



Ana Patrícia Rodrigues Domingues

PARTO PREMATURO
ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E GENÉTICO
O envolvimento do gene *HBD1*.

Doutoramento em Ciências da Saúde,
ramo de Medicina, na especialidade de Ginecologia e Obstetrícia (Obstetrícia),
orientada por Professor Doutor José Paulo Achando da Silva Moura
e Professora Doutora Maria Manuel Monteiro Grazina e apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

ANA PATRÍCIA RODRIGUES DOMINGUES

PARTO PREMATURO
- ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E GENÉTICO
O envolvimento do gene *HBD1*.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra,
para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Doutor em Ciências da Saúde, ramo de Medicina,
na especialidade de Ginecologia e Obstetrícia (Obstetrícia),
realizada sob Orientação do
Professor Doutor José Paulo Achando da Silva Moura
(Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e
co-Orientação da Professora Doutora Maria Manuela Monteiro Grazina
(Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra).

JULHO 2014

Copyright© Ana Patrícia Domingues, 2014

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode se publicada sem a referência e autorização. Os direitos de autor dos dados genéticos apresentados são pertença partilhada com Manuela Grazina ©.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgment and authorization. The copyright of genetic data presented is owned shared with Manuela Grazina ©.

'De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos a começar...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...

Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!'

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

'O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis'

Fernando Pessoa

Para a realização de qualquer trabalho, é sempre indispensável a ajuda de um conjunto de pessoas, sem o contributo das quais, não seria possível chegar ao fim da jornada. Nestas primeiras páginas ficam os agradecimentos finais a todos aqueles, cuja colaboração e incentivo tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao Senhor Professor Doutor Paulo Moura, orientador científico deste trabalho, agradeço o incentivo, os ensinamentos e a extrema disponibilidade.

À Senhora Professora Doutora Manuela Grazina, a amizade, o incentivo, a disponibilidade, as facilidades colocadas à disposição para a concretização de parte da investigação deste trabalho e as discussões científicas que tanto contribuíram para este projeto.

À minha colega e amiga Mestre Mariana Tavares, por toda a ajuda que me deu na revisão dos imensos processos clínicos, e pela forma como sempre esteve disponível e me incentivou a atingir os objetivos, com a sua amizade e determinação.

À Mestre Carolina Ribeiro, por toda a ajuda e companheirismo nos meses que passei no Laboratório de Bioquímica Genética (LBG) e que, sempre disponível, com a sua amizade, determinação e conhecimento me ajudou a ultrapassar tantas dificuldades e reveses.

À Mestre Adriana Belo, pela indispensável e sempre disponível colaboração na análise estatística.

A todos os meus amigos e colegas que me apoiaram e aturaram durante este período com toda a sua amizade, disponibilidade e incentivo.

A todos os elementos do LBG que me acompanharam na última fase deste projeto, obrigado pelo vosso apoio, amizade e diversão.

Ao Girão, pelo incondicional carinho, incentivo, compreensão e ajuda.

À minha família, em particular à minha Mãe e aos meus Avós, pelo constante incentivo e compreensão.

Ao meu Pai *In Memoriam*.

ÍNDICE

Índice de Figuras	11
Índice de Tabelas	13
Lista de Abreviaturas	15
RESUMO	17
ABSTRACT	19
I. INTRODUÇÃO	21
1. Parto pré-termo	25
1.1. Definição	25
1.2. Fisiologia do início do trabalho de parto	26
1.2.1. O miométrio	27
1.2.2. O colo uterino	35
1.2.3. As membranas fetais	42
1.3. Fatores de risco para parto pré-termo espontâneo	46
1.3.1. O papel da infecção/inflamação no parto pré-termo espontâneo com e sem rotura prematura de membranas	47
1.3.2. A predisposição genética para a infecção/inflamação no parto pré-termo	50
1.3.3. A defensina	54
II. OBJETIVOS	69
III. MATERIAL E MÉTODOS	73
1. Caracterização da prematuridade espontânea global e precoce	75
1.1. Constituição da amostra	75
1.2. Análise da amostra	77
1.3. Análise estatística	79
2. Estudo genético	81
2.1. Constituição da amostra	81
2.2. Análise da amostra	82
2.2.1. Extração de DNA	82
2.2.2. Quantificação de DNA	82
2.2.3. Genotipagem do <i>DEFB1/HBD1</i>	83
2.3. Análise estatística	84
IV. RESULTADOS	85
1. Caracterização da prematuridade espontânea	87
1.1. Análise de parto pré-termo com e sem rotura prematura de membranas	87
1.1.1. Dados demográficos e antecedentes maternos	87
1.1.2. Dados relativos à vigilância pré-natal	92

1.1.3. Dados relativos ao internamento que culminou no parto	96
1.1.4. Dados relativos ao parto e puerpério	102
1.1.5. Dados neonatais	105
1.2. Fatores associados a parto pré-termo precoce com e sem rotura prematura de membranas	106
1.3. Fatores associados a morbidade neonatal	107
2. Estudo genético	109
2.1. Genotipagem do <i>DEFB1/HBD1</i>	109
2.1.1. SNP c.-20G>A	109
2.1.2. SNP c.-44G>C	113
2.1.3. SNP c.-52G>A	116
2.1.4. Haplotipos	120
V. DISCUSSÃO	121
1. Seleção das amostras	123
1.1. Caracterização da prematuridade espontânea precoce	123
1.2. Estudo genético	123
2. Caracterização da prematuridade precoce	124
3. Análise genética de SNPs do <i>DEFB1/HBD1</i>	139
VI. CONCLUSÃO	147
VII. BIBLIOGRAFIA	151

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.	Caraterização da amostra de prematuridade espontânea estudada, subdividida por PPTe e RPMPT, quer na prematuridade global (n=1432), quer na precoce (n=341).	76
2.	Idade nas grávidas (média±DP) com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	87
3.	Estado civil das grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	88
4.	Emprego nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	89
5.	Registo, em valor percentual, de antecedentes familiares patológicos nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	90
6.	Registo, em valor percentual, de antecedentes pessoais patológicos nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	90
7.	Paridade das grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	91
8.	Local de vigilância da gestação nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	92
9.	Complicações registadas no decurso da gestação nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	95
10.	Média e desvio padrão da idade gestacional ao internamento nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT (em semanas).	98
11.	Média e desvio padrão da PCR ao internamento nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	99
12.	Média e desvio padrão dos leucócitos ao internamento nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	100
13.	Média e desvio padrão da VS ao internamento nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	100
14.	Registo de administração de corticóides e antibióticos no decurso da gestação nas grávidas com PPT espontâneo com e sem RPMPT.	101
15.	Prolongamento da gravidez, em dias, após internamento nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	102
16.	Idade gestacional ao parto nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT (em semanas).	103
17.	Taxa de cesarianas nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	103
18.	Indicação operatória na prematuridade global e precoce, com e sem RPMPT.	103
19.	Complicações registadas no puerpério de PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	105
20.	Taxa de admissões na UCIN em PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	105

21.	Mortalidade e morbidade neonatal dos PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	106
22.	Distribuição alélica para o ensaio c.-20G>A no grupo das RPMPT controlos (B).	110
23.	Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-20G>A no grupo das RPMPT ^p , de acordo com a idade da grávida.	111
24.	Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-20G>A no grupo das RPMPT ^p , de acordo com a IG da RPMPT.	111
25.	Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-20G>A no grupo das RPMPT ^p , de acordo com o valor da PCR.	112
26.	Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-20G>A no grupo das RPMPT ^p , de acordo com o valor dos leucócitos.	112
27.	Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-20G>A no grupo das RPMPT ^p , de acordo com a IG ao parto.	112
28.	Distribuição alélica para o ensaio c.-44G>C no grupo RPMPT los (B).	114
29.	Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-44G>C no grupo das RPMPT ^p , de acordo com a idade da grávida.	115
30.	Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-44G>C no grupo das RPMPT ^p , de acordo com a IG da RPMPT.	115
31.	Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-44G>C no grupo das RPMPT ^p , de acordo com o valor da PCR.	115
32.	Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-44G>C no grupo das RPMPT ^p , de acordo com o valor de leucócitos.	116
33.	Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-44G>C no grupo das RPMPT ^p , de acordo com a IG ao parto.	116
34.	Distribuição alélica para o ensaio c.-52G>A no grupo das RPMPT (A) e nos controlos (B).	117
35.	Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-52G>A no grupo das RPMPT ^p , de acordo com a idade da grávida.	118
36.	Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-52G>A no grupo das RPMPT ^p , de acordo com a IG da RPMPT.	118
37.	Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-52G>A no grupo das RPMPT ^p , de acordo com o valor da PCR.	118
38.	Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-52G>A no grupo das RPMPT ^p , de acordo com o valor dos leucócitos.	119
39.	Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-52G>A no grupo das RPMPT ^p , de acordo com a IG ao parto.	119

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela	Pág.
1. Antecedentes de esterilidade nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	91
2. Antecedentes e idade gestacional dos partos prematuros ocorridos em gestações anteriores das grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	92
3. Realização de diagnóstico pré-natal e técnicas invasivas nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	93
4. Resultado de exsudado cervico-vaginal e pesquisa de <i>Streptococcus</i> grupo B nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	93
5. Realização de vigilância ecográfica e presença de patologia fetal nas grávidas com PPT espontâneo com e sem RPMPT.	94
6. Valor médio da altura, peso e IMC inicial e final e ganho de peso nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	94
7. Idade gestacional de ocorrência de complicações registadas no decurso da gestação nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	96
8. Internamentos anteriores e IG da sua ocorrência no decurso da gestação nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	96
9. Proveniência das grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	97
10. Gérmenes identificados nos exsudados vaginais positivos ao internamento nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	98
11. Gérmenes identificados nas uroculturas positivas ao internamento nas grávidas com PPT espontâneo com e sem RPMPT.	99
12. Realização de medicação nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	102
13. Dados relativos ao recém-nascido - sexo, peso ao nascer e índices de APGAR.	104
14. Estudo bacteriológico e histológico da placenta nos PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.	104
15. Fatores associados a parto prematuro espontâneo precoce sem RPMPT.	107
16. Fatores associados a parto prematuro espontâneo precoce com RPMPT.	107
17. Fatores associados a morbilidade neonatal.	108
18. Fatores associados a morbilidade neonatal neurológica.	108
19. Fatores associados a SDR.	109
20. Frequência genotípica e alélica do SNP c.-20G>A.	110
21. Distribuição de fatores clínicos de acordo com os genótipos e alelos do SNP c.-20G>A, no grupo de mulheres com RPMPT	113
22. Frequência genotípica e alélica do SNP c.-44G>C.	113

23.	Distribuição de fatores clínicos de acordo com os genótipos e alelos do SNP c.-44G>C, no grupo de mulheres com RPMPT	114
24.	Frequência genotípica e alélica do SNP c.-52G>A.	117
25.	Distribuição de fatores clínicos de acordo com os genótipos e alelos do SNP c.-52G>A, no grupo de mulheres com RPMPT	119
26.	Frequências dos haplotipos dos SNP do <i>DEFB1</i> (c.-20G>A/c.-44G>C/c.-52G>A) em mulheres com RPMPT	120

Lista de abreviaturas

AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
APPT	Ameaça de parto Pré-termo
ATP	Adenosina trifosfato
Ca²⁺	Cálcio intracelular
COX	Ciclo-oxigenase
DEFB1/HBD1	Gene da defensina β 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EFNT	Estado fetal não tranquilizador
ET	Endotelina
FIV	Fertilização <i>in-vitro</i>
GAG	Glicosaminoglicanos
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
hBD	Proteína da defensina
ICSI	Injeção intra-citoplasmática de esperma
iDCs	Células dendríticas imaturas
IF	Indução falhada
IFP	Incompatibilidade feto-pélvica
IG	Idade Gestacional
IL	Interleucina
IM	Indicação materna
IMC	Índice de massa corporal
ITU	Infeções do trato urinário
LES	Lupus eritematoso sistémico
LPS	Lipopolissacarídeos
MLCK	Quinase da cadeia leve da miosina
MMP	Metalometilproteinases
NDP	Não progressão da dilatação
NOS	Óxido nítrico sintetase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAM	Peptídeos antimicrobianos naturais
PCR	Proteína C Reativa
PG	Prostaglandinas
PGDH	15-hidroxiprostaglandina desidrogenase
PKC	Proteína quinase C
PMA	Procriação medicamente assistida

PPT	Parto Pré-Termo
PPT_{eg}	Parto Pré-Termo espontâneo global (<37sem IG)
PPT_{ep}	Parto Pré-Termo espontâneo precoce (<34sem IG)
RN	Recém-nascido
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RPM	Rotura prematura de membranas
RPMPT	Rotura prematura de membranas pré-termo
RPMPT_g	Rotura prematura de membranas pré-termo global (<37sem IG)
RPMPT_p	Rotura prematura de membranas pré-termo precoce (<34sem IG)
SDR	Síndrome de Dificuldade Respiratória
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TIMP	Inibidor de metaloproteinases tecidual
TLR	Recetores <i>toll-like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UCIN	Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais
VS	Velocidade de Sedimentação
ZMA	Zona de morfologia alterada

RESUMO

O parto pré-termo, definido como o parto ocorrido antes da 37.^a semana, afecta 6 a 12%. O risco de morte de um prematuro é 120 vezes superior ao de um recém-nascido de termo. Além disso, os sobreviventes encontram-se em risco de morbilidade a curto (síndrome de dificuldade respiratória, hemorragia intraventricular, enterocolite necrotizante, sépsis, retinopatia) e a longo prazo (paralisia cerebral, dificuldades de aprendizagem, cegueira, doenças respiratórias e alterações do estado metabólico na vida adulta). Aproximadamente dois terços dos partos prematuros ocorrem espontaneamente, enquanto o restante terço resulta da indução do trabalho de parto ou parto abdominal por indicações maternas e/ou fetais.

Foram identificados diversos mecanismos patofisiológicos como precursores do parto pré-termo fazendo com que alguns autores o considerem como uma síndrome. Destes, a predisposição genética, o *stress* fetal, o estiramento excessivo das fibras musculares uterinas, a inflamação/infeção e a hemorragia decidual têm merecido especial atenção. Nos últimos anos, vários estudos apontaram para uma base inflamatória desta síndrome, envolvendo uma ampla variedade de mediadores, cuja elevação foi também relacionada com infeções e prognósticos neonatais e infantis mais adversos. Foi também demonstrada a infiltração dos tecidos com células inflamatórias, o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, a sobre-regulação dos genes envolvidos no controlo da inflamação e a identificação de vários polimorfismos nos genes que codificam vários mediadores inflamatórios ou os seus recetores. Mais recentemente, estudos de proteómica identificaram a defensina em níveis sistematicamente elevados no líquido amniótico de casos em que tinha ocorrido parto pré-termo.

A defensina é uma proteína do sistema imune inato, que confere ao organismo uma primeira linha de defesa, rápida e não específica, contra a colonização de microrganismos patogénicos, atuando como 'antibiótico' natural. Existem diversos estudos na literatura que permitiram estabelecer uma associação significativa entre variações de sequência do gene *DEFB1/HBD1*, que codifica uma das isoformas da defensina, com a suscetibilidade a doenças infecciosas, alérgicas e até cancerígenas.

Assim, os objetivos deste estudo são a caracterização da prematuridade espontânea precoce (abaixo das 34 semanas de gestação), com e sem rotura prematura de membranas, dentro da prematuridade global, com e sem RPM, numa amostra correspondente a 10 anos, de forma a avaliar se existe alguma alteração nas características da prematuridade global e/ou especificamente da prematuridade precoce, ao longo dos anos analisados; se, considerando a pre-

maturidade global, existirá algum fator associado a parto abaixo das 34 semanas, com e sem RPMPT; se, na prematuridade precoce, será a RPMPT um fator de risco para resultados neonatais mais adversos; e a identificação do papel das variações no gene *DEFB1/HBD1* como fator de suscetibilidade para a ocorrência de RPMPT precoce, nomeadamente avaliar se alterações genéticas, nomeadamente os SNPs c.-20G>A, c.-44G>C e c.-52G>A são indicadoras de risco ou proteção para os resultados perinatais.

Na caracterização da prematuridade espontânea precoce nos últimos 10 anos, verificamos que: a sua frequência tem-se mantido constante ao longo dos anos; ao contrário da prematuridade global, na precoce não há modificações nos fatores de risco associados às características demográficas, antecedentes pessoais, obstétricos e familiares, peso e IMC inicial e final da grávida, nem diferenças destes fatores de risco na presença ou não de RPMPT associada; nas RPMPT precoces, a vigilância e a proveniência da grávida relaciona-se maioritariamente com instituições de saúde mais próximas da área de residência, com menos complicações durante a gravidez, parâmetros infecciosos sistémicos mais baixos; as grávidas são internadas significativamente mais cedo, fazem corticoterapia e antibioterapia em taxas superiores, apresentam tempos de latência até ao parto maiores, sendo a IG deste significativamente mais tardia em relação aos PPTe precoces; como fatores associados a um maior risco de PPTe precoce encontramos metrorragias e diabetes gestacional; enquanto que as mulheres que não trabalham, que são provenientes de outros hospitais e apresentam valores de leucócitos à entrada $\geq 13 \times 10^9/L$, têm uma probabilidade aumentada de RPMPT precoce; as RPMPT precoces não constituem um fator de risco para resultados neonatais mais adversos. Pelo contrário, os RN apresentam índices significativamente menores de morbilidade neonatal, especialmente à custa de menor morbilidade neurológica e de SDR.

Na genotipagem do *DEFB1/HBD1*, no presente estudo foi investigada pela primeira vez a possibilidade de associação entre os SNPs c.-20G>A, c.-44G>C e c.-52G>A e a suscetibilidade para RPMPT precoce, embora não fosse encontrada ainda uma associação positiva. Foi evidenciado um efeito protetor do alelo A do SNP c.-20G>A no desenvolvimento de SDR nos RN de mães portadoras deste alelo.

PALAVRAS-CHAVE: Parto prematuro; Caracterização prematuridade espontânea precoce; Rotura prematura de membranas pré-termo; defensiva

ABSTRACT

Preterm birth, defined as birth occurring before 37th week of gestation, affects 6-12% of all pregnancies. The risk of premature death for the preterm newborn is 120 times higher than a newborn at term. In addition, survivors are at higher risk of morbidity in short (respiratory distress syndrome, intraventricular hemorrhage, necrotizing enterocolitis, sepsis, retinopathy) and long term (cerebral palsy, learning disabilities, blindness, respiratory diseases and metabolism changes in adulthood). Approximately two-thirds of preterm deliveries occur spontaneously, while the remaining third results from induction of labor or abdominal delivery due to maternal and/or fetal indications.

Various pathophysiological mechanisms have been pointed as precursors of preterm birth causing some authors to consider it a syndrome. Of these, genetic predisposition, fetal stress, excessive stretching of the uterine muscle fibers, inflammation/infection and decidual hemorrhage have received special attention. In recent years, several studies have pointed to an inflammatory basis for this syndrome, involving a wide variety of mediators, whose elevation was also associated with more infections and adverse neonatal and infant prognosis. It was also demonstrated tissue infiltration with inflammatory cells, increased production of proinflammatory cytokines, chemokines, the upregulation of genes involved in the control of inflammation and identification of multiple polymorphisms in genes encoding several inflammatory mediators or their receptors. More recently, proteomic studies identified defensin in consistently high levels in amniotic fluid of cases of preterm birth.

The defensin is a protein of the innate immune system, which gives the body a first line of defense, rapid and non-specific, against colonization of pathogenic microorganisms, acting as a natural 'antibiotic'. There are many studies in the literature that allowed to establish a significant association between sequence variations of *DEFB1/HBD1* gene encoding a defensin isoform, with susceptibility to infectious, allergic and even cancerous diseases.

The objectives of this study are the characterization of early spontaneous preterm birth (below 34 weeks of gestation), with and without premature rupture of membranes, within the overall prematurity, with and without PROMPT, in a sample corresponding to 10 years in order to assess whether there is any change in the characteristics of global and/or premature prematurity specifically, over the years analyzed; whether, considering the overall prematurity, there are some factors associated with birth below 34 weeks with and without PROMPT; if in early prematurity, PROMPT will be a risk factor for more adverse neonatal outcomes; and the identification of the role of changes in *DEFB1/HBD1* gene as a sus-

ceptibility factor for the occurrence of early PROMPT and, in particular, assess whether genetic alterations, including SNPs c.-20G>A, c.-44G>C and c.-52G>A are indicators of risk or protection for perinatal outcomes.

In the characterization of early spontaneous preterm birth in the past 10 years, we found that: their frequency has remained constant over the years; unlike global prematurity, early prematurity revealed no changes in risk factors associated with demographic characteristics, personal, obstetric and family history, initial and final weight and BMI, or differences of these risk factors in the presence or absence of associated PROMPT; in early PROMPT, surveillance and the provenance of the pregnant women relates mainly to health institutions closer to their residence area, with fewer complications during pregnancy, lower systemic infectious parameters; pregnant women are hospitalized significantly earlier in gestation, corticosteroids and antibiotics administration are higher, they have greatest latency times until labor, with this being at a gestational age significantly higher compared to early preterm delivery without PROMPT; associated with an increased risk of early preterm delivery without PROMPT we found bleeding during pregnancy and gestational diabetes; while women who do not work, who are from other hospitals and have levels of leukocyte at admission $\geq 13 \times 10^9/L$, have an increased likelihood of early PROMPT; early PROMPT does not constitute a risk factor for more adverse neonatal outcomes. By contrast, these infants have significantly lower levels of neonatal morbidity, especially with lower neurological morbidity and RDS.

