniótica e a inflamação intra-amniótica¹². Microrganismos presentes na microbiota vaginal ascendem transcervicalmente atingindo e infectando a CA. 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 cerebrais²⁵ e pulmonares²⁶. Apesar das novas terapias farmacológicas e dos programas de prevenção, a incidência de TPP não tem diminuído nas últimas décadas.

No período do estudo, foram realizados 1785 partos no Serviço de Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, e a prevalência de TPP de 5,8%. Essa incidência é similar à encontrada na literatura, que relata incidência variando entre 5 e 10% do total de gestações¹⁻³.

Quanto às variáveis sócio-demográficas, a análise estatística não revelou diferença significativa entre os grupos TPP e controle para os dados referentes à idade, estado civil, etnia, tabagismo, paridade e ocorrência de aborto ou rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT) em gestações anteriores. No entanto, houve maior frequência de episódios prévios de TPP nas gestantes do grupo TPP, dado já bem estabelecido na literatura^{8,27}. Somado a isso, a ocorrência de episódios de TPP em gestações subseqüentes está relacionada com a infecção intrauterina persistente ou recorrente²⁷.

Embora múltiplos fatores estejam associados ao desenvolvimento de TPP, o papel da infecção da CA tem se tornado cada vez mais importante na sua etiologia, à medida que são realizados trabalhos com excelência metodológica e análise precisa dos resultados. Nesse sentido, a realização de estudos com técnicas de biologia molecular para detecção de microrganismos no LA tem contribuído para consolidar o papel da infecção no desenvolvimento do TPP, especialmente quando se trata de espécies conhecidamente fastidiosas como os micoplasmas^{15,20}. Embora as espécies *M. hominis* e *U. urealyticum* sejam frequentemente

detectadas no LA de gestantes^{14,15}, seu papel no desenvolvimento do TPP ainda tem sido pouco estudado.

Nesse estudo, a positividade de *M. hominis* no LA de gestantes em TPP foi de 35,0%, sendo sete vezes superior à frequência encontrada em gestantes do grupo controle. Considerando o total de pacientes incluídas neste estudo, houve detecção de *M. hominis* em 20,0% das amostras de LA, frequência superior à encontrada em outros estudos, que empregaram a técnica de PCR para detecção desse microrganismo em LA, obtido através de amniocentese, em segundo trimestre de gestação^{14,28} e em amostras de LA de pacientes em TPP^{29,30}.

Em relação à infecção por *U. urealyticum*, 10,0% das pacientes em TPP apresentaram presença deste microrganismo no LA. Esta taxa de infecção é superior a maioria dos relatos encontrados da literatura^{13,15,31}, embora Witt et al.³² tenham encontrado positividade de 43,6% em LA de pacientes em TPP e bolsa íntegra.

A pesquisa de microrganismos no LA através da pesquisa do gene bacteriano RNAr 16S revelou positividade de uma amostra de LA pertencente à gestante do grupo TPP, além daquelas positivas para *M. hominis* e/ou *U. urealyticum*. Através do seqüenciamento do produto do gene RNAr 16S amplificado pela PCR, pode-se identificar esse microrganismos como *Bacterioides* sp. Espécies do gênero *Bacterioides* são associadas com vaginose bacteriana³³ e são freqüentemente isoladas no LA de pacientes em TPP^{10,34}.

O seqüenciamento dos demais produtos do gene RNAr 16S amplificados, referentes às amostras positivas para *M. hominis* e/ou *U. urealyticum*, não permitiu a identificação ou confirmação das espécies presentes nas amostras de LA. Esse resultado sugere que a infecção, nessas amostras, seja polimicrobiana e, por limitação metodológica, as espécies não tenham sido determinadas. Estudos já demonstraram que a infecção por mais de uma espécie bacteriana é freqüentemente encontrada no LA³² e em membranas corioamnióticas³⁵ de pacientes em TPP.