In *DEFB1/HBD1* genotyping in the present study we investigated for the first time the possible association between SNPs c.-20G>A, c.-44G>C and c.-52G>A and susceptibility to early PROMPT, although was not yet found a positive association. A protective effect of the A allele of SNP c.-20G>A in the development of RDS in newborns of mothers who carry this allele was found.

KEY WORDS: Preterm delivery; characterization of early spontaneous preterm birth; premature rupture of membranes preterm; defensin

I. INTRODUÇÃO

O parto pré-termo, definido como o parto ocorrido antes da 37.^a semana de idade gestacional, afecta 6 a 12% das gestações e continua a ser uma das causas mais importantes de mortalidade e morbidade neonatal. O risco de morte de um prematuro é 120 vezes superior ao de um recém-nascido de termo. Além disso, os sobreviventes encontram-se em risco de morbidade a curto (síndrome de dificuldade respiratória, hemorragia intraventricular, enterocolite necrotizante, sépsis, retinopatia) e a longo prazo (paralisia cerebral, dificuldades de aprendizagem, cegueira, doenças respiratórias e alterações do estado metabólico na vida adulta) (Gotsch, Gotsch et al. 2009). Aproximadamente dois terços dos partos prematuros ocorrem espontaneamente, enquanto o restante terço resulta da indução do trabalho de parto ou parto abdominal por indicações maternas e/ou fetais (complicações hipertensivas da gravidez, restrição de crescimento intrauterino, entre outras).

Foram identificados diversos mecanismos patofisiológicos como precursores do parto pré-termo fazendo com que, nos últimos anos, alguns autores o considerem como uma síndrome. Destes, a predisposição genética, o *stress* fetal, o estiramento excessivo das fibras musculares uterinas, a inflamação/infeção e a hemorragia decidual têm merecido especial atenção (Buhimschi, Bhandari et al. 2007, Buhimschi, Rosenberg et al. 2008, Buhimschi IA 2008, Romero, Espinoza et al. 2008, Cobo, Palacio et al.

2009, Gotsch, Gotsch et al. 2009, Stella, Bennett et al. 2009). Nos últimos anos, vários estudos apontaram para uma base inflamatória desta síndrome, envolvendo uma ampla variedade de mediadores, cuja elevação foi também relacionada com infeções e prognósticos neonatais e infantis mais adversos. Foi também demonstrado em vários trabalhos que, no parto pré-termo, há uma infiltração dos tecidos com células inflamatórias, o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL1 β , IL6, IL8, TNF α), quimiocinas (GRO α , GCSF, GM-CSF), a sobrerregulação dos genes envolvidos no controlo da inflamação e a identificação de vários polimorfismos no gene que codifica a IL6 (Gotsch, Gotsch et al. 2009). Mais recentemente, estudos de proteómica identificaram 4 proteínas: a defensina 1 e 2 e a calgranulina A e C, em níveis sistematicamente elevados no líquido amniótico de casos em que tinha ocorrido parto pré-termo (Buhimschi, Bhandari et al. 2007, Buhimschi, Rosenberg et al. 2008, Buhimschi et al. 2008, Romero, Espinoza et al. 2008, Cobo, Palacio et al. 2009, Stella, Bennett et al. 2009).

A defensina é uma proteína do sistema imune inato, que confere ao organismo uma primeira linha de defesa, rápida e não específica, contra a colonização de microrganismos patogénicos, atuando como 'antibiótico' natural (Hollox, Barber et al. 2008, Horne, Stock et al. 2008, Diamond, Beckloff et al. 2009). Existem diversos estudos na literatura que permitiram estabelecer uma associação significativa entre variações de sequência do gene *DEFB1*, que codifica uma das isoformas da defensina, com a suscetibilidade a doenças infecciosas.

Assim, propusemo-nos a caracterizar a prematuridade espontânea precoce associada ou não a rotura prematura de membranas, ao longo de um período de 10 anos, e avaliar a influência de alterações na sequência do gene *DEFB1* no risco de rotura prematura de membranas pré-termo.

1. PARTO PRÉ-TERMO

1.1. Definição

Uma definição consensual de 'prematuro' é essencial para uma análise epidemiológica da prematuridade.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que parto pré-termo seja definido como aquele que ocorre numa idade gestacional (IG) inferior às 37 semanas de gestação (259 dias) contadas desde o primeiro dia da última perda menstrual (WHO 1993). Embora exista esta concordância generalizada quanto ao limite superior da IG, em relação ao limite inferior não há consenso. A OMS sugeriu incluir apenas recém-nascidos (RN) com peso >500gr ou quando atingidas as 22 semanas (154 dias). Em Portugal, com a emissão pela Direção Geral da Saúde da norma que estabelece obrigatoriedade de registo da mortalidade perinatal após as 24 semanas de gestação, e pelas definições dadas para os limites da interrupção da gravidez, tem-se adotado as 24 semanas como limite inferior de parto pré-termo (DGS 2013).

A incidência de parto pré-termo (PPT) varia entre 6 e 12% (Romero, Espinoza et al. 2008, Cobo, Palacio et al. 2009, Stella, Bennett et al. 2009), no entanto as taxas de incidência reportadas são influenciadas pelo método de determinação da IG, bem como pelas diferentes definições de viabilidade usadas e conseqüentemente pelo registo de todos os partos prematuros. Estas variações constituem uma limitação quando se comparam dados de diferentes países ou quando se interpretam dados epidemiológicos.

Em Portugal, a incidência de prematuridade registou um decréscimo de 9,1% em 2007 para 7,8% em 2012 (INE 2013).

1.2. Fisiologia do início do trabalho de parto

A prevenção do PPT permanece como um dos grandes objetivos da investigação em Obstetrícia. Para o seu conhecimento temos que compreender os mecanismos associados à regulação da contratilidade uterina, à modificação cervical e às modificações do comportamento bioquímico das membranas fetais.

Romero (Romero 1997) postulou que a principal diferença entre o parto a termo e o pré-termo seria a forma de ativação - fisiológico no primeiro e através de um processo de doença no segundo, enquanto outros autores consideram que as causas podem variar ao longo da gravidez e que não traduzem necessariamente uma aceleração do processo que ocorre a termo (Challis 2000).

O parto requer que o miométrio, mantido num estado de repouso relativo durante a gravidez, produza contrações coordenadas, e que o colo do útero se deixe dilatar e permitir a passagem do feto.

Foi proposta a divisão do comportamento do útero durante o parto, em diferentes fases. Na maior parte da gravidez, o miométrio está num estado de repouso relativo - fase 0 do parto, durante a qual uma variedade de diferentes inibidores (que incluem progesterona, relaxina, prostaciclina, óxido nítrico e agonistas β -adrenérgicos endógenos) podem agir sobre o miométrio. A mudança da quietude à ativação do miométrio é descrita como a fase 1 - essencial para que o músculo possa responder ao estímulo fornecido pelo aumento dos níveis de agentes uterotónicos, que permitem a geração de contrações síncronas, de alta amplitude e de alta frequência. Esta

ativação do miométrio resulta da expressão coordenada de uma variedade de proteínas, denominadas proteínas de associação-contração, que incluem canais iônicos, recetores de agonistas (por exemplo, para a ocitocina e prostaglandinas) e *gap junctions* (Boyle, MacLusky et al. 1987, Garfield, Ali et al. 1995, Negishi, Sugimoto et al. 1995). A fase 2 corresponde à estimulação, quando uterotónicos endógenos (ocitocina e prostaglandinas) agem sobre o miométrio ativado, e a fase 3 à involução pós-parto do útero.

Atualmente, a maioria dos agentes utilizados no tratamento de trabalho de parto prematuro (inibidores da síntese de prostaglandinas, bloqueadores dos canais de cálcio, antagonistas da ocitocina e agonistas β -adrenérgicos), são dirigidos à fase 2, em que a ativação do miométrio já teve lugar. Assim, parece plausível que as estratégias sobre diagnóstico e tratamento de parto prematuro devam abordar também a fase 1 da ativação uterina (Challis 2000).

1.2.1. O miométrio

O miométrio é composto por feixes entrelaçados de fibras musculares longas, fusiformes e lisas, dispostas em camadas mal definidas, rodeadas por material extracelular composto por fibras de colagénio, fibroblastos e células derivadas da medula óssea. Durante a gravidez, o miométrio cresce dramaticamente devido à hipertrofia e ao aumento do número de células do músculo liso. As células do miométrio comunicam umas com as outras através de canais intercelulares chamados *gap junctions*, que são compostas por proteínas, designadas por conexinas, que expandem as membranas e formam um poro. Elas fornecem uma via de menor resistência entre as células do músculo liso miometrial e permitem a passagem de iões inorgânicos e pequenas moléculas. O número de *gap junctions* aumenta no miomé-

trio no momento do parto, estando sob controle hormonal, inibido pela progesterona e estimulado pelo estradiol. Além disso, as prostaglandinas regulam a formação e função das *gap junctions* (Garfield and Hayashi 1981). Tal como no músculo esquelético, a contração do miométrio ocorre a partir de um deslizamento dos filamentos de actina e miosina, sem qualquer alteração no comprimento de cada filamento (Huxley 1971). Um aumento do cálcio intracelular (Ca^{2+}) promove a ligação do cálcio à calmodulina que ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) que fosforila a miosina, cujos filamentos fosforilados se ligam à actina, e a contração ocorre com a hidrólise de adenosina trifosfato (ATP). Um aumento do Ca^{2+} é crucial para este processo, em que os agentes estimuladores da atividade do miométrio geralmente aumentam os seus níveis intracelulares através de um influxo através dos canais ativados por recetores, ou talvez também, por meio da libertação de cálcio das reservas intracelulares (incluindo o retículo sarcoplasmático). Os agentes que inibem a atividade uterina fazem-no aumentando os níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos AMPc ou GMPc, que por sua vez inibem a libertação de cálcio dos reservatórios intracelulares ou reduzem a atividade da MLCK (Wray 1993, Wray, Kupittayanant et al. 2002).

O músculo miometrial apresenta atividade espontânea ativa quer em grávidas quer em não grávida, tendo sido descritos 2 tipos de atividade eletromiográfica em macacas Rhesus grávidas: as contraturas (baixa intensidade, longa duração, com início precoce na gravidez e descritas clinicamente pela primeira vez em 1873 por Braxton Hicks) e as contrações (alta intensidade, curta duração e com atividade nocturna). Essas contrações espontâneas são precedidas por potenciais de ação, sendo que as células do miométrio têm um potencial de membrana em repouso negativo de aproximadamente -50 mV. As mudanças no potencial de membrana do miométrio,

que ocorrem com o fluxo de iões através da membrana, são fundamentais para o controlo da atividade uterina (Inoue, Nakao et al. 1990, Wray 1993).

O controlo da função do miométrio é efetuado por vários mecanismos. Há muito que foi reconhecido que o útero recebe uma extensa inervação autónoma. As células do músculo liso miometrial possuem todos os quatro tipos principais de recetores adrenérgicos (α_1 , α_2 , β_1 e β_2). Tem sido postulado que os recetores α_1 medeiam a contração e os β_2 o relaxamento. A ativação dos recetores α_2 parece não ter efeito sobre a atividade contrátil. Ambos os recetores β_1 e 2 estão acoplados à adenilato ciclase através da proteína G. A ativação da adenilato ciclase resulta num aumento de AMPc que ativa uma proteína cinase e conduz a uma redução da fosforilação da cadeia leve da miosina e, portanto, ao relaxamento. Outros mecanismos pelos quais o AMPc pode resultar em relaxamento incluem a retenção e o efluxo de cálcio através da membrana celular. A estimulação colinérgica, através da atuação da acetilcolina nos recetores muscarínicos M1 e M3, provoca contrações uterinas através do aumento do inositol-1,4,5-trifosfato e, conseqüentemente, da elevação do cálcio intracelular. Outros neurotransmissores conhecidos no útero incluem o polipeptídeo intestinal vasoativo, o neuropeptídeo Y, a substância P, o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina, a galanina e o peptídeo de libertação da gastrina. No entanto, está bem estabelecido que as contrações e expulsão do feto podem prosseguir na ausência de atividade neuronal, sugerindo que o papel destas estruturas na atividade contrátil do útero é de menor importância (Krantz 1959, Alm, Alumets et al. 1978, Huang, Gu et al. 1984, Bottari, Vokaer et al. 1985, Gibbins, Furness et al. 1985, Bulbring and Tomita 1987, Thornton, Gillespie et al. 1992, Wray 1993, Price and Bernal 2001).

As mudanças nas condições hormonais têm efeitos profundos na atividade uterina. A gravidez humana é caracterizada por um estado de acen-

tuado aumento dos níveis de estrogénio, predominantemente 17β -estradiol e estriol. Embora os estrogénios estimulem a produção de prostaglandinas na decídua, promovam a formação de *gap junctions* e aumentem a síntese de recetores de ocitocina, o seu papel na iniciação do parto permanece incerta (Batra and Fadeel 1994). A progesterona é essencial para a manutenção da gravidez, tendo um efeito 'relaxante' no miométrio pela diminuição da permeabilidade da membrana das células do miométrio ao cálcio, pelo aumento da síntese de adenosina monofosfato e pela inibição da formação de prostaglandinas deciduais. Por estes efeitos, a progesterona e agentes progestativos sintéticos têm sido utilizados como agentes tocolíticos na ameaça de trabalho de parto prematuro. Da mesma forma, a utilização de mifepristone (um agente antiprogesterona), aumenta a atividade uterina e a sensibilidade do miométrio às prostaglandinas. No parto, a diminuição da progesterona e a ativação estrogénica não são mediados por alterações nos níveis séricos das mesmas. Em vez disso, estes eventos podem ser mediados por alterações na capacidade de resposta do miométrio à progesterona e estrogénios através de alterações na expressão dos seus recetores (Keirse 1990, Keirse 1990, Egarter and Husslein 1992, Mesiano, Chan et al. 2002).

A ocitocina é um estimulador poderoso da atividade uterina e pode melhorar a intensidade, a frequência e a duração das contrações uterinas. É um peptídeo de 9 aminoácidos, sintetizado nos núcleos supra-ótico e paraventricular do hipotálamo, como uma grande molécula precursora. Embora classicamente descrita como sendo libertada do lobo posterior da hipófise, também é expressa no âmnios, córion e decídua. Ela estimula a contração uterina por uma variedade de mecanismos que podem incluir uma pequena contribuição do cálcio libertado pelo inositol 1,4,5-trifosfato do retículo sarcoplasmático, mas que está predominantemente associada à ativação dos canais de cálcio através dos seus recetores. As concentrações de ocitocina

decidual e dos seus recetores no miométrio aumentam antes do parto; a administração de ocitocina estimula contrações do miométrio, que são indistinguíveis das do trabalho de parto espontâneo, e antagonistas da ocitocina inibem as contrações do miométrio *in vitro* e no trabalho de parto pré-termo. Existe uma diferença marcada na capacidade farmacológica da ocitocina para provocar contrações uterinas ao longo da gestação, sendo aquela mais eficaz no terceiro trimestre, devido à presença de uma maior concentração dos seus recetores (Khan-Dawood and Dawood 1984, Chibbar, Miller et al. 1993, Kinsler, Thornton et al. 1996, Mitchell and Schmid 2001, Worldwide Atosiban versus Beta-agonists Study 2001).

Um aumento da síntese de prostaglandinas (PG), particularmente a PGE2 e a PGF2, ocorre no útero e tecidos fetais durante o parto. As PG são formadas a partir do ácido araquidónico pela enzima ciclo-oxigenase (COX), da qual existem duas isoformas: a COX-1 é uma isoforma constitutiva e ubíqua, enquanto a COX-2 é uma isoforma indutível. Ambas são expressas nas membranas fetais e no miométrio, e enquanto a expressão da COX-2 aumenta no miométrio durante o trabalho de parto, juntamente com a produção de prostaglandinas, a expressão da COX-1 não é alterada (Slater, Allport et al. 1998, Slater, Dennes et al. 1999, Erkinheimo, Saukkonen et al. 2000, Sawdy, Slater et al. 2000). A síntese de PGE2 aumenta no miométrio durante o trabalho de parto a termo e pré-termo, sendo esta inibida por inibidores COX-2 seletivos, mas não significativamente alterada por inibidores seletivos da COX-1 (Sadovsky, Nelson et al. 2000). Isto sugere um papel importante da COX-2 na formação de PGE2 no miométrio durante o parto, sendo a sua expressão superior no âmnios e córion-decídua, enquanto as PG produzidas nas membranas fetais atuam no miométrio como agentes parácrinos (Slater, Allport et al. 1998, Sawdy, Slater et al. 2000). O aumento da concentração de RNA mensageiro (RNAm) da COX-2 na membrana

fetal associado ao trabalho de parto será devido à acumulação de RNAm estável, em vez de um aumento da sua atividade (Johnson, Mitchell et al. 2002). A biossíntese de PG a partir do âmnios, córion, decídua e miométrio aumenta após estimulação por citocinas inflamatórias, como interleucina (IL)-1 e fator de necrose tumoral- α (TNF α), sendo provável que este efeito ocorra através do aumento da expressão da COX-2. A concentração de PG pode ser aumentada por meio da inibição da sua inativação metabólica, uma vez que a enzima que regula o catabolismo das PG em metabolitos inativos, a 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase (PGDH), é mais abundante no córion, trofoblasto e, em menor grau, na decídua. A sua atividade pode evitar que as PG do líquido amniótico atuem no miométrio, diminuindo no trofoblasto do segmento inferior do útero no trabalho de parto a termo, contribuindo assim para a ativação do miométrio (Germain, Smith et al. 1994, Van Meir, Ramirez et al. 1997, Rauk and Chiao 2000, Bowen, Chamley et al. 2002). As PGE2 e F2 aumentam a atividade contráctil uterina, em associação com um aumento do cálcio livre intracelular, o qual parece ser devido, principalmente, a um influxo de cálcio extracelular. Em contraste com a ocitocina, as prostaglandinas não aumentam a produção de inositol 1,4,5-trifosfato no miométrio, nem libertam cálcio a partir dos reservatórios intracelulares (Thornton, Gillespie et al. 1992, Morrison, Dearn et al. 1996).

A endotelina-1 (ET-1) é um potente vasoconstritor capaz de contrair vários músculos lisos não vasculares, incluindo o miométrio humano *in vitro*, com a sua concentração no sangue materno aumentada durante a gravidez e atingindo um pico a termo. Recetores de endotelina A (ETA) e, numa proporção menor, recetores ETB foram identificados no miométrio, mas somente o receptor ETA está aumentado no miométrio da grávida. A ativação do receptor ETA miometrial gera dois mensageiros intracelulares: o inositol 1,4,5-trifosfato, que liberta o cálcio do retículo sarcoplasmático e o

diacilglicerol, que atua em conjunto com o cálcio livre para estimular a proteína cinase C (PKC) (Word, Kamm et al. 1990, Bacon, Morrison et al. 1995, Carbonne, Mignot et al. 1998, Eude, Paris et al. 2000, Honore, Robert et al. 2000).

O óxido nítrico é um gás reativo com uma semi-vida fisiológica muito curta. É sintetizado a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), da qual já foram identificadas três isoformas. É um mediador biológico fundamental, envolvido em várias atividades, tais como o relaxamento do músculo liso, a neurotransmissão, a inflamação e a regulação da resposta imune (Nathan, 1992). Também é conhecido por desempenhar um papel importante em vários aspectos da fisiologia da reprodução, incluindo a menstruação e concepção por meio dos seus efeitos na libertação da hormona lutinizante, na motilidade dos espermatozóides, na função ovárica e na implantação. Existem evidências de que o óxido nítrico está envolvido na regulação da contratilidade do miométrio durante a gravidez, dado que o sistema L-arginina-óxido nítrico foi identificado no miométrio, placenta e membranas fetais. A atividade da NOS no miométrio é regulada negativamente no terceiro trimestre, sugerindo um papel para o sistema L-arginina-óxido nítrico na manutenção da quiescência uterina durante a gravidez, mas estes dados não foram reproduzidos por outros autores de modo consistente. Foi demonstrado, *in vitro* e *in vivo*, que os fármacos que atuam por libertação de óxido nítrico podem induzir o relaxamento do miométrio. Quando aplicados ao miométrio *in vitro*, uma inibição da atividade espontânea e induzida pela ocitocina foi encontrada quando medidas a amplitude ou a força das contrações (Nathan 1992, Bansal, Goldsmith et al. 1997, Norman, Ward et al. 1997, Rosselli 1997, Chwalisz and Garfield 1998, Dennes, Slater et al. 1999, Norman, Thompson et al. 1999, Chwalisz and Garfield 2000, Ledingham, Thomson et al. 2000, Ledingham, Thomson et al. 2000).

Os leucócitos, predominantemente neutrófilos e macrófagos, infiltram-se no miométrio durante o trabalho de parto espontâneo a termo, e parece provável que este processo seja regulado por um aumento da expressão de moléculas de adesão celular. Os leucócitos infiltrantes são uma rica fonte de mediadores inflamatórios que incluem ativadores do plasminogénio, eicosanóides, colagenase, elastase e citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α). Uma vez que estes mediadores têm diversas funções, o infiltrado inflamatório pode ter diferentes papéis em diferentes regiões do útero. No segmento inferior, podem estar envolvidos na remodelação tecidual e, assim, facilitar a dilatação do colo do útero e a passagem do feto. No segmento superior, produtos de leucócitos, incluindo os eicosanóides, IL e TNF podem estimular as contrações uterinas, direta ou indiretamente, ao facilitar a produção de prostaglandinas uterotónicas (Nathan 1987, Casey, Cox et al. 1990, Osmers, Rath et al. 1992, Winkler, Fischer et al. 1998, Thomson, Telfer et al. 1999, Ledingham, Thomson et al. 2001, Young, Thomson et al. 2002).

Uma variedade de fatores desempenha um papel crucial no controlo da contratilidade do miométrio, incluindo o fluxo de sangue, os metabolitos do fósforo uterino, a hipóxia e o pH. A inibição metabólica/hipóxia exerce uma ação inibidora e profundamente rápida no miométrio humano mesmo na presença de ocitocina. É provável que os efeitos inibitórios da hipóxia controlem e limitem as contrações durante o trabalho de parto (Wray 1993, Morrison, Charnock-Jones et al. 1996, Monir-Bishty, Pierce et al. 2003).

O estiramento das células musculares lisas do miométrio também está envolvido no controlo da contratilidade do miométrio, tendo sido demonstrado que induz a despolarização da membrana celular, aumenta a frequência do potencial de ação e a subsequente contração (Manabe, Yoshimura et al. 1985, Coburn 1987).

1.2.2. O colo uterino

Durante a gravidez, o colo do útero tem de se manter firme e fechado para reter o feto dentro da cavidade uterina, mas com o início do amadurecimento é convertido numa estrutura suave e fácil de dilatar permitindo que as contrações uterinas expulsem o feto através do canal vaginal. A compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos na maturação cervical está longe de terminar. O interesse no processo tem como preocupação o desenvolvimento de agentes farmacológicos que amadureçam o colo facilitando a indução do trabalho de parto. Em contraste, a pesquisa sobre trabalho de parto pré-termo e estratégias terapêuticas para a sua prevenção concentram-se maioritariamente na abolição das contrações uterinas associadas, ignorando o colo do útero. No entanto, é claro que o processo de amadurecimento cervical é susceptível de começar antes do início da atividade miometrial, como no trabalho de parto normal a termo, ou pelo menos, simultaneamente. Assim, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no amadurecimento cervical pode conduzir a novas estratégias terapêuticas para a prevenção do parto pré-termo (Olah and Gee 1992).

O principal elemento do estroma cervical é a matriz extracelular do tecido conjuntivo, constituída por colagénio do tipo I (66%) e do tipo III (33%), com uma pequena quantidade de colagénio do tipo IV nas membranas basais. As fibras de colagénio estão unidas de forma densa conferindo ao colo do útero a rigidez que caracteriza a sua condição na mulher não-grávida e na gravidez precoce. Uma pequena quantidade de elastina também está presente, e enquanto o colagénio confere rigidez, a elastina pode ser responsável pela elasticidade. O colagénio é incorporado numa substância fundamental constituída por complexos de proteoglicanos de elevado

peso molecular contendo uma variedade de glicosaminoglicanos (GAGs), que são longas cadeias de dissacarídeos repetidos e carregados negativamente contendo uma hexosamina (glucosamina ou galactosamina) e um ácido urónico (glicurónico ou idurónico). No tecido cervical, os GAGs mais abundantes são o de condroitina e o do seu epímero, o sulfato de dermatano. O ácido hialurónico liga-se menos fortemente às moléculas GAGs e vai agir para destabilizar as fibras de colagénio, enquanto o sulfato dermatano, contendo ácido idurónico em oposição ao glicurónico, se liga fortemente e promove a estabilidade dos tecidos. Mudanças na relação GAGs/proteoglicanos podem alterar a ligação do colagénio e facilitar a sua degradação (Kleissl, van der Rest et al. 1978, Uldbjerg, Malmstrom et al. 1983).

Os principais componentes celulares do tecido conjuntivo cervical são os fibroblastos que parecem ser responsáveis pela síntese de colagénio e de substância fundamental. Embora a maior parte do colo do útero seja composto por tecido fibroso, também tem uma quantidade variável de músculo liso - normalmente cerca de 10% (podendo variar entre 2% e 40%), cujo papel funcional é controverso, embora seja capaz de contrações espontâneas e induzidas por drogas. No entanto, o tecido conjuntivo do colo do útero é mais importante do que o componente muscular (Nixon 1951, Hillier and Karim 1970).

Durante a gravidez, o colo do útero torna-se metabolicamente mais ativo. No estado não gravídico, o colo do útero é constituído por cerca de 80% de água que aumenta para cerca de 86% no final da gravidez. Esta água interage com as proteínas da matriz, facilitando a função da elastina. Uma vez que os GAGs são hidrofílicos, estas moléculas podem ser importantes no controlo da hidratação dos tecidos, com o aumento da hidratação a destabilizar as fibras de colagénio e a promover a maturação (Liggins 1978, Uldbjerg, Ekman et al. 1983, Leppert 1995).

Enquanto o RNAm da tropoelastina, o precursor de elastina, aumenta durante a gravidez, o conteúdo de elastina cervical não parece mudar ao longo da gestação. As células do músculo liso do colo do útero tornam-se alargadas e proeminentes durante a gravidez e podem desempenhar um papel na reorganização tecidual, já que feixes de colagénio estão alinhados em estreita aproximação com os feixes de músculo liso. O conteúdo de colagénio no colo do útero, tanto do tipo I como do tipo III, passa por mudanças marcantes na gravidez. A sua concentração é reduzida em 30-50% em comparação com o colo do útero não grávido, porque os outros componentes do colo do útero, a água e as proteínas não-colagénio, aumentam em quantidades relativamente maiores, e as fibras de colagénio são reduzidas em tamanho. Os mecanismos propostos para explicar essas mudanças na composição do colagénio, incluem o aumento da degradação enzimática de colagénio e/ou a alteração na relação de GAGs/proteoglicanos da substância fundamental. O colagénio é passível de degradação por acção de enzimas líticas, que incluem as colagenases (metaloproteinases da matriz MMP-1, MMP-8 e MMP-13), que são produzidas pelos fibroblastos e leucócitos, e a elastase, produzida por macrófagos, neutrófilos e eosinófilos. A colagenase é segregada numa forma latente, a pro-colagenase, a qual é ativada pela clivagem da pró-enzima pela plasmina ou estromelisina (MMP-3). As células envolvidas na degradação do colagénio durante a dilatação do colo do útero não serão os fibroblastos cervicais, mas sim os neutrófilos que migram a partir de vasos sanguíneos. Os neutrófilos secretam tanto a elastase como a colagenase (MMP-8), sendo que a primeira pode degradar não só a elastina e o colagénio, mas também os proteoglicanos, e pode atuar em sinergia com a colagenase sobre o colagénio. À medida que o conteúdo de colagénio cervical diminui durante a gravidez, a atividade da elastase e da colagenase aumenta. Além do aumento da degradação do colagénio, há mudanças no

conteúdo de proteoglicanos e GAGs cervical com o avanço da gravidez, com o teor total de GAGs aumentando substancialmente a termo (o que indica síntese ativa), embora as concentrações de GAGs permanecerem relativamente constantes (Danforth, Buckingham et al. 1960, Golichowski, King et al. 1980, Uldbjerg, Ekman et al. 1983, Kokenyesi and Woessner 1990, Jeffrey 1991, Osmer, Rath et al. 1992).

A concentração de ácido hialurônico aumenta cerca de 12 vezes aos 2-3 cm de dilatação, o que pode ajudar os GAGs a 'afrouxar' a rede de colagénio do colo do útero, enquanto o aumento do ácido hialurônico disponível para se ligar a água pode estar associada com o aumento da hidratação e deformabilidade dos tecidos. Há uma diminuição relativa da condroitina e do sulfato de dermatano que resulta na redução da resistência mecânica das fibras de colagénio tornando-as mais propícias à quebra por enzimas proteolíticas. O aumento no total de GAGs provavelmente reflete um aumento da produção pelos fibroblastos, que se tornam cada vez mais ativos com o avanço da gravidez. Além disso, pode refletir a degradação dos complexos de proteoglicanos para fornecer ácido hialurônico livre e proteoglicanos. As proteases necessárias para isso poderiam vir dos fibroblastos ativados ou dos leucócitos que se infiltram no tecido conjuntivo cervical (Ellwood 1980, Junqueira, Zugaib et al. 1980).

O fenómeno do amadurecimento cervical é um prelúdio para o início do trabalho de parto e é mais evidente durante as últimas cinco ou seis semanas de gravidez, embora possa ter origem mais cedo. Clinicamente, refere-se ao aumento do amolecimento, distensibilidade, apagamento e dilatação que pode ser detectado pelo exame pélvico. Essas mudanças são o resultado de alterações nas propriedades biomecânicas do tecido do colo do útero que incluem a redução da concentração de colagénio, o aumento no teor de água e alteração na relação GAGs/proteoglicanos. Uma mudança

importante é o re-arranjo e re-alinhamento de colagénio, já que o tecido conjuntivo cervical no termo mostra fibras muito dispersas e dissociadas de colagénio, bem como um marcado aumento na substância base. Este processo de amadurecimento cervical tem sido comparado a uma reação inflamatória dada a demonstração, em condições experimentais e durante o parto a termo, da infiltração de tecido cervical com células inflamatórias (Junqueira, Zugaib et al. 1980, Rath, Adelman-Grill et al. 1988, Calder and Greer 1992, Leppert 1995, Bokstrom, Brannstrom et al. 1997, Osman, Young et al. 2003).

O amadurecimento do colo do útero parece ser um processo ativo, sendo que os fatores que o controlam, e que podem estar implicados na fisiopatologia do trabalho de parto pré-termo, não são completamente compreendidos.

As principais PG produzidas pelo colo são a PGE₂, a PGI₂, e em menor grau a PGF₂, que certamente desempenham um papel no controle do amadurecimento cervical. Fisiologicamente, a PGE₂ é provavelmente muito mais importante do que PGF₂, enquanto o papel de PGI₂ é bastante incerto. Não há dúvida de que as PG naturais e sintéticas são agentes farmacológicos eficazes para o amadurecimento do colo do útero em qualquer fase da gravidez, induzindo a degradação do colagénio ou, alternativamente, modificando a ligação do colagénio, a hidratação dos tecidos ou alterando a relação GAGs/proteoglicanos. Atuam na modificação da substância fundamental do tecido do colo do útero, com o aumento da hidratação e da concentração de ácido hialurónico demonstrada em animais, após a administração de PGE₂. A PGE₂ pode influenciar a produção pelos fibroblastos cervicais de colagénio e GAGs, de tal modo que um aumento na produção destes últimos ocorre quando a síntese de colagénio é reduzida. Assim, o amadurecimento cervical mediado pela PGE₂ pode ser explicado por uma modificação

na relação GAGs/proteoglicanos que se dispersam e destabilizam as fibras de colagénio, aumentando assim a compliance do tecido (Uldbjerg, Ulmsten et al. 1983, Norstrom 1984, Norstrom, Bryman et al. 1985, Cabrol, Dubois et al. 1987, Calder and Greer 1991).

Estrogénios como o estradiol podem ser usados para o amadurecimento do colo do útero, com o mecanismo subjacente a ser devido, em parte, à indução da síntese de PG nos tecidos ou ao influxo de leucócitos produtores de proteases que poderiam induzir o amadurecimento. Uma revisão sistemática sobre a eficácia e a segurança dos estrogénios no terceiro trimestre para amadurecimento cervical e indução do trabalho de parto concluiu não haver dados suficientes para tirar conclusões sobre a sua eficácia como agente de indução (Gordon and Calder 1977, Allen, Uldbjerg et al. 1989, Calder and Greer 1992, Magann, Perry et al. 1995, Thomas, Kelly et al. 2001).

A progesterona inibe os efeitos da colagenase no corpo uterino e pode ter um papel similar no cérvix. Ela tem um efeito inibitório sobre o amadurecimento cervical e o parto, é um agente anti-inflamatório potente, e ainda pode ser um importante inibidor fisiológico da maturação *in vivo* ao inibir o influxo de neutrófilos e sua ativação (Jeffrey, Coffey et al. 1971, Koob, Jeffrey et al. 1980).

Existe uma evidência clara demonstrando que a relaxina desempenha um papel importante no processo de amadurecimento cervical. Ela aumenta a atividade da colagenase, provavelmente através de um efeito mitogénico sobre os fibroblastos, que são conhecidos por exibirem recetores para a relaxina. O aumento das concentrações de relaxina na circulação materna está associado ao trabalho de parto pré-termo, talvez através da alteração do tecido conjuntivo cervical (Petersen, Skajaa et al. 1992).

O amadurecimento do colo do útero é considerado um processo inflamatório fisiológico, caracterizado por uma acumulação de neutrófilos e macrófagos no estroma do colo do útero, com desagregação e remodelação do tecido cervical através da libertação de MMP, PG, moléculas de adesão celular e de óxido nítrico. Os leucócitos e outros tipos de células cervicais libertam citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1, IL-6 e IL-8, que também podem contribuir para este processo, e não menos importante, promovendo ainda mais a invasão de leucócitos. A IL-8 é uma citocina inflamatória capaz de produzir a quimiotaxia dos neutrófilos e a ativação seletiva, que pode ter uma interação sinérgica com a PGE2 na promoção de amadurecimento cervical. O aumento da sua produção está correlacionado com o aumento da infiltração de leucócitos e das concentrações de MMPs no tecido. Outras citocinas, incluindo a IL-1 β e o TNF- α afetam a produção de MMPs e de inibidores de metaloproteinases tecidulares (TIMPs) por fibroblastos cervicais e células de músculo liso. Podem também ocorrer elevação de citocinas que estimulam a proliferação e ativação de células do sistema imunológico (Junqueira, Zugaib et al. 1980, Baggiolini, Walz et al. 1989, Ito, Sato et al. 1990, Osmer, Blaser et al. 1995, Bokstrom, Brannstrom et al. 1997, Ledingham, Denison et al. 1999, Thomson, Telfer et al. 1999, Winkler and Rath 1999, Denison, Riley et al. 2000, Sennstrom, Ekman et al. 2000, Ledingham, Thomson et al. 2001, Young, Thomson et al. 2002, Osman, Young et al. 2003).

O óxido nítrico pode também desempenhar um papel no amadurecimento cervical. Agindo em conjunto com as PG, particularmente a PGE2, pode induzir vasodilatação local, aumentar a permeabilidade vascular e infiltração leucocitária, podendo também ativar as MMPs e outros mecanismos responsáveis pela remodelação da matriz extracelular. O nível de metabólitos do óxido nítrico aumenta no fluido cervical após o seu amadurecimento

ou manipulação (Ledingham, Denison et al. 1999, Yoshida, Sagawa et al. 2001, Ekerhovd, Weijdegard et al. 2002). Se a função do óxido nítrico a nível do miométrio se centra nas suas propriedades como relaxante muscular, a nível cervical é preponderante a sua ação biológica na inflamação, o que é, aparentemente contraditório no que diz respeito ao seu papel global no desencadear e curso do trabalho de parto.

Por o amadurecimento cervical ocorrer espontaneamente de uma maneira atempada e específica, a apoptose (morte celular programada), pode também estar envolvida. A apoptose das células do estroma cervical (caraterizado pela contração das células, compactação da cromatina em feixes uniformemente densos e núcleos halo claro), pode participar na remodelação do colo durante a gravidez e contribuir para as alterações verificadas aquando do parto (Leppert 1995, Allaire, D'Andrea et al. 2001).

1.2.3. As membranas fetais

A rotura das membranas fetais é uma parte vital do trabalho de parto normal. Durante o parto espontâneo a termo, as membranas permanecem intactas até depois do início do trabalho de parto em 90% das mulheres. Em apenas 10% rompem prematuramente antes do início do trabalho de parto - rotura prematura das membranas (RPM). No trabalho de parto prematuro, a rotura prematura das membranas fetais antes do início do trabalho de parto (RPMPT) varia de forma inversa à idade gestacional (Caughey, Robinson et al. 2008).

A resistência à tração das membranas fetais deve-se em grande parte às fibras de colagénio que contribuem para sua composição. Antes do início do trabalho de parto a termo, as membranas enfraquecem numa área

que se sobrepõe ao colo conhecida como a zona de morfologia alterada (ZMA). Coincidentemente, a expressão de MMPs aumenta e, juntos, enfraquecem as membranas fetais levando à rotura. A variedade de MMPs implicadas na RPMPT é distinta das implicadas na rotura de membranas a termo, podendo a sua ativação ser o 'gatilho' da via final comum através da qual a infeção pode levar a RPMPT. Uma vez que os eventos moleculares e bioquímicos que desencadeiam os mecanismos na origem da RPMPT diferem daqueles envolvidos no parto pré-termo espontâneo (PPT), diferentes estratégias farmacoterapêuticas podem ser necessárias para prevenir ou tratar estas condições.

Existem três componentes principais das membranas fetais, o âmnios, o córion e a decídua. O âmnios é composto por uma única camada de epitélio cúbico sobre uma membrana basal, que se encontra sob uma compacta camada de fibroblastos de tecido conjuntivo. Estas camadas são espelhadas no córion, com uma camada de tecido conjuntivo composto de células reticulares, uma membrana pseudobasal e um epitélio de múltiplas camadas de células de citotrofoblasto. Imediatamente a seguir, localiza-se a camada decidual. Há uma reserva considerável na resistência à tração das membranas fetais durante a gravidez normal, sendo a principal gerada pela matriz extracelular do tecido conjuntivo, principalmente o colagénio dos tipos I e III, mais densos e mais organizados na camada compacta do que na camada de fibroblastos do âmnios ou na camada reticular do córion (Malak, Ockleford et al. 1993). O colagénio do tipo VI estabiliza a rede de colagénios I e III por agregação à membrana basal, ao estroma do colagénio tipo IV e à laminina a. Um outro componente estrutural importante da matriz extracelular é a fibronectina - aliás, a identificação de fibronectina fetal no colo do útero e na vagina é um marcador de parto pré-termo (Goldenberg, Mercer et al. 1996).

Os eventos morfológicos associados à RPM têm sido bem descritos - esta surge na ZMA, caracterizada por desgaste marcado da camada do citotrofoblasto (com perda associada de células) e da decídua, com edema dos componentes do tecido conjuntivo e um aumento no número total de células da camada reticular, particularmente os miofibroblastos (Bell and Malak 1994). Também se observa uma redução nos elementos necessários para marcar a integridade estrutural das células individuais e uma redução nos contactos intercelulares, que levam ao maior enfraquecimento desta zona. O âmnios e córion separaram-se, as fibras de colagénio são interrompidas e desorganizadas e a sua densidade é reduzida (particularmente os tipos I, III e V). A osteonectina, uma proteína envolvida na regulação do volume de renovação da matriz extracelular, é expressa numa proporção crescente de células e as características morfológicas da ZMA podem ser identificadas antes do início do trabalho de parto, numa área de membranas fetais que recobrem o colo do útero. O crescimento das membranas fetais não acompanha o aumento do volume uterino, de modo que estas ficam cada vez mais sob tensão à medida que a gravidez avança. Com o desenvolvimento da ZMA, que produz um enfraquecimento local de membranas fetais, a RPM eventualmente ocorre, pouco antes ou durante o trabalho de parto (McLaren, Malak et al. 1999, Millar, Stollberg et al. 2000, McParland, Bell et al. 2001).

Dado o colagénio fornecer a principal resistência à tracção das membranas fetais, não é de surpreender que a RPM esteja associada a um aumento da expressão e atividade de MMPs e a uma diminuição na expressão e atividade de inibidores tecidulares de metilproteinase (TIMP). A análise do córion-decídua em vários pontos temporais ao longo de um trabalho de parto a termo mostrou um aumento na expressão de MMP-1 antes do início do trabalho de parto, o aumento da expressão de MMP-3 e MMP-9 durante o

trabalho de parto e aumento de TIMP-1 no pós-parto. As concentrações de MMP-3 no líquido amniótico aumentam no trabalho de parto a termo e pré-termo, mas não na rotura espontânea de membranas. Em contraste, um aumento da atividade e expressão de MMP-9 no líquido amniótico ocorre em associação com a rotura de membranas a termo. Dados de imuno-histoquímica sugerem que a MMP-9 é produzida nas células epiteliais do âmnios e nas células do córion. O envolvimento das MMPs na rotura de membranas é ainda reforçada pelo aumento local da atividade e concentração de MMP-9 na região cervical das membranas fetais antes do parto - ou seja, a área da ZMA onde a rotura de membranas ocorre (Bryant-Greenwood and Yamamoto 1995, Maymon, Romero et al. 2000, McLaren, Taylor et al. 2000, Xu, Al-faidy et al. 2002, Park, Chaiworapongsa et al. 2003). A MMP-9 pode ser estimulada pela PGE2 e F2 em membranas fetais *in vitro*, sendo de notar que esta última também estimula a expressão de MMP-2 e inibe a produção de TIMP-1 na decídua. Também a presença de IL-1 leva ao aumento da biosíntese de MMP-1, 8 e 13 em células coriônicas humanas cultivadas *in vitro*. Uma vez que a COX-2 e a IL-1 aumentam nas membranas fetais no início do trabalho de parto, o aumento da atividade das MMP no termo é provavelmente estimulado, pelo menos em parte, por um aumento das PG endógenas e IL-1 (Katsura 1989, Slater, Dennes et al. 1999, McLaren, Taylor et al. 2000, Ulug, Goldman et al. 2001, Osman, Young et al. 2003).