Em relação à concentração de citocinas, os níveis de IL-6 e IL-8 no LA de gestantes em TPP estiveram aumentadas cerca de três vezes em relação ao grupo controle. Níveis aumentados de IL-6 e IL-8 no LA de gestantes com TPP já foram descritos na literatura^{13,36}. Embora níveis de

IL-1 β não tenham sido detectados em LA de pacientes do grupo controle, esses níveis estiveram elevados no LA de gestantes em TPP. Já é bem estabelecido o aumento nos níveis de IL-1 β no LA de pacientes em TPP associados à infecção na CA³⁷. Em relação ao TNF- α , no presente estudo, a concentração dessa citocina somente foi detectada no LA de duas gestantes em TPP, entretanto a literatura relata níveis superiores no LA de pacientes em TPP¹¹.

Atualmente, inúmeros trabalhos^{13,29,38} têm sido realizados empregando a técnica de PCR para pesquisa de genes bacterianos altamente conservados entre as espécies, como o gene RNAr 16S, para detecção da infecção da CA. Este método, além de permitir a detecção de qualquer espécie bacteriana potencialmente presente nas amostras, possibilita a identificação das espécies através de uma etapa posterior de seqüenciamento desse gene. Portanto, a utilização dessa técnica para detecção de infecção na CA permite de forma confiável avaliar os níveis de citocinas em relação à presença dessa infecção.

Quanto às concentrações de citocinas em relação à infecção da CA, níveis significativamente superiores de IL-1 β e IL-6 foram detectados entre as amostras positivas para infecção. Em concordância com esses achados, a literatura relata que a concentração de IL-1 β no LA de mulheres com TPP se encontra elevada quando há invasão da CA por microrganismos³⁷. A importância do papel da IL-1 β na deflagração do TPP associado a infecção foi demonstrada em estudo, no qual, apenas a administração de IL-1 β foi suficiente para a deflagração do trabalho de parto em camundongos prenhes³⁹.

Os resultados referentes à quantificação de IL-6 no LA revelaram concentrações aumentadas nas amostras com infecção da CA, detectada pela presença de um ou mais genes microbianos pela PCR. Esses dados corroboram com estudos^{10,36} em que os níveis de IL-6 no LA de gestantes em TPP estiveram significativamente aumentados na presença de cultura positiva do LA. Recentemente, as novas metodologias para detecção de infecção na CA, como a pesquisa do gene bacteriano RNAr 16S, têm demonstrado não apenas maiores freqüências de infecção da CA, mas a preservação da correlação entre essa infecção e níveis aumentados de IL-6^{13,40}. De fato, a

IL-6 é considerada a citocina mais envolvida nos casos de TPP associados a infecção da CA⁴¹ e pode ser considerada excelente preditora de partos prematuros, na presença de infecção da CA.

No entanto, deve-se considerar que neste estudo houve ausência de correlação entre níveis de IL-8 e TNF- α com presença de microrganismos no LA. Segundo Jacobsson et al.⁴², níveis elevados de IL-8 são detectados no LA de gestantes com RPM-PT, mas essa detecção apresenta baixa sensibilidade e especificidade no grupo de gestantes com TPP. Para Fortunato et al.⁴³, essa diferença no valor preditivo entre TPP e RPM-PT não é surpreendente, pois mecanismos diferentes parecem estar envolvidos na patogênese dessas complicações gestacionais.

Em relação ao TNF- α , poucos trabalhos da literatura atual tem relatado níveis elevados dessa citocina em relação a infecção da CA em gestantes em TPP¹⁰. Níveis diminuídos de TNF- α podem estar relacionados à cinética de produção de citocinas frente ao processo inflamatório agudo. É possível que as amostras de LA tenham sido obtidas em fase mais tardia da instalação do processo inflamatório, e que o já esteja sofrendo efeito inibitório sobre a sua produção⁴⁴.

Baseado na metodologia empregada e nos resultados obtidos, podemos concluir que a frequência de infecção na cavidade amniótica de gestantes em TPP é maior que em gestantes fora de trabalho de parto e que existe correlação entre essa infecção e níveis aumentados de IL-1 β e IL-6.

Assim, o estudo de correlação entre a presença de *U. urealyticum* e *M. hominis* e de outros microrganismos no LA e níveis de citocinas inflamatórias contribui para a compreensão da fisiopatologia do TPP. Somado a isso, a demonstração do papel importante e central das citocinas na indução do TPP deverá encorajar o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento em gestantes em TPP.