Alterações semelhantes às que ocorrem na ZMA também ocorrem na RPMPT, mas não no trabalho de parto prematuro na ausência de rotura de membranas (Malak, Mulholland et al. 1994). Um aumento na atividade das MMP-1, 8 e 9 e da expressão de MMP-2 na membrana fetal foi demonstrado em associação com RPMPT. Além disso, na presença de infecção intra-uterina há elevação da MMP-7. Especificamente, as membranas na RPMPT têm maior quantidade de MMP-2, 9 e MMP membrana tipo 1 (MT-1) e diminuição da

expressão do transcrito (RNAm) de TIMP-2, em comparação com as membranas fetais de mulheres em trabalho de parto prematuro sem RPMPT. Existem várias vias possíveis para a elevação das MMPs e posteriormente para a RPMPT. MMP-7 e MMP-8 derivados de macrófagos e neutrófilos, respectivamente, podem ser estimulados por lipopolissacarídeos e citocinas pró-inflamatórias presentes na cavidade uterina em associação com infecção. Da mesma forma, o $TNF\alpha$, que está elevado na infecção intra-amniótica, pode estimular a produção de MMP-1 coriônica (So, Ito et al. 1992, Fortunato, Menon et al. 2000, Maymon, Romero et al. 2000, Maymon, Romero et al. 2000, Fortunato and Menon 2001).

A apoptose pode também ter um papel importante, já que a sua ativação ocorre nas células das membranas fetais durante a RPMPT, mas não durante o trabalho de parto a termo ou pré-termo. A produção de MMP-2 na matriz é estimulada pela p53 (uma proteína supressora tumoral envolvida no mecanismo da morte celular programada), promovendo uma via através da qual a apoptose pode estimular a RPMPT (Bian and Sun 1997, Fortunato, Menon et al. 2000).

1.3. Fatores de risco para parto pré-termo espontâneo

Há inúmeros fatores de risco associados a PPT espontâneo, os quais estão altamente dependentes uns dos outros, sendo isto particularmente verdade para as variáveis sociodemográficas.

Doenças maternas, antecedentes de PPT, RPMPT, abortamentos, curto intervalo inter-gestacional, primiparidade, baixo peso e baixo índice de massa corporal (IMC) materno são condições associadas a risco aumentado de PPT (Lynch, Hart et al. 2014).

Um PPT anterior é o fator de risco mais significativo para um subsequente e o seu risco aumenta com o número de PPTs anteriores. Por outro lado, quanto mais cedo tiver sido o PPT anterior, maior será o risco de precocidade no subsequente. O risco de recorrência no caso de uma RPMPT anterior varia entre os 34-44%. A existência de abortamentos anteriores é controverso, existindo estudos a favor do aumento de risco de PPT e outros contra. O risco de PPT é tanto maior quanto menor for o intervalo inter-gestacional, sendo de 30-90% para PPT abaixo das 32 semanas num intervalo inferior a 6 meses quando comparado com mais de 12 meses.

Infeções locais, regionais ou sistémicas podem levar à ocorrência de um PPT (Vouga, Greub et al. 2014).

Os extremos da idade materna, o baixo apoio social, o poder socio-económico diminuto, o abuso de substâncias (álcool, tabaco, drogas), a poluição ambiental e a atividade física demasiado intensa são fatores também relacionados com o aumento de risco para PPT (Hackenhaar, Albernaz et al. 2014).

Se alguns factores se poderão relacionar com mecanismos infecciosos/inflamatórios, outros terão uma predisposição genética, relacionada ou não com a infeção/inflamação em causa.

1.3.1. O papel da infeção/inflamação no parto pré-termo espontâneo com e sem rotura prematura de membranas

A infeção intra-amniótica tem sido considerada como uma causa maior de PPT, levando a mais de 50% de RN com muito baixo peso nascidos antes das 30 semanas e contribuindo para um maior número de mortes neonatais (NN). A corioamniotite pode ser aguda ou crónica dependendo de

fatores de virulência específicos, do tamanho do inoculado microbiano e dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Assim, o aparecimento e a gravidade da apresentação clínica podem variar muito (Gravett, Thomas et al. 2007).

Evidências cumulativas indicam que a infecção sub-clínica está na patogênese do trabalho de parto pré-termo espontâneo, com cerca de 30-40% destes associados a um processo infeccioso subjacente. Esta evidência vem de estudos caso-controle e de coorte relacionando a colonização microbiana cervico-vaginal em mulheres com trabalho de parto pré-termo, com a maior taxa de corioamnionite histológica encontrada após o parto pré-termo espontâneo. Além disso, em culturas bacteriológicas de líquido amniótico destas mulheres, foram encontrados organismos microbianos em 10-15% dos casos (Naeye and Peters 1980, Guzick and Winn 1985, Gomez, Romero et al. 1997).

As infecções genitais ascendentes representam um fator de risco importante para PPT e RPMPT. Elas ocorrem se bactérias patogênicas ultrapassam a barreira do colo uterino, causando inflamação, corioamnionite e infecção do líquido amniótico. A presença de bactérias induz a libertação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos, âmnios, decídua e miométrio, as quais, juntamente com as endotoxinas libertadas pelas bactérias gram-negativas induzem a produção de PG e endotelina na decídua, células coriônicas e amnióticas, que provocam contrações uterinas. A IL1 e o TNF α induzem a libertação de IL6 pela decídua e células coriônicas, a qual aumenta a secreção de PG e endotelina, levando também a libertação de MMPs pelas células coriônicas e cervicais, que induzem a degradação da matriz extracelular do segmento inferior uterino e pode suportar a resposta inflamatória crônica. A consistência do tecido é reduzida, o colo amadurece e dilata. A IL1 conduz à libertação de IL8 que leva à ativação e recrutamento de granulócitos, os quais libertam elastase em altas concentrações e contri-

bui para a redução da matriz extracelular (Bennett, Rose et al. 1987, Romero, Hobbins et al. 1988, Holst and Garnier 2008). Os microorganismos que têm as associações mais fortes com PPT são a *Gardnerella vaginalis*, o *Ureaplasma urealyticum*, a *Chlamydia trachomatis* e a *Neisseria gonorrhoeae*. Outros agentes infecciosos, tais como o *Streptococcus* do grupo B, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Haemophilus influenzae* e *Mycoplasma hominis*, também têm sido implicados.

Muitos estudos acerca da utilização de antibióticos para a prevenção do parto prematuro em mulheres assintomáticas tiveram resultados decepcionantes. A evidência atual não apoia o rastreio e tratamento de todas as grávidas para vaginose bacteriana de forma a evitar o PPT. Para aquelas com história de um PPT anterior há alguma evidência que a detecção e tratamento destas infecções pode prevenir um outro PPT em algumas dessas mulheres. O estudo ORACLE, que investigou o papel dos antibióticos em grávidas com PPT espontâneo, concluiu que os antibióticos não devem ser prescritos nestas mulheres por rotina, quando não há evidência clínica de infecção ou RPMPT (Kenyon, Taylor et al. 2001, Kenyon, Taylor et al. 2001).

Existem dados que têm demonstrado uma associação significativa entre infecções, não só locais, como loco-regionais, à distância e mesmo sistêmicas com PPT. Disto são exemplos a infecção periodontal e as infecções do trato urinário, cujo tratamento antibiótico foi associada a uma redução na incidência de parto pré-termo (Jeffcoat, Geurs et al. 2001, Smaill 2001).

Um mecanismo plausível para estas infecções causarem PPT com ou sem RPMPT é o de que os produtos bacterianos contêm proteases e colagenases, as quais degradam as membranas, e fosfolipase A2 e endotoxinas, conhecidas por estimularem a produção de prostaglandinas *in vivo* e *in vitro*. Por outro lado, a resposta inflamatória do hospedeiro à infecção leva à

libertação de citocinas inflamatórias que estão envolvidas nas alterações cervicais do PPT e possivelmente na RPMPT.

1.3.2. A predisposição genética para a infecção/inflamação no parto pré-termo

Há vários anos que tem vindo a ser discutida a existência de uma predisposição genética para a infecção, com evidência crescente de ser um potencial fator causal de PPT. Observou-se que grávidas nascidas prematuramente têm maior risco de ter um parto prematuro; os partos prematuros têm tendência a ser recorrentes; a concordância em gémeos é de 17-36% e 2-4x superior aos controlos. Têm sido estudados, exaustivamente, vários polimorfismos (SNP) em genes candidatos, possivelmente envolvidos na patogénese do parto pré-termo. As variações genéticas localizadas em genes reguladores da resposta imune materna, potencialmente causadores de uma resposta imune inadequada a estímulos infecciosos, têm sido alvo de particular interesse (Holst and Garnier 2008).

Citocinas pró-inflamatórias, como o $TNF\alpha$, são libertadas por células imunocompetentes após o contacto com metabolitos de origem bacteriana e atuam como mediadores da resposta imunológica no hospedeiro. A libertação de $TNF\alpha$ pelos monócitos apresenta uma variedade inter-individual significativa, possivelmente devido a SNPs com efeitos funcionais relevantes que foram identificados na região promotora do gene $TNF\alpha$. Um SNP específico na posição -308 na sequência de nucleótidos é referido como "alelo $TNF2$ " e está associado a um aumento na produção de $TNF\alpha$ em resposta ao estímulo. Mulheres não grávidas com história médica de corioamniotite ou PPT produzem mais $TNF\alpha$ após estímulo com lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos do que mulheres com história de partos a termo (Amory, Hitti et al.

2001). A presença do alelo TNF2 resulta num risco 3x superior (OR 3,18; IC 95% 1,33-7,83) de RPMPT (Roberts, Monzon-Bordonaba et al. 1999). Além disso, as portadoras do alelo TNF2, na presença de vaginose bacteriana, têm um risco ainda mais elevado (OR 6,1; IC 95% 1,9-21,0) de PPT (Macconnes, Parry et al. 2004).

A teoria da interação gene-ambiente é favorecida pelo aumento significativo do risco de PPT na presença dos 2 fatores de risco (alelo TNF2 e vaginose), sugerindo um efeito sinérgico. Foram também relatados aumentos na concentração de TNF α do líquido amniótico em mulheres com PPT quando comparado com partos a termo (Holst and Garnier 2008).

Resultados semelhantes foram obtidos para outras citocinas pró-inflamatórias como a IL1 β , a IL6 e o antagonista do receptor IL1. Neste, um aumento significativo do risco de PPT foi confirmado para SNPs que estão associados a uma resposta imunológica exagerada. Em contraste, foi descrito um SNP (-174C/C) no gene *IL6*, que origina uma resposta imune reduzida, associado a diminuição da IL6, com efeito protetor e diminuição do risco de PPT (Holst and Garnier 2008).

Os recetores toll-like (TLR) estão envolvidos na resposta imune a bactérias e têm uma grande homologia com o recetor IL1, tendo sido descrito um aumento na frequência de 2 SNPs no *TLR4* associado a casos de PPT. Outros autores identificaram uma variação no alelo -656 T do gene *SERPINH1*, a qual causa uma diminuição significativa da atividade do promotor em fibroblastos do âmnios e está associada a um aumento significativo do risco de RPMPT (Lorenz, Hallman et al. 2002, Wang, Parry et al. 2006, Holst and Garnier 2008).

A interpretação dos resultados dos testes laboratoriais de rotina não exclui uma infeção/inflamação, sendo muitas vezes discordantes ou a sua interpretação baseada em *cutt-offs* não validados e que, frequentemente

levam a extração fetal sem confirmação relevante da inflamação. A ciência da proteômica aplica-se à pesquisa de biomarcadores e elaboração de perfis proteicos que possam ajudar a realizar uma previsão rápida, no sentido de concretizar o diagnóstico precoce e aplicar tratamentos mais céleres em doenças humanas. Num estudo relativamente recente de proteômica, que envolveu a análise do líquido amniótico para detetar inflamação, infecção e sépsis neonatal, verificou-se uma associação entre um *score* elevado (numa classificação de 4 graus crescentes de inflamação, em que o 1 representava a sua ausência e o 4 inflamação grave) e PPT, corioamniotite histológica e sépsis neonatal precoce (Buhimschi CS 2007). Na perspetiva fisiopatológica, de entre os biomarcadores identificados, a defensina e a calgranulina têm um interesse particular, dado serem proteínas antimicrobianas e anti-inflamatórias libertadas após a ativação de neutrófilos. Neste estudo, o gradiente obtido sugere que a fase inicial da resposta inflamatória intra-amniótica se caracteriza pelo aparecimento de defensinas, apesar da contagem de neutrófilos não refletir necessariamente a resposta funcional. A contagem de leucócitos média no grupo de grávidas com inflamação mínima é extremamente baixa, pelo que nenhuma intervenção pode ser recomendada com base em tais valores. Muitas mulheres com inflamação grave apresentam uma resposta inflamatória completa, mas ainda com contagem de leucócitos normal. Nas características clínicas dos partos pré-termo com e sem RPMPT, registaram-se diferenças significativas na idade das grávidas (29 vs 25 anos; $p=0,02$), na paridade (1vs0; $p=0,01$) e na IG ao parto (29,8 vs 26,2 semanas; $p<0,001$), não tendo sido verificadas diferenças nas taxas de cesarianas, peso dos RN e índice de APGAR. As mulheres com RPMPT revelaram, no líquido amniótico, níveis mais baixos de glicose e valores mais elevados de leucócitos, hemoglobina, culturas positivas para *Ureaplasma* e *Streptococcus* do grupo B, MMP-8 e *score* positivo para alguns marcadores,

como defensina 1 e 2 e calgranulina A ou C. O *score* estudado por estes autores demonstrou uma especificidade de 92,4%, o mais elevado quando comparado com outros marcadores (glicose, LDH, culturas positivas, IL6 e MMP8), bem como a associação mais forte com inflamação. Uma leucocitose >38cel/mm³ está associada a um *score* elevado, tornando este último mais preciso na identificação de inflamação intra-amniótica. No entanto, é menos específico para infecção (cultura positiva) - 85,6%. A interpretação desta classificação não é dicotômica, mas sim relacionada com um gradiente progressivo, desde ausência de doença, até inflamação mínima e grave. Um *score* baixo identifica a defensina 2, um intermédio identifica as defensinas 1 e 2, e um elevado identifica as defensinas 1 e 2 e a calgranulina (Buhimschi, Christner et al. 2005, Buhimschi, Bhandari et al. 2007, Buhimschi CS 2007, Buhimschi, Rosenberg et al. 2008, Buhimschi, Zhao et al. 2008, Buhimschi, Dulay et al. 2009).

Num outro estudo, os autores verificaram que a inflamação intra-amniótica estava associada a PPT em IG mais baixas, com RN de pesos mais baixos, partos em menos de 7 dias após o diagnóstico e invasão microbiana do líquido amniótico. Nas RPMPT, apenas 4 proteínas apresentavam diferenças na sua expressão, incluindo a defensina 1 e a calgranulina A e C. As mesmas proteínas foram identificadas no fluído cervical, mas sem diferenças significativas, o que foi decepcionante, pois seria um biomarcador ótimo, dado tratar-se de um método não invasivo (Ruetschi, Rosen et al. 2005). Num outro estudo de proteómica para identificação de um perfil de proteínas alteradas nos PPT, as RPMPT ocorreram maioritariamente no grupo da inflamação, com tempos de latência menores e piores resultados neonatais. O perfil associado a PPT sem inflamação traduziu-se em aumento da IGFBP1 (insulin growth factor binding protein 1), da APO AI e IV, da lumicana e da

bikunina, e na diminuição da $\alpha 1$ antitripsina e $\alpha 2$ antiplasmina (Buhimschi, Zhao et al. 2008).

1.3.3. A defensina

Os mamíferos vivem num ambiente repleto de microorganismos patogénicos, e se a sua barreira epitelial for quebrada por algum tipo de dano, os agentes patogénicos invadem o hospedeiro sendo inicialmente eliminados pelo sistema imune inato e de seguida pelo adaptativo. O sistema imune inato incorpora respostas primitivas mais rápidas à infeção que o adaptativo, de que são exemplos as defesas de superfície, a produção de citocinas, a ativação do complemento e de respostas fagocitárias. Os peptídeos antimicrobianos naturais (PAM) e os TLR são mediadores chave deste sistema. Os PAM são libertados nas superfícies epiteliais e provocam a disrupção da membrana de muitos microorganismos. Os TLR, nas mucosas, reconhecem uma variedade de padrões moleculares microbianos e geram sinais intracelulares através do fator nuclear KB (Horne, Stock et al. 2008).

A resposta imune adaptativa é ativada por elementos celulares especializados do sistema imune inato e consiste em células pré-existentes de Langerhans na pele e células dendríticas imaturas, as quais podem fagocitar proteínas microbianas e processá-las em pequenos fragmentos peptídicos exportados para a superfície da célula juntamente com proteínas do complexo major de histocompatibilidade (CMH). O complexo CMH/epítomos é apresentado pelas células dendríticas maduras às células T nos nódulos linfáticos, onde os complexos CMH-antigénio classe I ativam preferencialmente células citotóxicas CD8, enquanto os complexos classe II ativam células T CD4 helper, as quais produzem citocinas imunoativadas que promovem a proliferação de células B adaptativas e a produção de anticorpos. Outras ci-

tocinas produzidas pelas células T, por sua vez, ativam macrófagos e neutrófilos, assim como células *natural killer* (NK), resultando num feedback positivo sobre as defesas imunes inatas (Yang and Oppenheim 2004).

Os PAMs como as defensinas, a catelicidina, a histatina, a catepsina G, a azurocidina, a lactoferrina e outros, estão amplamente distribuídas no corpo humano, são produzidos por leucócitos e células epiteliais na interface ambiental dos tratos gastrointestinal, genito-urinário, traqueo-brônquico e pele. Muitos destes PAMs estão presentes de forma constitutiva nas células e armazenados em grânulos secretórios, outros são induzidos por estímulos pró-inflamatórios. Têm a particularidade de exibir grandes porções catiónicas na sua superfície molecular o que lhes permite despolarizar e/ou penetrar as membranas celulares das bactérias. Contudo, a atividade antibacteriana e antifúngica dos PAMs é inibida pela concentração salina do soro, o que faz com que sejam inativos na circulação sanguínea. Consequentemente, a sua atividade microbicida é exercida em vacúolos fagocitários e na superfície externa da pele e mucosa. Há também PAMs com atividade antiviral potente (Yang and Oppenheim 2004).

Variações genéticas que afetem a eficiência na capacidade de resposta de imunidade inata podem explicar variações individuais na reação do organismo humano à infecção. Uma resposta imune inata sub-ótima pode resultar num ambiente permissivo para a colonização patogénica, enquanto uma resposta exagerada pode levar a inflamação excessiva e destruição tecidual. A modulação da resposta do hospedeiro à infecção é uma alternativa interessante ou pode ser encarada como uma abordagem adjuvante às terapêuticas antibióticas (Horne, Stock et al. 2008).

A imunidade inata providencia ao organismo uma primeira linha de defesa contra microorganismos patogénicos. É uma resposta não-clonal, não específica e sempre presente. Entre as células que constituem o arsenal

de imunidade inata encontram-se as células fagocitárias circulantes (neutrófilos e macrófagos) juntamente com as células do epitélio das mucosas, que em comum têm a produção de PAMs, que nas células fagocitárias atuam como participantes na via microbicida independente de oxigênio, enquanto se presume que, nas células epiteliais, sejam secretadas para o ambiente extracelular de forma a providenciarem atividade microbicida. Em ambos os casos, os genes que codificam estes peptídeos podem ser expressos de forma constitutiva ou induzidos por mediadores inflamatórios e bactérias.

O sistema imune inato do aparelho reprodutor feminino é único na adaptação e facilitação de funções fisiológicas especializadas, que incluem a menstruação, a fertilização, a implantação, a gravidez e o parto, enquanto eliminam patógenos transmitidos sexualmente ou mesmo ambientais. A competência deste sistema tem uma importância crítica na prevenção da invasão microbiana. As defensinas humanas β hBD 1-4 e a defensina α hBD5 foram encontradas no epitélio endometrial. As hBD 1, 3 e 5 são expressas em quantidades elevadas na fase secretora, enquanto a hBD 2 aumenta durante o período menstrual e a hBD4 na fase proliferativa. Estas diferenças podem estar relacionadas com as diferentes atividades anti-microbianas dos diferentes membros da família das defensinas. Durante a gravidez, as hBD 1-3 são expressas no útero, âmnios, decídua, córion e trofoblasto placentar, o que sugere o seu envolvimento na resposta do sistema imune inato e atuação na prevenção da infecção uterina, existindo evidência que a expressão dos antimicrobianos naturais está alterada, por exemplo, no PPT (Horne, Stock et al. 2008).

O nome defensina deriva do latim *Defendo*, que significa "Repelir", em referência às suas propriedades contra microorganismos patogênicos. As defensinas são peptídeos catiónicos com 20-40 aminoácidos de comprimento, contendo 6 cisteínas, que formam 3 ligações intramoleculares dissulfídi-

cas. São classificadas em α , β ou θ , com base nas posições relativas dessas ligações. São inicialmente sintetizadas em grandes precursores formados por 87-94 resíduos de aminoácidos que formam uma sequência em “escada” hidrofóbica e uma pequena parte acídica, seguida daquela que será a sequência madura. O pro-peptídeo parece atuar na neutralização da sequência proteica madura, que é altamente catiónica, resultando na inativação da atividade antimicrobiana até o processo estar completo. O peptídeo ativo localiza-se nos grânulos dos neutrófilos maduros e processos alternativos podem ocorrer, resultando em isoformas que podem diferir até 4 aminoácidos adicionais no terminal do peptídeo ativo. Em contraste, as defensinas das células epiteliais são secretadas como pré-pro-peptídeos e a ativação final ocorre no espaço extracelular (Duits LA 2002, Prado-Montes de Oca 2010). As α -defensinas, embora de dimensões pequenas (3,5-4 kDa) têm 3 pontes intramoleculares mediadas por cisteínas 1-6, 2-4 e 3-5, enquanto as β -defensinas (4-6 kDa) têm pontes dissulfeto entre as cisteínas 1-5, 2-4 e 3-6. As concentrações das primeiras encontram-se consideravelmente elevadas em locais de inflamação aguda, e as concentrações plasmáticas estão aumentadas em doenças sistêmicas infecciosas, enquanto as secundárias exibem um largo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos e vírus (Jurevic, Bai et al. 2003). As defensinas extracelulares hBD2 exibem uma atividade quimiotática para monócitos, células dendríticas imaturas e células T, sugerindo uma atividade pró-inflamatória, sendo também mitogénica para fibroblastos - sistema de defesa combinado que junta a atividade antibacteriana com recrutamento de células inflamatórias. As hBD1 são expressas de forma constitutiva pelos queratinócitos e são encontradas nos interstícios intercelulares, enquanto as hBD2-4 são indutíveis e produzidas por queratinócitos e células epiteliais

em resposta a estímulos pró-inflamatórios como os produzidos pelos IL1, TNF e LPS (Kaiser V 2000).

Os genes codificadores de todas as classes de defensinas estão localizados numa única região cromossômica do genoma humano, 8p21-23. As posições genéticas relativas sugerem a sua evolução a partir de um precursor único. O número de genes da defensina no cromossoma 8 parece variar na população, sugerindo que existe uma componente genética na resistência individual à infecção. A expressão da hBD1 é variável entre os indivíduos, enquanto a hBD2 é potenciada em resposta à infecção e inflamação. A descoberta de que a hBD1 tem uma expressão variável e de que outras beta-defensinas podem ser induzidas, levantou a hipótese de uma suscetibilidade aumentada à infecção, dependente da expressão geneticamente determinada pelos, dos genes *DEFB*, que codificam as beta-defensinas (Kaiser V 2000, Jurevic, Bai et al. 2003).

Os genes codificadores das α defensinas leucocitárias estão organizados em 3 exões, com o primeiro contendo uma região 5'UTR. As restantes α e β defensinas têm 2 exões equivalentes aos exões 2 e 3 anteriores. A estrutura genética da β defensina indica uma divisão secundária, nomeadamente uma sub-família hBD2 tem um intrão relativamente pequeno (2kb) e é caracterizado por apresentar expressão indutível nas células epiteliais. Outra sub-família hBD1 tem um intrão grande (10kb) e caracteriza-se por uma expressão constitutiva numa variedade de tipos celulares.

A hBD-1 é considerada como o peptídeo antimicrobiano mais importante na defesa contra a infecção epitelial (Zhu and Gao 2013), sendo o único com expressão constitutiva nos queratinócitos da pele, nas células epiteliais do trato respiratório e urinário, apresentando regulação positiva através de estímulos inflamatórios ou microbianos (Yang and Oppenheim 2004). As maiores concentrações de hBD-1 foram encontradas no rim e trato re-

produtivo feminino, especialmente em mulheres grávidas. No entanto, outros locais de expressão no organismo humano incluem células epiteliais do testículo, do tecido gengival, do intestino delgado, da córnea, da glândula mamária e astrócitos (Pazgier, Prahil et al. 2007).

O gene que codifica a hBD1, *DEFB1* ou *HBD1* (GeneID: 1672; www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) estende-se por 7448 bp, no locus 8p23.2-p23.1, e está localizado no meio de um *cluster* de α -defensinas. É geralmente considerado como um gene de cópia única, embora tenham sido detetadas duplicações alguns indivíduos (Cagliani, Fumagalli et al. 2008). Os 10 SNPs mais relevantes do *DEFB1* em doenças humanas conhecidos até à data são: -2266T>C, -1816T>C, -1241T>C, c.-52G>A, c.-44G>C, c.-20G>A, IVS+692A>G, c.1654G>A (V38I), c.1754G>A e c.1836A>G (Prado-Montes de Oca 2010).

A sobre-regulação (do inglês *up-regulation*) de *DEFB1* influencia a hBD-3, na presença do alelo -44G. Uma possível repercussão deste SNP é que o alelo -44C altere a estrutura secundária do RNAm da hBD-1, bem como o local de ligação do fator nuclear kappa B1 (NF-KB1), importante na regulação da expressão genética. O alelo -44G pode ser importante na expressão constitutiva e explicar a vantagem rara do genótipo heterozigótico, afetando a região reguladora do gene *DEFB1* (Kalus, Fredericks et al. 2009, Prado-Montes de Oca 2010).

As β -hBD são produzidas maioritariamente por células epiteliais e secretadas na forma madura. Os fragmentos amino-terminais processados pelas hBD-1 variam entre 38-47 resíduos, tendo sido identificados na urina. No plasma sanguíneo estão ligados a macromoléculas transportadoras e todos apresentaram diferentes intensidades de ação microbicida. É ainda desconhecido se estas variantes são produzidas em todos os tecidos que expressam as hBD-1, ou que enzima produz estas formas amino-processadas,

porque a hBD-1 é clivada de uma forma muito semelhante quando exposta a quimotripsina ou à MMP-7. A MMP-7 cliva seis aminoácidos do terminal amina do resíduo 47 da forma precursora da hBD-1, mas não do resíduo 39, provavelmente porque está protegido pelo seu enovelamento tridimensional nativo (Zucht, Grabowsky et al. 1998, Wilson, Schmidt et al. 2009).

A hBD-1 tem um largo espectro antimicrobiano, direto e indireto, enquanto as células dendríticas imaturas, que são por ela quimioatraídas, também podem fagocitar e eliminar agentes patogénicos e melhorar a apresentação de antígenos (Yang and Oppenheim 2004). As α -defensinas podem servir para ligar o sistema imune inato e o adaptativo, através da atividade quimiotática que exercem em monócitos, células T e células dendríticas imaturas induzindo a produção de citocinas pelas células epiteliais e iniciando as respostas por anticorpo IgG sistémicas (Duits LA 2002). Ambas as hBD-1 e hBD-2 exercem quimioatração seletiva em células dendríticas imaturas (iDCs) e células T de memória *in vitro*. As suas atividades quimiotáticas envolvem o receptor de quimiocina CCR6 que medeia a sinalização natural através da ligação da imunidade inata à adaptativa (Yang and Oppenheim 2004). A hBD-1 pode também estar envolvida na maturação de células dendríticas e/ou na sua ativação via CCR6 e TLRs, provavelmente tendo um efeito importante sobre a inflamação na pele e/ou na capacidade de resposta da pele a qualquer reação alérgica. Além disso, promove a ativação e a maturação das células dendríticas derivadas de monócitos, regulando positivamente a expressão do recetor CD91 na sua superfície, provavelmente amplificando os seus próprios efeitos (Presicce, Giannelli et al. 2009). Compreende-se, assim, que vários SNPs do *DEFB1* tenham já sido associados a doenças inflamatórias e alérgicas.

Os monócitos e macrófagos humanos expressam RNAm para a tradução de hBD 1 e 2, além do que se pensava ser exclusivo de uma variedade

de células epiteliais. Esta expressão aumenta por ativação com LPS e/ou IFN α , sugerindo que há mediadores inflamatórios que podem influenciar a expressão da hBD1 (Duits LA 2002).

As hBDs também têm sido propostas como agentes supressores tumorais, porque promovem a apoptose de células cancerígenas e estão ausentes na maioria das amostras de tumor. As propriedades supressoras tumorais e antimicrobianas de largo espectro indicam que a hBD-1 seja uma molécula elementar na defesa do hospedeiro e regulação do ciclo celular (Sun, Arnold et al. 2006, Bullard, Gibson et al. 2008). A expressão das hBDs correlaciona-se, também, com os níveis de insulina e glicose, sugerindo um papel relevante da baixa glicose intracelular ou hipoinsulinemia naquela resposta. Quando a hBD-1 entra no núcleo, provavelmente atua como um fator de transcrição relevante durante o processo de diferenciação do estrato córneo, protegendo assim os queratinócitos da apoptose durante a reorganização epitelial (Sayama, Komatsuzawa et al. 2005, Bick, Poindexter et al. 2007).

Será lícito colocar a hipótese de existir uma associação significativa entre SNPs do *DEFB1* e a suscetibilidade a doenças infecciosas, devido ao indubitável papel exercido na imunidade inata pelo peptídeo hBD1 contra diversos patógenos, apoiada por diversos estudos de associação (Jurevic, Bai et al. 2003, Braidá, Boniotto et al. 2004, Hu, Xu et al. 2004, Leung, Li et al. 2006, Milanese, Segat et al. 2006, Segat, Milanese et al. 2006, Chen, Lv et al. 2007, Prado-Montes de Oca, Garcia-Vargas et al. 2007, Baroncelli, Ricci et al. 2008, Kocsis, Lakatos et al. 2008, Lakatos, Altorjay et al. 2008, Tesse, Cardinale et al. 2008, Zapata, Rodriguez et al. 2008, Guimaraes, Segat et al. 2009, Kim, Lee et al. 2009). Todos estes estudos focaram a sua atenção principalmente em 3 SNPs do *DEFB1* localizados na região 5'UTR do gene nas posições c.-52G>A, c.-44G>C e c.-20G>A, relativamente ao primeiro

ATG. Embora o *DEFB1* seja considerado como um gene de expressão constitutiva, têm sido referidas expressões diferenciais, inter-individuais e inter-tecidulares. Os haplotipos de *DEFB1* relacionados com os SNPs c.-52G>A, c.-44G>C e c.-20G>A foram descritos como estando sobre-representados, em vez de aleatoriamente distribuídos. Existem dois estudos indicando que os haplotipos GCA (-52/-44/-20) podem estar associados a asma e ter um papel protetor contra a sépsis, enquanto o haplotipo GGG seria um fator de risco para a progressão da sépsis (Leung et al., 2006; Chen et al., 2007). Os alelos das posições -52, -44 e -20 podem contribuir tanto para a proteção como para a suscetibilidade a diferentes patologias, pelo que existem evidências a sugerir que estes SNPs podem modificar o fenótipo de forma sinérgica.

Quando se analisa a possibilidade de um SNP estar associado a portadores de *Candida* em populações de diabéticos tipo 1 e não diabéticos, conclui-se que um único SNP no gene *DEFB1* mostrou uma associação com o estado de portador de *Candida*. A variante alélica -44G está associada a um efeito protetor em ambos os grupos, com uma *odds ratio* de 25 e de 8,5, respetivamente, nos indivíduos diabéticos e não diabéticos com níveis de *Candida* <350 CTU/ml. Este resultado significa que indivíduos portadores de uma ou duas cópias do alelo -44G têm 25x (ou 8,5x nos não diabéticos) mais probabilidade de apresentarem níveis reduzidos de *Candida*, quando comparados com os indivíduos portadores do alelo C deste SNP. A variabilidade de expressão causada por esta variação de sequência pode estar associada a alterações na porção do gene que contém o nucleótido -44, ou, em alternativa, este SNP encontrar-se em desequilíbrio de ligação com outro, nomeadamente noutro gene, talvez outra β -defensina ou uma α -defensina, com efeito direto na sobrevivência da *Candida* (o *DEFB1* está localizado num cluster de α -defensinas que têm uma localização mais telomérica,

comparativamente a outras β -defensinas); assim, é possível que o efeito deste SNP possa estar ligado às defensinas localizadas na vizinhança do gene *DEFB1*. Um outro SNP (c.1654G>A; p.V38I) na região codificante deste gene revelou uma associação positiva com a doença pulmonar obstrutiva crónica, mas não se verificou nenhuma correlação com o facto de ser portador de *Candida* (Jurevic, Bai et al. 2003).

Foi também descrita outra hipótese de um SNP com consequências funcionais na expressão do gene *DEFB1* ou na estrutura da proteína hBD1 levar a uma maior suscetibilidade para lepra ou a uma melhor/pior resposta imunológica ao *M. leprae* e, por isso, afetar o prognóstico clínico. Ao contrário de outros PAMs, como hBD2 e LL37 (apenas sobre-expressos em processos inflamatórios), a hBD1 é expressa de forma constitutiva nos queratinócitos da pele e é considerada como o maior PAM do epitélio humano, um dos principais locais de infeção por *M. leprae*, sendo também ativa e sobre-regulada por micobactérias. Foram estudados 3 dos SNPs identificados no gene *DEFB1*, com localização na região UTR (5': c.-44G>C e c.-20G>A; 3': 1836G>A), uma vez que variações nesta região poderiam determinar a expressão do gene, ao influenciar a estabilidade do RNAm e a eficiência de tradução, com consequências funcionais na resposta ao *M leprae*. Os génotipos associados a L-lep (forma referente aos doentes infetados com a forma lepromatosa ou multibacilar mais suscetíveis ao patogénio e que exibem uma infeção sistémica e lesões expressando citocinas TH2) continham o alelo -44C num modelo dominante (OR=3,6; IC 95% 1,47-6,4; p=0,024), o que não se verificou para nenhum outro subgrupo (Prado-Montes de Oca, Velarde-Felix et al. 2009).

É sabido que alguns PAMs, incluindo as defensinas, estão abaixo dos níveis normais, em doentes com dermatite atópica. A colonização por bactérias e espécies de *Candida* está associada com os genes da hBD; contudo, a

ligação destes peptídeos a certos vírus, incluindo o HSV1, pode diminuir a sua capacidade para infectar células. Estudos de ligação sugeriram que a região cromossômica 8p23 contém genes que terão uma contribuição significativa para os fenótipos da asma e da dermatite atópica. O gene *DEFB1* foi mapeado na região cromossômica 8p23.1-23.2, e SNPs neste gene foram associadas à patogénese da asma, que é uma doença atópica com resposta TH2 similar, mas com diferentes tecidos envolvidos. Também foi verificada associação positiva com doença pulmonar obstrutiva crónica e doenças infecciosas. Num estudo recente, dos 6 SNPs do gene *DEFB1* analisados, o -2266T>C e o -1241T>G mostraram distribuições alélicas e genotípicas significativamente diferentes entre indivíduos com dermatite atópica e controlos. Embora a maioria dos estudos refira SNPs nas posições -44 e -52 associadas a dermatite atópica, asma, diabetes, sépsis, HIV e doença pulmonar obstrutiva crónica, este estudo não mostrou associação significativa destes SNPs com dermatite atópica na população coreana, mas sim para o -2266T>C, o -1241T>G e o haplotipo CT (Kim, Lee et al. 2009).

A atividade antiviral das β -defensinas envolve diversos mecanismos, incluindo a interação direta com vírus envelopados e células alvo. Pode também estar relacionada com a sua capacidade de atrair células do sistema imune para um tecido alvo. Foi demonstrado que a mucosa vaginal e endocervical de mulheres expostas ao HIV, mas seronegativas, tinham níveis elevados de hBD 1, 2 e 3 em comparação com os controlos saudáveis. Além disso, a mucosa vaginal de mulheres seronegativas apresentavam níveis mais elevados de hBD1 em comparação com mulheres seropositivas. Foi então proposto que as variações de sequência c.-44G>C e c.-52G>A na região 5'UTR do gene *DEFB1* influenciavam a suscetibilidade/resistência à infeção por bactérias e agentes virais, e por outro lado, estavam envolvidas na transmissão mãe-filho do HIV1. No entanto, o seu papel ainda não está

claramente definido. Nos RN em que a imunidade adquirida ainda não está completamente desenvolvida, o sistema imune inato tem um papel fundamental ao conferir resistência às infecções. A região promotora do *DEFB1* apresenta uma diversidade polimórfica e uma variedade funcional elevadas. Embora a função biológica das variantes genéticas do *DEFB1* seja ainda desconhecida, os SNPs c.-44G>C e c.-52G>A têm sido referenciados como fatores importantes que afetam os níveis da expressão proteica. O genótipo -52GG foi considerado como altamente protetor contra a infecção perinatal por HIV1; em particular, crianças com esta variante genética tiveram o risco de infecção significativamente menor, mas em contraste, a associação do genótipo -44GG a um baixo risco de infecção não se manteve estatisticamente significativa. O genótipo -44CC aumentou significativamente a suscetibilidade para infecção HIV1. Foi demonstrado um papel significativo do SNP c.-52G>A e do haplotipo -44G/-52G no risco de transmissão mãe-filho na população caucasiana. O genótipo -52GG nas mães foi associado a baixas cargas virais, o que é consistente com o facto do alelo -52A ter como consequência funcional uma redução nos níveis de hBD1 (Ricci, Malacrida et al. 2009). Provavelmente, as concentrações elevadas de hBD1, encontradas em placentas de grávidas HIV1 devem-se à estimulação viral e podem representar um potencial mecanismo para a evicção da transmissão vertical (Aguilar-Jiménez W 2011). A hBD1 reduz a infecciosidade do HIV *in vitro* a 50% e atua indiretamente através da sobre-regulação do hBD-3 que é um antagonista do co-receptor CXCR4 do HIV-1. Além disso, a hBD-1 é a única β -defensina que induz a libertação de CCL5 ou RANTES em células mononucleares do sangue periférico (Sun, Arnold et al. 2006, Kalus, Fredericks et al. 2009). A hBD-1 pode também desempenhar um papel fundamental na proteção de crianças contra doenças infecciosas, como a diarreia, e na de mães contra mastites durante a amamentação (Cagliani, Fumagalli et al.

2008). Em geral, a hBD-1 pode fornecer proteção constitutiva contra possíveis organismos patogénicos em todos os epitélios internos e expostos da mucosa. Existem muitas evidências na literatura a sugerir que a expressão insuficiente de hBD-1 associada ao alelo -44C na presença de agentes patogénicos, leva a uma má resposta imune inata contra micro-organismos infecciosos (Prado-Montes de Oca, Velarde-Felix et al. 2009).

Outros autores realizaram um estudo sobre a relação dos SNPs c.-52G>A, c.-44G>C e o c.-20G>A com a suscetibilidade para e com a etiopatogenia do lúpus eritematoso sistémico (LES), tendo concluído que o alelo -52A era significativamente menos frequente nos doentes com LES, providenciando assim uma proteção, da mesma forma que o genótipo -44CC foi significativamente mais frequente nos doentes, sugerindo uma suscetibilidade aumentada para LES (OR 1,60; IC 0,99-2,58; p=0,04) associada a esta variante genética. Os 3 SNPs acima referidos encontram-se em desequilíbrio de ligação e combinam-se em 4 haplotipos diferentes. Os haplotipos GCA ou GGG conferem um risco aumentado para o desenvolvimento de LES (Sandrin-Garcia, Brandao et al. 2012).

Polimorfismos genéticos do *DEFB1/HBD1* nas posições -692 e -44 e a sua correlação com periodontite foram estudados, tendo-se concluído não existir associação (Boniotto, Hazbon et al. 2004). Em contraste, foi demonstrada uma correlação positiva entre a doença pulmonar obstrutiva crónica e dermatite atópica e o SNP -1654G>A (Matsushita, Hasegawa et al. 2002, Prado-Montes de Oca, Garcia-Vargas et al. 2007). Num outro estudo verificou-se que doentes com periodontite crónica moderada a severa apresentavam o genótipo -1654A/A com maior frequência (Loo, Bai et al. 2012).

Recentemente foi estabelecida uma associação entre os SNPs c.-52G>A e c.*5G>A com a expressão proteica de hBD1, em que o primeiro foi relacionado com concentrações séricas elevadas de hBD1 no 1º trimestre

de gestação, ao contrário do segundo, que foi associado a concentrações séricas de hBD1 baixas (James, Bajaj-Elliott et al. 2014).

As potenciais abordagens terapêuticas descritas para a defensina incluem a hBD-1 recombinante, bem como o uso de facilitadores e inibidores de hBD-1. Mesmo com a disponibilidade de hBD1 recombinante de *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* disponíveis, continua a ser caro produzir e purificar peptídeos antimicrobianos para aplicações terapêuticas. No entanto, existem já muitos peptídeos antimicrobianos que são atualmente alvo de ensaios clínicos como imunorreguladores. Os facilitadores físicos, químicos e biológicos são uma alternativa à administração direta de peptídeos antimicrobianos, porque eles induzem uma sobre-expressão desses peptídeos de defesa no hospedeiro, aumentando a proteção endógena contra patógenos. Mesmo quando a expressão de *DEFB1* é principalmente constitutiva, foram identificados indutores da sua expressão, que incluem aminoácidos, tais como a L-isoleucina e os seus análogos, e a albumina (Prado-Montes de Oca, Velarde-Felix et al. 2009). Podem ter aplicações potenciais no tratamento de doenças provavelmente causadas ou agravadas por deficiência de defensina, tais como a Doença de Crohn, a hanseníase e o cancro, sendo ainda possível até ter aplicação na profilaxia de HIV ao ajudarem a proteger as mucosas contra a infecção pelo vírus diminuindo a sua ligação e internalização. A pesquisa sobre as moléculas que bloqueiam a hBD-1 ajudará a identificar eventos de sinalização e regulação da expressão. Uma abordagem promissora é a utilização de substâncias que imitam moléculas hBD-1 inibitórias, ou a aplicação de miRNAs no tratamento de doenças causadas ou relacionadas com a sobre-regulação de *DEFB1* tais como acne, psoríase, periodontite crónica, esclerodermia e sialodente crónica (Castanotto and Rossi 2009, Prado-Montes de Oca, Velarde-Felix et al. 2009).