5. Referências bibliográficas*

1. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008;371:75-84.
2. Tracy SK, Tracy MB, Dean J, Laws P, Sullivan E. Spontaneous preterm birth of liveborn infants in women at low risk in Australia over 10 years: a population-based study. *BJOG* 2007;114:731-5.
3. McPheeters ML, Miller WC, Hartmann KE, Savitz DA, Kaufman JS, Garrett JM, et al. The epidemiology of threatened preterm labor: A prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:1325-30.
4. Martin JA, Kochanek KD, Strobino DM, Guyer B, MacDorman MF. Annual summary of vital statistics-2003. *Pediatrics* 2005;115:619-34.
5. McCormik MC. The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity. *N Engl J Med* 1985;312:82-90.
6. Gestação de Alto Risco / Secretaria de Políticas, Área Técnica da Saúde da Mulher. Brasília: Ministério da Saúde, 2000.
7. Pschirrer ER, Monga M. Risk factors for preterm labor. *Clin Obstet Gynecol* 2000;43:727-34.
8. Lo CC, Hsu JJ, Hsieh CC, Hsieh TT, Hung TH. Risk factors for spontaneous preterm delivery before 34 weeks of gestation among Taiwanese women. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2007;46:389-94.
9. Hitti J, Nugent R, Boutain D, Gardella C, Hillier SL, Eschenbach DA. Racial disparity in risk of preterm birth associated with lower genital tract infection. *Pediatr and Perinat Epidemiol* 2007;21:330-7.
10. Varma R, Gupta JK, James DK, Kilby MD. Do screening-preventative interventions in asymptomatic pregnancies reduce the risk of preterm delivery – A critical appraisal of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;127:145-59.
11. Hillier SL, Witkin SS, Krohn MA, Watts H, Kiviat NB, Eschenbach DA. The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnion infection. *Obst Gynecol* 1993;81:941-8
12. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000;342:1500-7.
13. Miralles R, Hodge R, McParland PC, Field DJ, Bell SC, Taylor DJ, et al. Relationship between antenatal inflammation and antenatal infection identified by detection of microbial genes by polymerase chain reaction. *Pediatr Res* 2005;57:570-7.

*Elaboradas de acordo com o International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36-47

14. Perni SC, Vardhana S, Korneeva I, Tuttle SL, Paraskevas LR, Chasen ST, et al. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in midtrimester amniotic fluid: association with amniotic fluid cytokine levels and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:1382-6.
15. Yoon BH, Romero R, Lim JH, Shim SS, Hong JS, Shim JY, et al. The clinical significance of detecting *Ureaplasma urealyticum* by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:919-24.
16. Gray DJ, Robinson HB, Malone J, Thomson RB Jr. Adverse outcome in pregnancy following amniotic fluid isolation of *Ureaplasma urealyticum*. *Prenat Diagn* 1992;12:111-7.
17. Mueller-Heubach E, Rubinstein DN, Schwarz SS. Histologic chorioamnionitis and preterm delivery in different patient populations. *Obstet Gynecol* 1990;75:622-6.
18. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG* 2006;113:17-42.
19. Jacobsson B, Mattsby-Baltzer I, Hagberg H. Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical and amniotic fluid: relationship to microbial invasion of the chorioamniotic membranes. *BJOG* 2005;112:719-24.
20. Yoon BH, Romero R, Kim M, Kim EC, Kim T, Park JS, et al. Clinical implications of detection of *Ureaplasma urealyticum* in the amniotic cavity with the polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1130-7.
22. Shmuel R, Tully JG. *Methods in mycoplasmaology*. New York: Academic Press Inc, 1983.
22. Blanchard A, Hentschel J, Duffy L, Baldus K. Detection of *Ureaplasma urealyticum* by polymerase chain reaction in the urogenital tract of adults, in amniotic fluid, and in the respiratory tract of newborns. *Clin Infect Dis* 1993;17:148-53.
23. Blanchard A, Yáñez A, Dybvig K, Watson HL, Griffiths G, Cassell GH. Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16S rRNA gene of *Mycoplasma hominis* and detection by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;31:1358-61.
24. Berquó ES, Souza JMP, Gotlieb SLD. *Bioestatística*. E.P.U. Editora, 1981.
25. 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.
26. 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.