Em suma, apesar do número de estudos ser ainda limitado para a análise genética da defensina no PPT, existem evidências importantes, do estudo de várias patologias, de que as variações genéticas do *DEFB1* podem desempenhar um papel importante no risco para PPT ou co-morbilidades associadas, bem como poderão ainda ser de utilidade na adequação de abordagens terapêuticas personalizadas, com base na informação genética. Nesse sentido, é pertinente averiguar a existência dessa associação.

II. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

1. caracterizar a prematuridade espontânea precoce (abaixo das 34 semanas de gestação), com e sem rotura prematura de membranas (RPMPT^p e PPTe^p, respetivamente), dentro da prematuridade global, com e sem RPM (RPMPT^g e PPTe^g, respetivamente), numa amostra correspondente a 10 anos, com o objetivo de responder às seguintes questões:

- existe alguma alteração nas características da prematuridade global e/ou especificamente da prematuridade precoce, ao longo dos anos analisados?

- considerando a prematuridade global, existirá algum fator associado a parto abaixo das 34 semanas, com e sem RPMPT?

- na prematuridade precoce, será a RPMPT um fator de risco para resultados neonatais mais adversos?

2. identificar o papel das variações no gene *DEFB1/HBD1* (que codifica a proteína hBD-1) como fator de suscetibilidade para a ocorrência de RPMPT^p, definindo um novo marcador de risco para esta situação clínica e desta forma contribuir para uma abordagem mais racional, tanto ao nível de fatores de risco como na abordagem terapêutica, nomeadamente na tentativa de responder à questão:

- será que alterações genéticas, nomeadamente os SNPs c.-20G>A, c.-44G>C e c.-52G>A são indicadoras de risco ou proteção para os resultados perinatais?

III. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental desta Dissertação foi realizado no Serviço de Obstetrícia A - Maternidade Dr. Daniel de Matos - do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, sob supervisão do Professor Doutor Paulo Moura, e no Laboratório de Bioquímica Genética - LBG - do Centro de Neurociências e Biologia Celular e Faculdade de Medicina de Coimbra, sob coordenação da Professora Doutora Manuela Grazina.

A realização deste trabalho teve a aprovação das Comissões de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (HUC 37-10) e todas as participantes do estudo genético deram o seu consentimento informado por escrito para a realização do mesmo.

1. Caracterização da prematuridade espontânea global e precoce

1.1. Constituição da amostra

Do total de 31.885 partos ocorridos no Serviço de Obstetrícia A do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, entre 2003 e 2012, foram selecionados todos os 2.393 referentes a partos pré-termo (7,5% dos partos ocorridos neste período de tempo).

Os critérios de inclusão dos processos clínicos no estudo foram: a ocorrência de parto, associado ou não com rotura prematura de membranas, entre as 24 semanas e 0 dias e as 36 semanas e 6 dias, entre 01 de janeiro de 2003 e 31 de dezembro de 2012.

Como critérios de exclusão estipulámos: os processos referentes a partos ocorridos entre as 24 semanas e 0 dias e as 36 semanas e 6 dias

motivados por patologia fetal e/ou materna (iatrogénicos); todos os processos não disponíveis ou incompletos para consulta.

Dos 2393 processos identificados, e após aplicados os critérios de exclusão, foram incluídos 1432 processos, dos quais 341 (23,8%) se referiam a um parto abaixo das 34 semanas de gestação - Figura 1.

A distribuição da prematuridade espontânea global foi analisada comparando os sub-grupos com e sem RPMPT (RPMPT^g e PPTe^g, respetivamente), tendo a mesma sub-divisão sido realizada na prematuridade precoce (RPMPT^p e PPTe^p, respetivamente) - 24s0d a 33s6d.

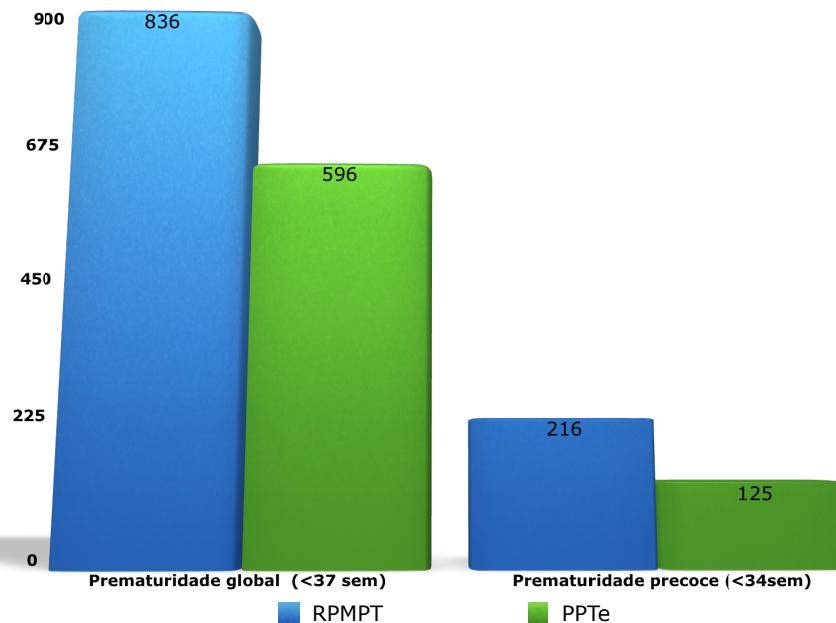


Figura 1 - Caracterização da amostra de prematuridade espontânea estudada, sub-dividida por PPTe e RPMPT, quer na prematuridade global (n=1432), quer na precoce (n=341).

1.2. Análise da amostra

Dos processos clínicos aceitos para análise foram recolhidas informações referentes ao tipo de parto pré-termo, a dados demográficos, antecedentes pessoais e familiares, antecedentes obstétricos, vigilância da gravidez, complicações durante a gravidez, dados do internamento, medicação durante a gravidez, prolongamento da gravidez, dados do parto, dados da placenta, complicações no puerpério e dados do recém-nascido.

Os dados demográficos incluíram idade, estado civil (categorizado em casada, solteira, união de fato, divorciada e viúva), profissão (categorizado em desempregada, com trabalho remunerado, com trabalho não remunerado e reformada) e residência.

Nos antecedentes pessoais registou-se a altura, o peso e o IMC inicial, o peso final e o IMC final, o ganho ponderal, a existência de PPT anteriores, os antecedentes pessoais e familiares de patologias neurológica/psiquiátrica, renal, cardiovascular, gastrointestinal, hematológica, endocrinológica, tumoral, cromossomopatias e outras, doenças sexualmente transmissíveis, tabagismo, álcool, antecedentes ginecológicos de malformações uterinas e intervenções sobre o colo uterino e contraceção.

Nos antecedentes obstétricos registou-se a existência de história de esterilidade e a duração da mesma, o fato de a gravidez em causa ter sido espontânea ou obtida por PMA (e nestes casos o tipo de indução efetuado: indutores da ovulação, fertilização *in-vitro* - FIV, injeção intracitoplasmática de esperma - ICSI), a paridade, os partos anteriores a termo e pré-termo, bem como a IG de ocorrência destes.

Na vigilância da gravidez foram incluídas as seguintes variáveis: local de vigilância (categorizado em sem vigilância, centro de saúde, centro e

saúde e maternidade em rede de referência, maternidade, outro hospital, médico privado, outro país), realização de diagnóstico pré-natal, vigilância ecográfica, patologia fetal e do líquido amniótico, valor do comprimento cervical no 2º trimestre, resultado de colheitas de exsudado vaginal no 2º trimestre e de pesquisa de *Streptococcus* do grupo B.

As complicações durante a gravidez foram registradas como presentes (e neste caso registrada a IG da ocorrência) ou ausentes nas seguintes variáveis: ameaça de abortamento, metrorragias, ameaça de parto pré-termo (APPT), infecções do trato urinário (ITU), outras infecções sistêmicas ou locais, anemia, doenças hipertensivas, diabetes gestacional, outras doenças maternas, patologia fetal e patologia do líquido amniótico e a ocorrência de RPMPT.

Os dados do internamento incluíram a proveniência (categorizado em iniciativa própria pela urgência, centro de saúde, outros hospitais ou médico particular), a IG e o motivo do internamento (categorizado em APPT, PPT, RPMPT), resultado de colheitas de exsudado vaginal, a determinação do comprimento cervical e o seu valor, o resultado da urocultura e o valor da proteína C reativa (PCR), leucócitos e velocidade de sedimentação (VS).

A medicação durante a gravidez/internamento incluiu o registo de corticoterapia para maturação pulmonar (a IG e se o ciclo foi completo ou incompleto) e de antibioterapia (se realizada e qual o antibiótico usado).

O prolongamento da gravidez foi registado no número de dias desde a data do internamento até ao parto.

Nos dados do parto foram incluídos a IG da sua ocorrência, a apresentação fetal, o tipo de parto, as indicações das cesarianas no caso de ter sido esta a via do parto categorizadas em estado fetal não tranquilizador (EFNT), não progressão da dilatação (NPD), indução falhada (IF), incompatibilidade feto-pélvica (IFP), apresentação pélvica, outros motivos (OM) e

indicação materna (IM). Foi também registado o sexo e peso do recém-nascido bem como os índices de APGAR ao 1^o, 5^o e 10^o minutos de vida, e a existência de complicações no parto.

Os dados da placenta referem-se aos resultados do estudo bacteriológico e histopatológico das mesmas.

Como complicações no puerpério registaram-se a anemia (com necessidade ou não de transfusão), deiscência de sutura, endometrite e outras complicações.

Os dados do recém-nascido incluíram admissão ou não na Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais (UCIN), mortalidade neonatal (precoce e tardia) e morbilidade neonatal, categorizada em neurológica, respiratória (dentro da qual foi analisada, em particular, a ocorrência de síndrome de dificuldade respiratória - SDR), gastrointestinal e infecciosa.

1.3. Análise estatística

Foi realizada uma caracterização global da amostra de 1.432 mulheres cujos partos ocorreram antes das 37 semanas, considerando os parâmetros relativos aos dados demográficos, antecedentes pessoais, antecedentes obstétricos, vigilância da gravidez, complicações durante a gravidez, dados do internamento, medicação durante a gravidez, prolongamento da gravidez, dados do parto, dados da placenta, complicações no puerpério e dados do recém-nascido. As variáveis categóricas foram caracterizadas por intermédio de frequências absolutas e relativas e as variáveis contínuas foram caracterizadas recorrendo à média, mediana, desvio padrão, quartis, mínimo e máximo.

Como foram analisados processos relativos a um período longo de tempo (10 anos, entre 2003 e 2012) procedeu-se a uma análise evolutiva de cada parâmetro observado ao longo dos anos. Esta análise foi feita com recurso ao teste Qui-Quadrado *for trend*, no caso em que se pretendeu testar a existência ou não de uma tendência linear nas proporções observadas ao longo dos anos.

Posteriormente as grávidas foram divididas em dois grupos, com e sem RPMPT, e foram comparados em relação a todos os parâmetros mencionados acima. Esta análise foi efetuada para a prematuridade global e para a prematuridade precoce (IG ao parto <34 semanas), em particular. A normalidade da distribuição dos valores das variáveis contínuas e a igualdade das suas variâncias foram testadas usando o teste Kolmogorov-Smirnov e o teste de Levene. Quanto às variáveis categóricas, as diferenças das proporções entre os grupos foram avaliadas recorrendo ao teste Qui-Quadrado. Quanto às variáveis contínuas, o teste T foi usado para comparar médias dos grupos. Quando os pressupostos do teste T não foram satisfeitos, considerou-se o teste Mann-Whitney para comparar a distribuição dos valores das variáveis contínuas. Foram posteriormente determinados os fatores associados a parto em IG anterior às 34 semanas, nos subgrupos de mulheres com PPT e RPMPT. Fez-se uma análise univariável em que se analisou a associação entre ter um parto antes das 34 semanas e os parâmetros relativos aos dados demográficos, antecedentes pessoais, antecedentes obstétricos, vigilância da gravidez, complicações durante a gravidez, dados do internamento, medicação durante a gravidez e prolongamento da gravidez. Por fim construiu-se um modelo de regressão logística para determinar quais os fatores que têm uma associação significativa com a ocorrência de partos em IG anteriores às 34 semanas e na ocorrência de RPMPT em IG <34semanas. O risco de ocorrência de parto pré-termo ou RPMPT anterior

às 34 semanas associado a cada fator foi estimado por intermédio do Odds Ratio e respetivo intervalo de confiança a 95%. Um modelo idêntico de regressão logística foi efetuado para determinar quais os fatores com efeito significativo na morbilidade dos RN.

O nível de significância utilizado nesta análise foi de 5%. Recorreu-se ao software estatístico SPSS® v19.0.0.2.

2. Estudo genético

2.1. Constituição da amostra

Para o estudo genético foram selecionadas as mulheres com parto pré-termo precoce associado a RPMPT (RPMPT^p). Das 216 mulheres incluídas neste grupo, optou-se por incluir apenas as dos últimos 4 anos em favor do aumento da adesão. Assim, foram contactadas 61 mulheres para participarem no estudo, das quais 22 aceitaram, o que perfaz uma taxa de adesão de 36%. Após esclarecimento, as 22 mulheres assinaram o respetivo consentimento informado para colheita de sangue periférico e para inclusão dos dados numa folha de dados informatizada. Foi efetuada a colheita de 6 ml de sangue periférico para tubos de EDTA e 2,5 ml para tubos Pax-Gene.

Para avaliação dos resultados, foram contactadas 102 mulheres sem antecedentes de partos pré-termo para servirem de controlos. Todas aceitaram participar no estudo, tendo-lhes sido colhido sangue periférico após esclarecimento e assinatura do consentimento informado.

2.2. Análise da amostra

2.2.1. Extração de DNA

O DNA utilizado neste estudo foi previamente extraído do sangue periférico, através do método de fenol-clorofórmio para remoção dos contaminantes proteicos, seguido de precipitação por etanol. O *pellet* de DNA obtido após a precipitação, foi dissolvido em tampão Tris-EDTA à concentração adequada para futuras análises. As amostras de DNA extraído foram guardadas a 4°C previamente à sua utilização.

2.2.2. Quantificação do DNA

Para determinar a concentração e qualidade do DNA (Moore et al, 1997), foi medida a densidade ótica a 260nm (DO_{260}) para avaliar a quantidade de DNA, e a 280nm (DO_{280}) para estimar a contaminação proteica. A razão DO_{260}/DO_{280} deve estar entre 1,5 e 2 - o grau de pureza aceitável para análises posteriores. Todas as análises foram efetuadas no Espectrofotômetro ND-1000 (Nano Drop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, USA).

2.2.3. Genotipagem do *DEFB1/HBD1*

Todas as amostras (22 casos e 102 controlos) foram genotipadas para os SNPs rs11362 (c.-20G>A), rs1800972 (c.-44G>C) e rs1799946 (c.-52G>A), utilizando *TaqMan*® *SNP Genotyping Assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), recorrendo à tecnologia de PCR em tempo real.

Estes ensaios *TaqMan*® *SNP Genotyping* utilizam uma sequência-específica, marcada com uma sonda de oligonucleotídeos fluorescentes denominada sonda *TaqMan*®. Este ensaio explora a atividade 5'exonuclease de determinadas polimerases termoestáveis, como a *Taq* ou a *Tth*. A sonda contém um *reporter* na sua extremidade 5' e um *quencher* na extremidade 3'. Quando intacta, a fluorescência do *reporter* é suprimida devido à sua proximidade com o *quencher*. Durante a etapa combinada de *annealing* e extensão da reação de amplificação, a sonda liga-se ao alvo e a atividade da enuclease dsDNA-específica 5'->3' da *Taq* cliva o *reporter*. Esta clivagem resulta na separação do *reporter* e do *quencher*, sendo o sinal fluorescente emitido proporcional à quantidade de produto amplificado na amostra.

As vantagens de usar sondas *TaqMan*® incluem a especificidade e a possibilidade de realizar múltiplas reações na mesma amostra, sendo a maior desvantagem o custo associado.

As reações de amplificação foram efetuadas usando 20ng de DNA genómico, combinado com 20X ensaio *TaqMan*® *SNP Genotyping* (mix do *primer forward*, *primer reverse*, sonda 6FAM™ *dye-MGB* e sonda VIC® *dye-MGB*) e 2X *TaqMan*® *Genotyping Master Mix*, de acordo com

as instruções de otimização do fabricante. As amostras foram analisadas no ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C.

2.4. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada com recurso ao GraphPad Prism v.5.® para determinar se as frequências dos SNPs em análise estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando os testes χ^2 ou exato de Fisher' com tabelas de contingência. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

IV. RESULTADOS

1. Caracterização da prematuridade espontânea

1.1. Análise do parto pré-termo com e sem rotura prematura de membranas

1.1.1. Dados demográficos e antecedentes maternos

Os **dados demográficos** incluíram idade, estado civil, profissão e residência.

Quanto à idade materna, não se verificam diferenças significativas ao longo dos anos, nem os grupos (PPTe vs RPMPT) foram diferentes entre si, quer para a prematuridade global ($29,4 \pm 5,6$ vs $29,9 \pm 5,5$ anos; $p=0,063$) quer para a prematuridade precoce ($29,9 \pm 5,2$ vs $29,5 \pm 5,6$ anos; $p=0,46$) - Figura 2.

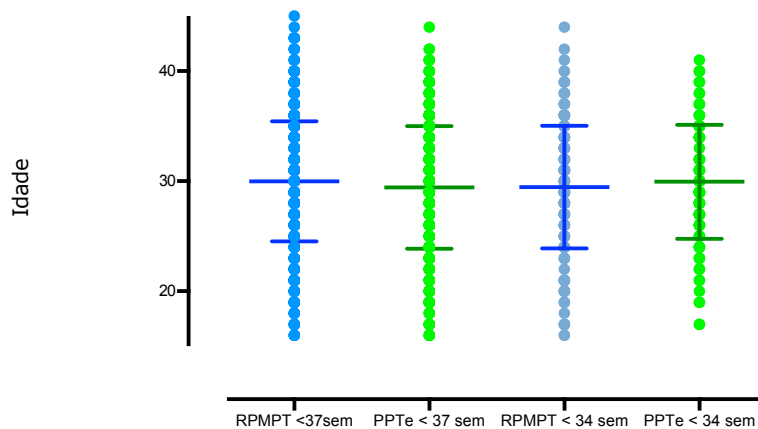


Figura 2 - Idade nas grávidas (média±DP) com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

Quanto ao estado civil, não existiram diferenças significativas, quer em relação à evolução ao longo dos anos para cada categoria em cada grupo, nem os grupos (PPTe vs RPMPT) foram diferentes entre si, quer para a prematuridade global ($p=0,117$) quer para a prematuridade precoce ($p=0,89$) - Figura 3.

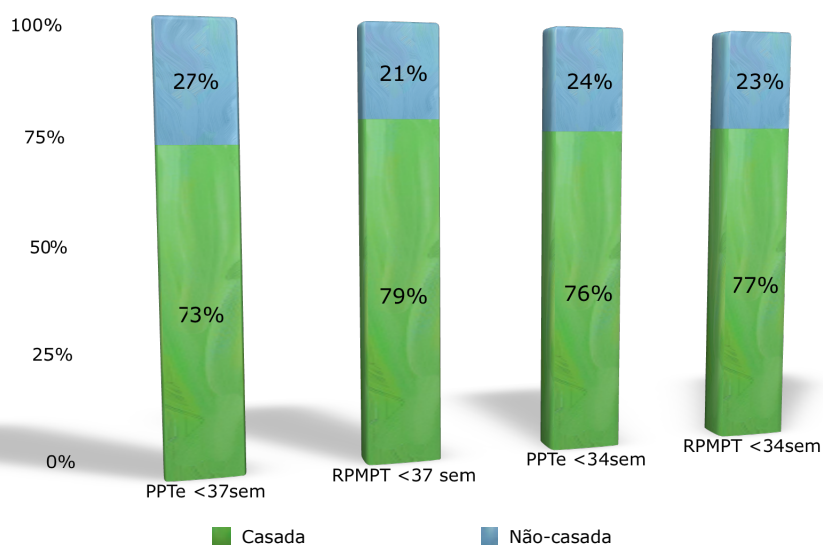


Figura 3 - Estado civil das grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

No que respeita à profissão, não se registaram diferenças significativas, quer em relação à evolução ao longo dos anos para cada categoria em cada grupo, nem os grupos (PPTe vs RPMPT) foram diferentes entre si, quer para a prematuridade global ($p=0,082$) quer para a prematuridade precoce ($p=0,19$) - Figura 4.

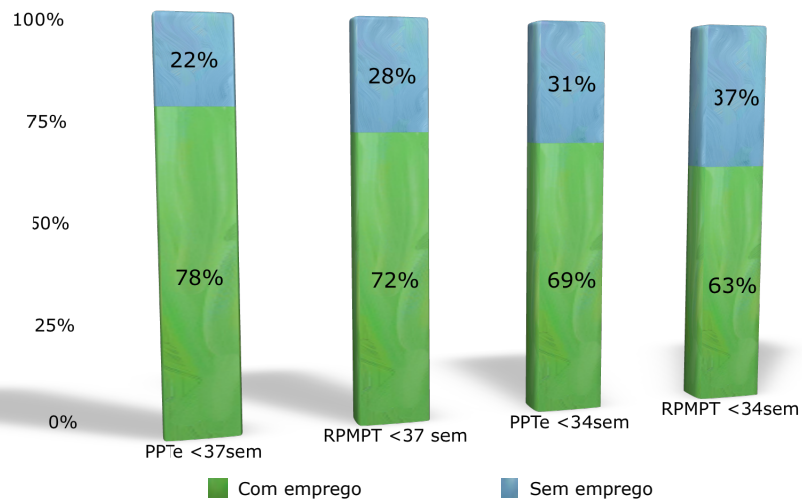


Figura 4 - Emprego nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

No que à residência diz respeito não se registaram diferenças significativas, quer em relação à evolução ao longo dos anos para cada categoria em cada grupo, nem os grupos (PPTe vs RPMPT) foram diferentes entre si, quer para a prematuridade global ($p=0,082$), quer para a prematuridade precoce ($p=0,44$).

Nos **antecedentes familiares**, existe uma tendência linear significativa para o aumento da presença de antecedentes familiares patológicos no seu global ao longo dos anos, principalmente no últimos anos, no grupo das RPMPT^P ($p=0,002$). Os grupos (PPTe vs RPMPT) não foram diferentes entre si, quer para a prematuridade global ($p=0,122$) quer para a prematuridade precoce ($p=0,499$) - Figura 5.

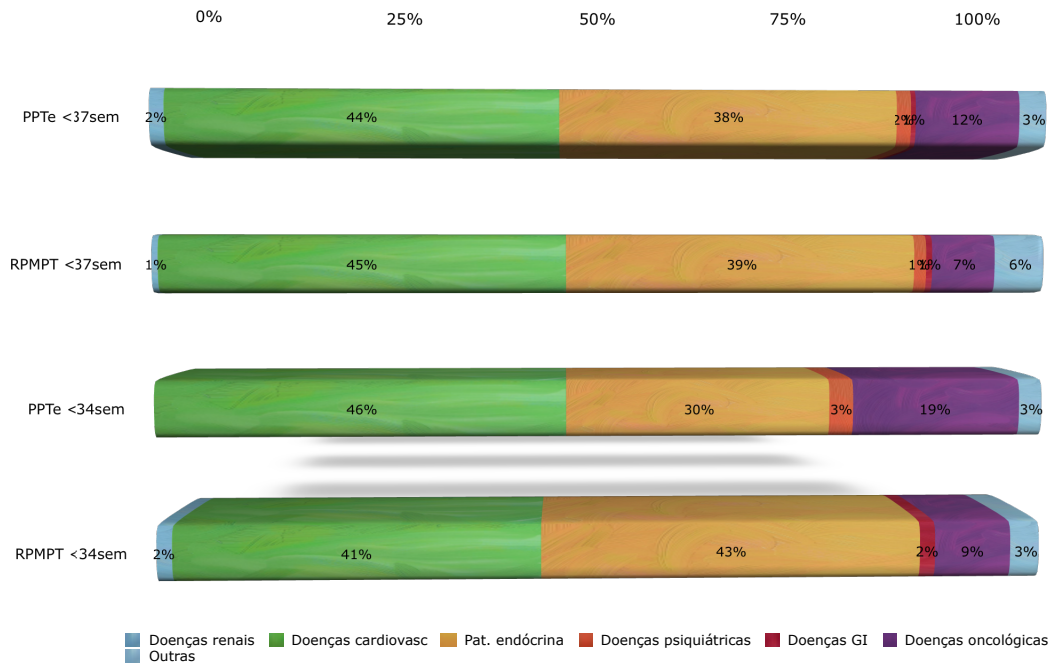


Figura 5 - Registo, em valor percentual, de antecedentes familiares patológicos nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMP.

Os **antecedentes pessoais** registados, não foram significativamente diferentes entre os dois grupos (PPTe vs RPMP), quer para a prematuridade global, quer para a prematuridade precoce - Figura 6.

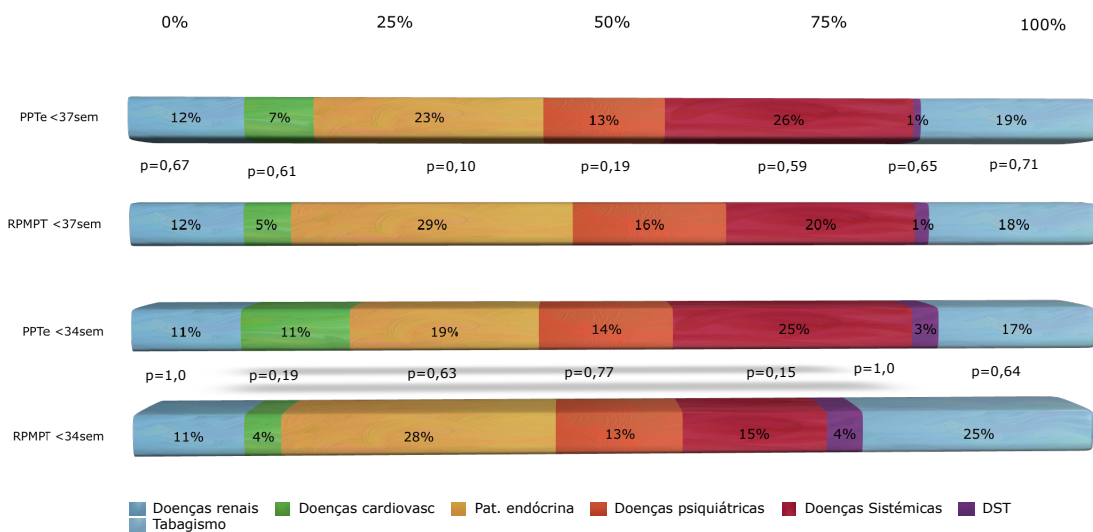


Figura 6 - Registo, em valor percentual, de antecedentes pessoais patológicos nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMP.

Não se registaram diferenças significativas entre os grupos (PPTe vs RPMPT), na prematuridade global e precoce, no que respeita a antecedentes de esterilidade ou gravidez induzida - Tabela 1.

Tabela 1 - Antecedentes de esterilidade nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

		Antecedentes Obstétricos						
		PPT <37sem		p	PPT <34 sem		p	
		PPTe	RPMPT		PPTe	RPMPT		
Esterilidade	Sim	n (%)	21 (4,8)	33 (5,8)	0,467	7 (6,5)	6 (4,8)	0,569
Esterilidade (duração)	Média ± DP		5,5±3,8	5,1±4	0,584	5,0±1,0	5,2±3,7	0,879
Grav. Induzida	Sim	n (%)	13 (2,2)	19 (2,3)	0,908	4 (3,2)	4 (1,9)	0,471
	Ind. Ovulação	n (%)	5 (38,5)	8 (42,1)		1 (25)	1 (25)	
Grav. Induzida (tipo)	FIV	n (%)	4 (30,8)	7 (36,8)	0,815	2 (50)	1 (25)	1,000
	ICSI	n (%)	4 (30,8)	4 (21,1)		1 (25)	2 (50)	

Quanto à paridade, nas RPMPT⁹ verificaram-se significativamente mais nulíparas, dados que não foram significativamente diferentes entre os dois grupos (PPTe vs RPMPT) na prematuridade precoce - Figura 7.

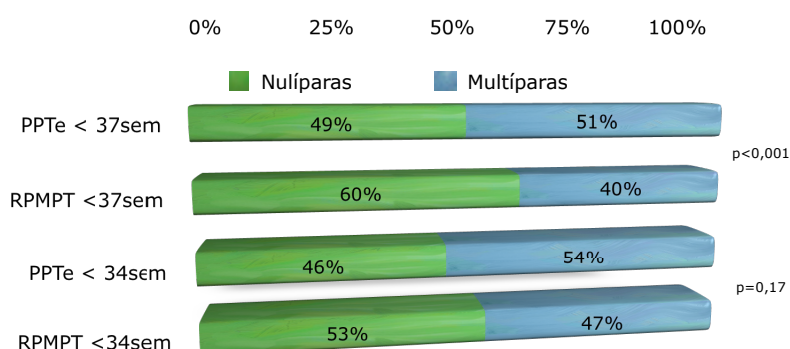


Figura 7 - Paridade das grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

O grupo das RPMPT tem uma percentagem significativamente menor de antecedentes de PPT em gravidezes anteriores que os PPTe, quer na prematuridade global quer na precoce - Tabela 2.

Tabela 2 - Antecedentes e idade gestacional dos partos prematuros ocorridos em gestações anteriores das grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

		Antecedentes Obstétricos					
		PPT <37sem		p	PPT <34 sem		p
		PPTe	RPMPT		PPTe	RPMPT	
PPTermo anterior	n(%)	121 (20,3)	76 (9,1)	<0,001	35 (28)	25 (11,6)	<0,001
1º PPTermo (IG)	Média±DP	33,6±3,0	34,4±2,3	0,121	33,9±3	34,8±2	0,213
2º PPTermo (IG)	Média±DP	32,6±3,4	32±4,6	1,000	34±2	31,3±6	0,658

1.1.2. Dados relativos à vigilância pré-natal

Dos parâmetros incluídos na **vigilância da gravidez**, o local de vigi-
lância foi significativamente diferente, $p < 0,001$: as mulheres no grupo
PPTe^p têm maior percentagem de vigilância na maternidade (31,2 vs 12%),
e menor vigilância no Centro de Saúde (5,6 vs 14,8%), comparativamente
com as do grupo RPMPT^p - Figura 8. Na prematuridade global essas diferen-
ças não se verificam.

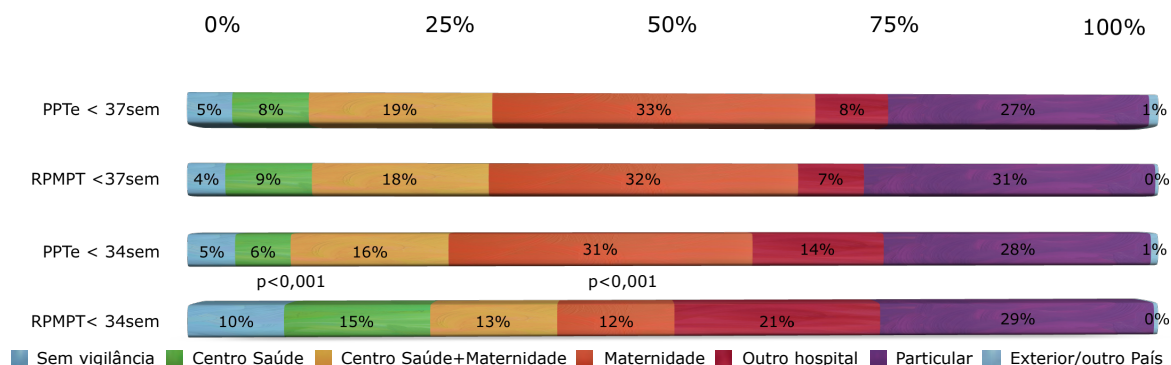


Figura 8 - Local de vigilância da gestação nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

Quanto à realização de diagnóstico pré-natal e técnicas invasivas, não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos - Tabela 3.

Tabela 3 - Realização de diagnóstico pré-natal e técnicas invasivas nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

		Vigilância da Gravidez					
		PPT <37sem		p	PPT <34 sem		p
		PPTe	RPMPT		PPTe	RPMPT	
Técnica invasiva	Amniocentese n (%)	58 (9,7)	87 (10,5)	0,514	14 (11,2)	17 (7,9)	0,303

Quanto aos exsudados cervico-vaginais positivos no 2º trimestre, estes não foram significativamente diferentes entre os dois grupos (PPTe vs RPMPT), quer para a prematuridade global, quer para a prematuridade precoce. Já a positividade para *Streptococcus* do grupo B foi significativamente superior nas RPMPT, tanto na prematuridade global como na precoce - Tabela 4.

Tabela 4 - Resultado de exsudado cervico-vaginal e pesquisa de Streptococcus grupo B nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

		Vigilância da Gravidez					
		PPT <37sem		p	PPT <34 sem		p
		PPTe	RPMPT		PPTe	RPMPT	
Exsudado cervico-vaginal positivo	n (%)	19 (43,2)	10 (33,3)	0,394	5 (41,7)	2 (18,2)	0,371
Pesquisa de <i>Streptococcus</i> grupo B positivo	n (%)	17 (16,3)	54 (33,1)	0,002	1 (5,9)	18 (66,7)	<0,001

O início da vigilância ecográfica e a ocorrência de patologia fetal não foram significativamente diferentes entre os dois grupos (PPTe vs RPMPT), quer para a prematuridade global, quer para a prematuridade precoce. O valor do comprimento cervical foi significativamente superior nas RPMPT⁹,

enquanto a IG da sua determinação foi significativamente inferior nas RPMPT, tanto na prematuridade global como na precoce - Tabela 5.

Tabela 5 - Realização de vigilância ecográfica e presença de patologia fetal nas grávidas com PPT espontâneo com e sem RPMPT.

		PPT <37sem		p	PPT <34 sem		p	
		PPTe	RPMPT		PPTe	RPMPT		
1ª Eco (semana)	Média±DP		13±4,5	12,6±4,2	0,060	12,9±4	13,7±4	0,406
Patologia fetal	Sem Patologia	n(%)	550 (92,4)	772 (92,3)		116 (93,5)	199 (92,1)	
	RCIU	n(%)	18 (3)	19 (2,3)		3 (2,4)	8 (3,7)	
	Dilat. piélica	n(%)	10 (1,7)	15 (1,8)	0,906	2 (1,6)	1 (0,5)	0,686
	Malformação	n(%)	11 (1,8)	21 (2,5)		1 (0,8)	5 (2,3)	
	Outras	n(%)	6 (1)	7 (0,8)		2 (1,6)	2 (0,9)	
Comp. Cervical (mm)	Média±DP		27,4±9,2	30,9±9,5	0,035	25,4±9,3	30,4±11,2	0,102
Det. Comp. Cervical (IG)	Média±DP		29±5	27±5	0,033	29,6±4	25,4±5	<0,001

O peso e IMC inicial e final, bem como o ganho ponderal, foi significativamente mais baixo nos PPTe⁹. Na prematuridade precoce, não se registaram diferenças significativas entre os dois grupos (PPTe vs RPMPT) - Tabela 6.

Tabela 6 - Valor médio da altura, peso e IMC inicial e final e ganho de peso nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

		PPT <37sem		p	PPT <34 sem		p
		PPTe	RPMPT		PPTe	RPMPT	
Altura (m)	Média ± DP	160,6±6,5	160,8±6,3	0,699	160,6±6	160,9±6	0,674
Peso inicial	Média ± DP	60,2±10,6	62,8±12,0	<0,001	60,7±12	61,7±11,4	0,547
IMC inicial	Média ± DP	23,3±3,9	24,3±4,5	<0,001	23,5±4,6	23,7±4,2	0,728
Peso final (Kg)	Média ± DP	70,5±11	73,7±12,3	<0,001	70,1±12,3	71,2±11,7	0,467
IMC final	Média ± DP	27,3±4,1	28,5±4,6	<0,001	27,2±4,5	27,4±4,7	0,739
Ganho	Média ± DP	10,5±4,6	11,1±4,9	0,029	9,8±4,9	9,4±5,4	0,577

As **complicações durante a gravidez** foram registadas como presentes (e neste caso registada a IG da ocorrência) ou ausentes.

As mulheres dos grupos PPTe^g e PPTe^p têm mais complicações na gravidez - 33 vs 28% (p=0,019) e 66 vs 22% (p<0,001), respetivamente. Nos PPTe^p também se verifica uma tendência linear significativa para o aumento da sua ocorrência ao longo dos anos (p=0,015), sendo que o mesmo não se verifica no grupo das RPMPT^p (p=0,224). As grávidas com PPTe^g têm uma percentagem significativamente superior de APPT (p<0,001) e, consequentemente, de internamentos anteriores (p<0,001) que as RPMPT^g. Nos PPTe^p, além de significativamente mais APPT (p<0,001) e internamentos anteriores (p<0,001), também se registaram mais ITU (p=0,022) e diabetes gestacional (p=0,013).

Apesar de não existirem diferenças entre os grupos na ocorrência de metrorragias, estas tendem a ser mais precoces tanto nas mulheres do grupo RPMPT^g (p=0,015), como no RPMPT^p (p=0,011) - Figura 9 e Tabela 7.

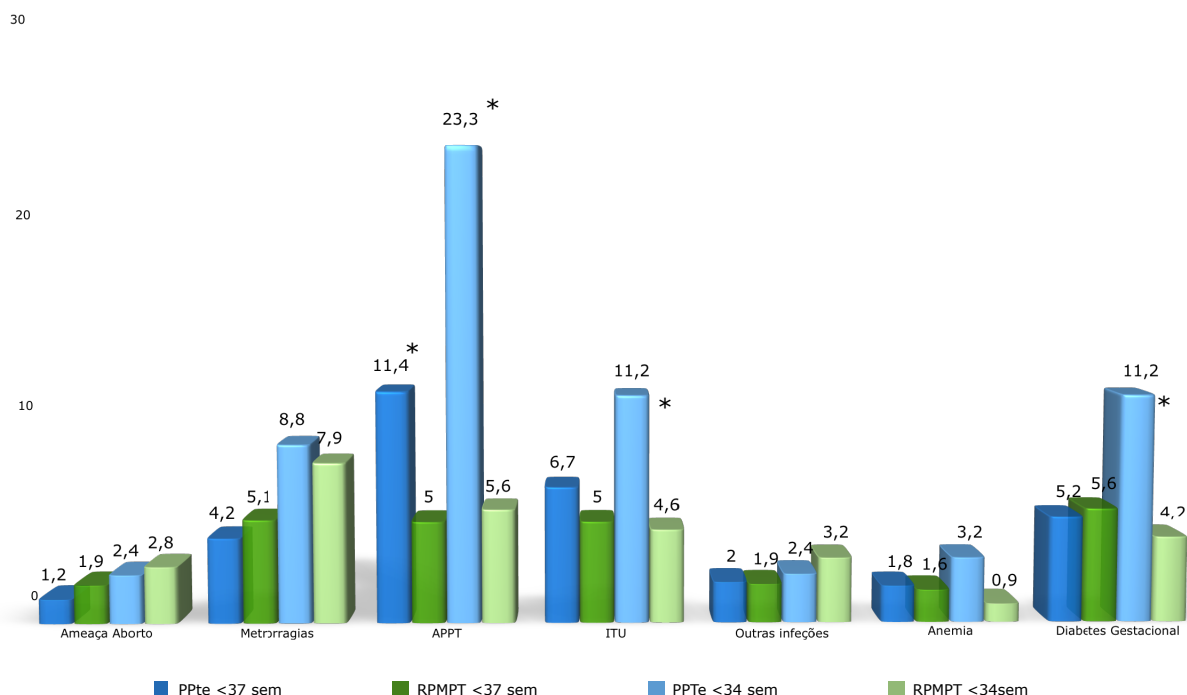


Figura 9 - Complicações registadas no decurso da gestação nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT. (*p<0,05)

Tabela 7 - Idade gestacional de ocorrência de complicações registadas no decurso da gestação nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

Complicações durante a Gravidez							
		PPT <37sem		p	PPT <34 sem		p
		PPTe	RPMPT		PPTe	RPMPT	
Metrorragias (1º IG)	Média±DP	20±8	15±7	0,015	22,9±7	14,4±7	0,011
APPT (1º IG)	Média±DP	31±3	31±3	0,631	29,9±4	29,1±3	0,364
Inf. Urinária (1º IG)	Média±DP	23±8	22±7	0,631	22,1±7	19±6	0,374

As mulheres dos grupos PPTe^g e PPTe^p têm significativamente mais episódios de internamentos durante a gravidez que as RPMPT^g e RPMPT^p (17,8 e 36,8 vs 8,6 e 10,2%; $p < 0,001$ e $p < 0,001$, respetivamente). Existe uma tendência linear significativa para o aumento do número destes internamentos ao longo dos anos ($p = 0,009$), sendo que a IG destes não é significativamente diferente nos dois grupos - Tabela 8.

Tabela 8 - Internamentos anteriores e IG da sua ocorrência no decurso da gestação nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

Complicações durante a Gravidez								
			PPT <37sem		p	PPT <34 sem		p
			PPTe	RPMPT		PPTe	RPMPT	
Internamento anterior	Sim	n (%)	106 (17,8)	72 (8,6)	<0,001	46 (36,8)	22 (10,2)	<0,001
IG Internamento anterior	Média±DP		28±7	28±7	0,679	26,6±7	25,5±6	0,305

1.1.3. Dados relativos ao internamento que culminou no parto

Os **dados do internamento** incluíram a proveniência, a IG, o motivo do internamento, o resultado das colheitas de exsudado vaginal, o resultado da determinação de comprimento cervical, o resultado da urocultura, o valor da PCR, leucócitos e VS.