27. Goldenberg RL, Andrews WW, Faye-Petersen O, Cliver BA, Goepfert AR, Hauth JC. The Alabama Preterm Birth Project: Placental histology in recurrent spontaneous and indicated preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:792-6.
28. Nguyen DP, Gerber S, Hohlfeld P, Sandrine G, Witkin SS. *Mycoplasma hominis* in mid-trimester amniotic fluid: relation to pregnancy outcome. *J Perinat Med* 2004;32:323-6.
29. Markenson GR, Martin RK, Tillotson-Criss M, Foley KS, Stewart Jr RS, Yancey M. The use of the polymerase chain reaction to detect bacteria in amniotic fluid in pregnancy complicated by preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:1471-7.
30. Holst RM, Mattsby-Baltzer I, Wennerholm UB, Hagberg H, Jacobsson B. Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical fluid in a population of Swedish women in preterm labor: relationship to microbial invasion of the amniotic fluid, intra-amniotic inflammation, and preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005;84:551-557.
31. Watts H, Krohn MA, Hiller SL, Eschenbach DA. The association of occult amniotic fluid infection with gestational age and neonatal outcome among women in preterm labor. *Obst Gynecol* 1992;79:351-7.
32. Witt A, Berger A, Gruber CJ, Petricevic L, Apfalter P, Worda C, et al. Increased intrauterine frequency of *Ureaplasma urealyticum* in women with preterm labor and preterm premature rupture of membranes and subsequent cesarean delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:1663-9.
33. Martius J, Eschenbach DA. The role of bacterial vaginosis as a cause of amniotic fluid infection, chorioamnionitis and prematurity – a review. *Arch Gynecol Obstet* 1990;247:1-13.
34. Gibbs RS, Romero R, Hillier SL, Eschenbach DA, Sweet RL. A review of premature birth and subclinical infection. *Am J Obst Gynecol* 1992;166:1515-28.
35. Hillier SL, Martius J, Krohn M, Kiviat N, Holmes KK, Eschenbach DA. A case-control study of chorioamnionic infection and histologic chorioamnionitis in prematurity. *N Engl J Med* 1988;319:972-80.
36. Jacobsson B, Mattsby-Baltzer I, Andersch B, Bokstrom H, Holst RM, Wennerholm IB, et al. Microbial invasion and cytokine response in amniotic fluid in a Swedish population of women in preterm labor. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82:120-8.
37. Romero R, Mazor M, Brandt F, Sepulveda W, Avila C, Cotton DB, et al. Interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta in preterm and term parturition. *Am J Reprod Immunol* 1992;27:117-23.
38. Jalava J, Mäntymaa ML, Ekblad U, Toivanen P, Skurnik M, Lassila O, et al. Bacterial 16S rDNA polymerase chain reaction in the detection of intra-amniotic infection. *BJOG*

1996;103:664-9.

39. Yoshimura K, Hirsch E. Effect of stimulation and antagonism of interleukin-1 signaling on preterm delivery in mice. *J Soc Gynecol Investig* 2005;12:532-7.
40. Gardella C, Riley DE, Hitti J, Agnew K, Krieger JN, Eschenbach D. Identification and sequencing of bacterial rDNA in culture-negative amniotic fluid from woman in preterm labor. *Am J Perinatol* 2004;21:319-23.
41. El-Bastawissi AY, Williams MA, Riley DE, Hitti J, Krieger JN. Amniotic fluid interleukin-6 and preterm delivery: a review. *Obstet Gynecol* 2000;95:1056-64.
42. Jacobsson B, Mattsby-Baltzer I, Andersch B, Bokstrom H, Holst RM, Nikolaitchouk N, et al. Microbial invasion and cytokine response in amniotic fluid in a Swedish population of women with preterm prelabor rupture of membranes. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82:423-31.
43. Fortunato SJ, Menon R. Distinct molecular events suggest different pathways for preterm labor and premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:1399-405.
44. Ulich T, Guo K, Remick D, Del Castillo J, Yin S. Endotoxin-induced cytokine gene expression in vivo, III: IL-6 mRNA and serum protein expression and the in vivo hematologic effects of IL-6. *J Immunol* 1991;146:2316-23.