Quanto à proveniência, as diferenças observadas entre os grupos são estatisticamente significativas, $p < 0,001$.

As mulheres no grupo PPTe^g têm maior percentagem de proveniência da consulta da maternidade (5,5 vs 2,8%) e de médico privado (5,7 vs 2,5%), mas menor percentagem de proveniência de outros hospitais (12,9 vs 16,6%), comparativamente com as do grupo RPMPT^g - Tabela 9.

No grupo PPTe^p há maior percentagem de proveniência da maternidade, quer da consulta (5,6 vs 1,4%) quer da urgência (62,4 vs 37%), mas menor percentagem de proveniência de outros hospitais (24,8 vs 56,5%), comparativamente com o grupo RPMPT^p - Tabela 9.

Tabela 9 - Proveniência das grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

Proveniência		PPT <37sem		p	PPT <34 sem		p
		PPTe	RPMPT		PPTe	RPMPT	
Maternidade	Urgência	423 (71,1)	618 (73,9)	<0,001	78 (62,4)	80 (37)	<0,001
	Consulta	33 (5,5)	23 (2,8)		7 (5,6)	3 (1,4)	
Centro de Saúde	28 (4,7)	35 (4,2)	2 (1,6)		7 (3,2)		
Outros Hospitais	77 (12,9)	139 (16,6)	31 (24,8)		122 (56,5)		
Particular	34 (5,7)	21 (2,5)	7 (5,6)		4 (1,9)		

As mulheres do grupo RPMPT^p são internadas significativamente mais cedo que as do PPTe^p - $30,2 \pm 2,7$ vs $32,9 \pm 3,4$ semanas ($p < 0,001$) - Figura 10.

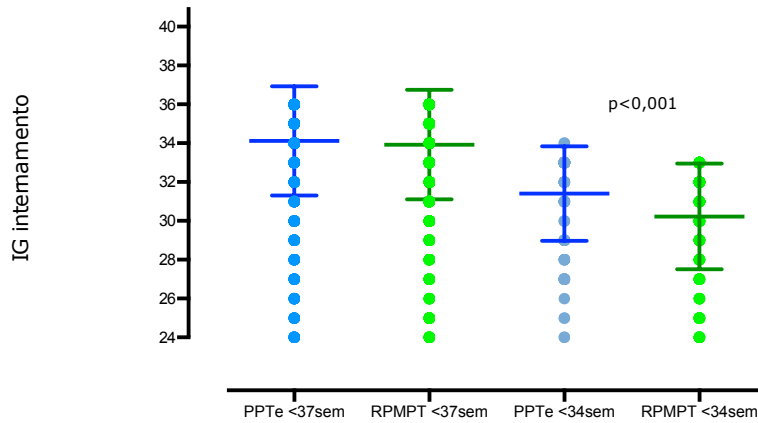


Figura 10 - Média e desvio padrão da idade gestacional ao internamento nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT (em semanas).

No que respeita à positividade dos exsudados efetuados e aos germens identificados, apenas indicado para a prematuridade precoce dado a global incorporar as IG tardias onde não é protocolo efetuar estas colheitas, não há diferenças significativas - Tabela 10.

Tabela 10 - Gérmenes identificados nos exsudados vaginais positivos ao internamento nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

	n(%)	PPT <34 sem		p
		PPTe	RPMPT	
		4 (26,7)	36 (36,4)	0,463
<i>Candida albicans</i>	n (%)	0 (0)	5 (13,9)	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	n (%)	0 (0)	2 (5,6)	
<i>Escherichia coli</i>	n (%)	1 (25)	1 (2,8)	
<i>Gardnerella vaginalis</i>	n (%)	0 (0)	1 (2,8)	
<i>Mobilluncus sp</i>	n (%)	1 (25)	0 (0)	0,072
<i>Ureaplasma urealyticum/Mycoplasma</i>	n (%)	1 (25)	22 (61,1)	
<i>Streptococcus</i> grupo B	n (%)	1 (25)	5 (13,9)	

As mulheres com RPMPT^p têm, em média, um comprimento cervical significativamente superior às dos PPTe^p 27,3 vs 15,4 mm (p<0,001), dado apenas indicado para a prematuridade precoce pelo mesmo motivo exposto no parágrafo anterior.

Quanto à positividade da urocultura e ao gérmen identificado, não existem diferenças significativas - 5,4 nas RPMPT^P vs 3,1% nos PPTe^P (p=0,704) - Tabela 11.

Tabela 11 - Gérmenes identificados nas uroculturas positivas ao internamento nas grávidas com PPT espontâneo com e sem RPMPT.

	n(%)	PPT <34 sem		p
		PPTe	RPMPT	
	n(%)	4 (26,7)	36 (36,4)	0,463
<i>Escherichia coli</i>	n (%)	1 (100)	4 (50)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	n (%)	0 (0)	3 (37,5)	1,000
<i>Proteus Mirabilis</i>	n (%)	0 (0)	1 (12,5)	

No que toca ao valor da PCR, as mulheres com roturas de membranas tem tendência a ter valores significativamente mais baixos que as grávidas sem rotura, quer nas RPMPT^g (2,19±3,6 vs 1,15±1,5 mg/L; p<0,001), quer nas RPMPT^P (1,5±2,0 vs 3,1±5,1 mg/L; p=0,005) - Figura 11.

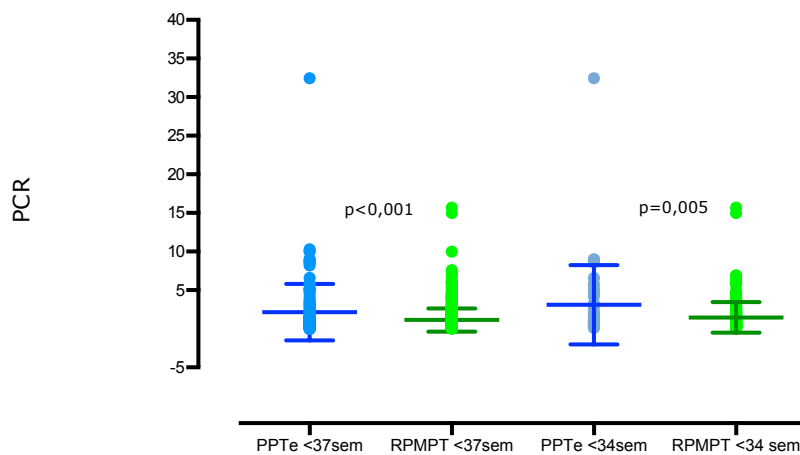


Figura 11 - Média e desvio padrão da PCR ao internamento nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

Os valores dos leucócitos são significativamente mais baixos nas RPMPT^G quando comparados com os PPTe^G ($12,4 \pm 3,7$ vs $13,3 \pm 5,8 \times 10^9/L$; $p=0,005$), mas já não o são nas RPMPT^P quando comparados com os PPTe^P ($13,6 \pm 4,2$ vs $13,6 \pm 3,9 \times 10^9/L$; $p=0,436$) - Figura 12.

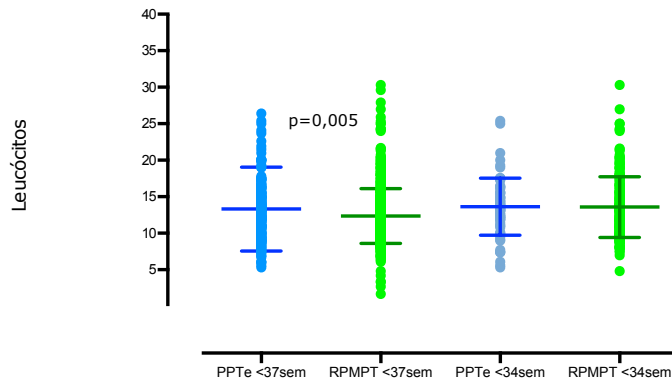


Figura 12 - Média e desvio padrão dos leucócitos ao internamento nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

Quanto aos valores da VS, não existem diferenças significativas entre os seus valores médios, quer nas RPMPT^G e PPTe^G ($49,9 \pm 23,2$ vs $45,5 \pm 19,1$; $p=0,108$), quer nas RPMPT^P e PPTe^P ($50,6 \pm 29,8$ vs $45,9 \pm 20,1$; $p=0,761$) - Figura 13.

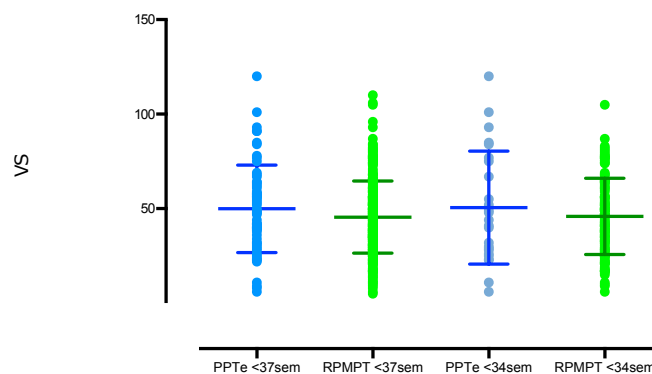


Figura 13 - Média e desvio padrão da VS ao internamento nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

A **medicação efectuada** incluiu o registo de corticoterapia para maturação pulmonar e de antibioterapia. Também aqui apenas indicamos os dados para a prematuridade precoce dado a global incorporar as IG tardias onde não é protocolo efetuar esta medicação.

As mulheres do grupo RPMPT^P têm uma significativa maior percentagem de realização de corticoterapia (93,1 vs 51,2%; $p < 0,001$), cuja administração tende a ser realizada em IG significativamente mais tardias, quando comparadas com os PPTe^P - Figura 14 e Tabela 12.

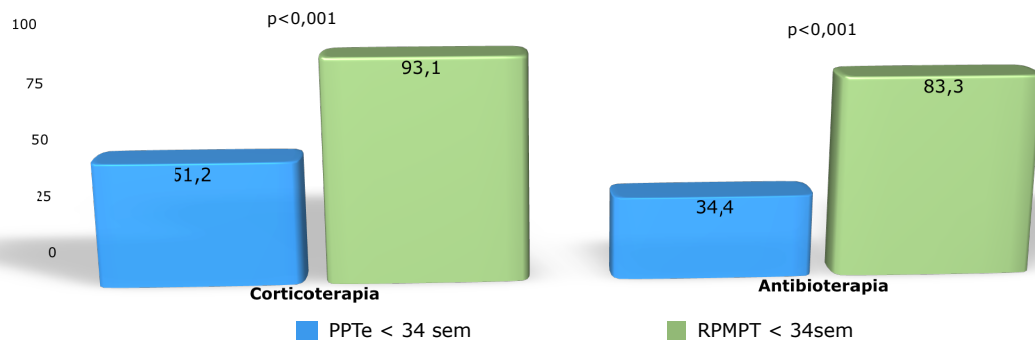


Figura 14 - Registo de administração de corticóides e antibióticos no decurso da gestação nas grávidas com PPT espontâneo precoce com e sem RPMPT.

As mulheres do grupo RPMPT^P têm a maior percentagem de realização de antibioterapia (83,3 vs 34,4%; $p < 0,001$) - Figura 14 - sendo a ampicilina ou a combinação ampicilina+gentamicina os esquemas mais utilizados.

Tabela 12 - Realização de medicação nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

a) Corticóides				
		PPT <34 sem		p
		PPTe	RPMPT	
Corticóides (IG)	Média±DP	29,4±3	30,2±3	0,040
Corticóides (tomados)	1	n (%)	11 (17,2)	0,595
	2	n (%)	52 (81,3)	

As mulheres com RPMPT^P têm um **prolongamento da gravidez** significativamente superior aos PPTe^P (62 vs 26,4%, $p < 0,001$) - Figura 15.

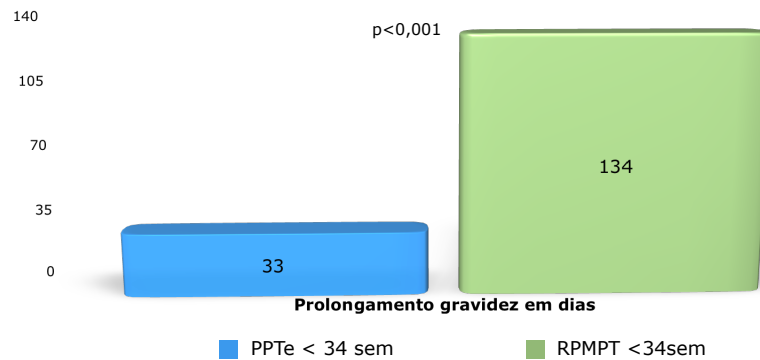


Figura 15 - Prolongamento da gravidez, em dias, após internamento nas grávidas com PPT espontâneo precoce, com e sem RPMPT.

1.1.4. Dados relativos ao parto e puerpério

Nos **dados do parto**, e quanto à IG da sua ocorrência, esta tende a ser: mais precoce no grupo RPMPT^P ($34,2 \pm 2,3$ vs $34,3 \pm 2,6$ semanas; $p = 0,002$), com maior taxa de cesarianas (31,3 vs 18,5%; $p < 0,001$), nomeadamente por EFNT (31,4 vs 20,9%; $p = 0,001$); mais tardia no grupo RPMPT^P ($30,9 \pm 2,3$ vs $30,1 \pm 2,7$ semanas; $p = 0,008$), com maior taxa de cesarianas (50,9 vs 23,2%; $p < 0,001$), nomeadamente por EFNT (35,5 vs 13,8%; $p = 0,031$) - Figuras 16 a 18.

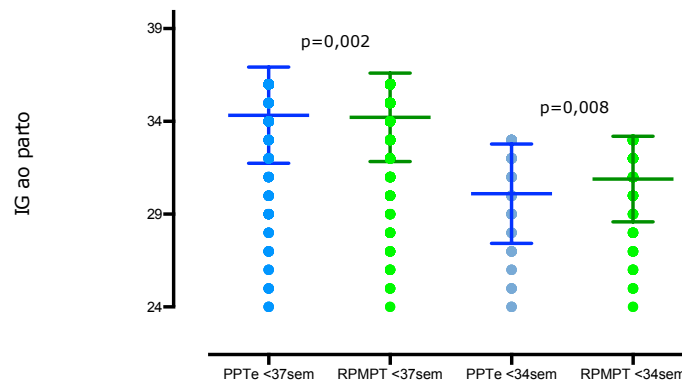


Figura 16 - Idade gestacional ao parto nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT (em semanas).

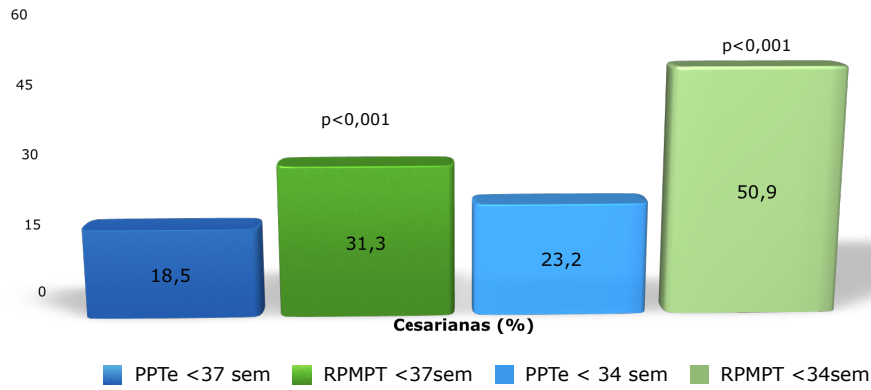


Figura 17 - Taxa de cesarianas nas grávidas com PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

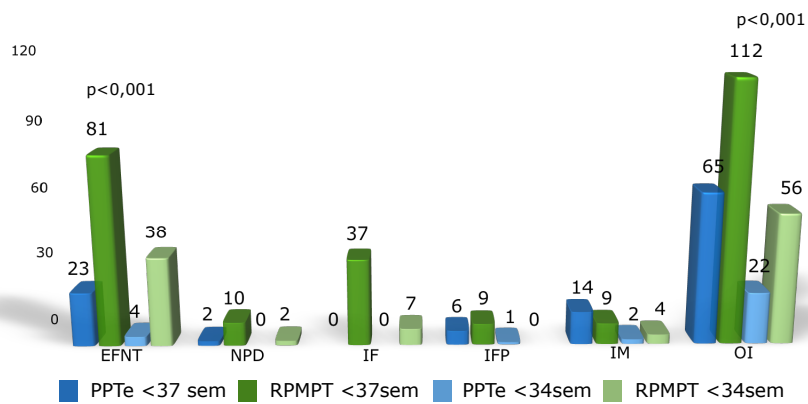


Figura 18 - Indicação operatória na prematuridade global e precoce, com e sem RPMPT.

Quanto aos dados do RN, não existem diferenças quanto ao sexo fetal, peso ao nascimento e índice APGAR <5 ao 1º e <7 ao 5º minuto de vida - Tabela 13.

Tabela 13 - Dados relativos ao recém-nascido - sexo, peso ao nascer e índices de APGAR.

		Parto							
		PPT <37sem			p	PPT <34 sem			p
		PPTe	RPMPPT	PPTe		RPMPPT			
Sexo RN	Masculino	n (%)	333 (56,2)	443 (53,3)	0,288	66 (53,2)	120 (56,3)	0,580	
Peso RN (gr)	Média±DP		2470±621	2420±590	0,124	1622±528	1713±497	0,115	
APGAR 1ºmin	<5	n (%)	19 (3)	32 (3,9)	0,847	10 (8,5)	22 (18,8)	0,248	
APGAR 5ºmin	<7	n (%)	10 (1,7)	9 (1,1)	0,559	6 (5,2)	6 (2,9)	0,465	

Os **dados da placenta** não apresentam diferenças significativas - Tabela 14.

Tabela 14 - Estudo bacteriológico e histológico da placenta nos PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPPT.

		Placenta			
			PPT	RPMPPT	p
Estudo Bacteriológico	Positivo	n(%)	4 (13,3)	3 (4,5)	0,200
Estudo Histológico	Fez	n(%)	91 (74,6)	160 (74,1)	0,917

No que respeita a **complicações no puerpério**, verificou-se que o grupo das RPMPPT apresenta mais complicações no total, quer na prematuridade global (7,3 vs 4,3%; p=0,014), quer na prematuridade precoce (12 vs 4%; p=0,019), mas nenhuma complicação específica - Figura 19.

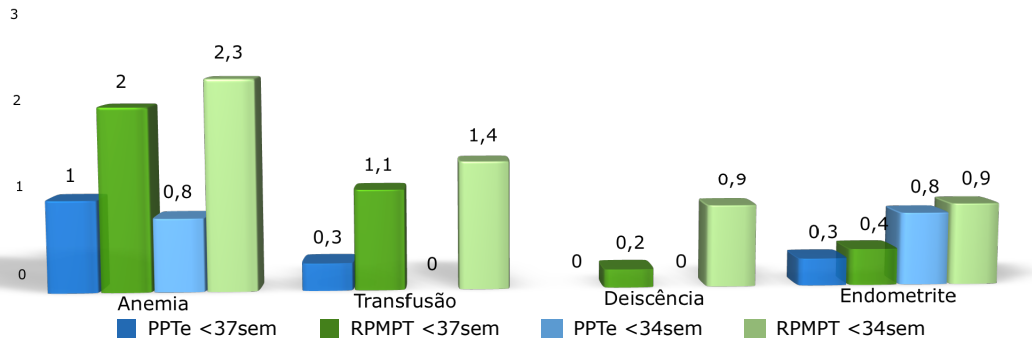


Figura 19 - Complicações registadas no puerpério de PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

1.1.5. Dados neonatais

A admissão na UCIN, nos partos com e sem RPMPT, foi idêntica na prematuridade global e precoce - Figura 20.

Verificou-se existirem diferenças significativas nos **dados do recém-nascido**: os PPTe^g apresentam significativamente mais morbidade neonatal (16,2 vs 12,2%; $p=0,032$), à custa de superior morbidade neurológica (4,7 vs 2,8%; 0,048); os PPTe^p apresentam taxas superiores de morbidade neonatal (46,7 vs 32,1%; $p=0,008$), em particular neurológica (19,7 vs 8,8%; $p=0,004$) e SDR (42,4 vs 29,6%; $p=0,017$) - Figura 21.

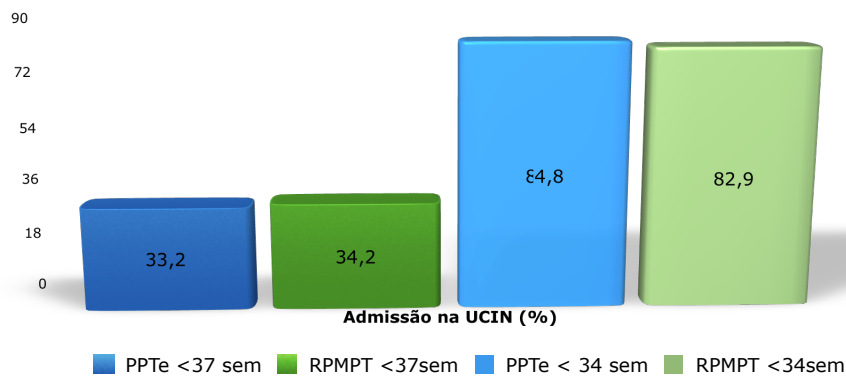


Figura 20 - Taxa de admissões na UCIN em PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT.

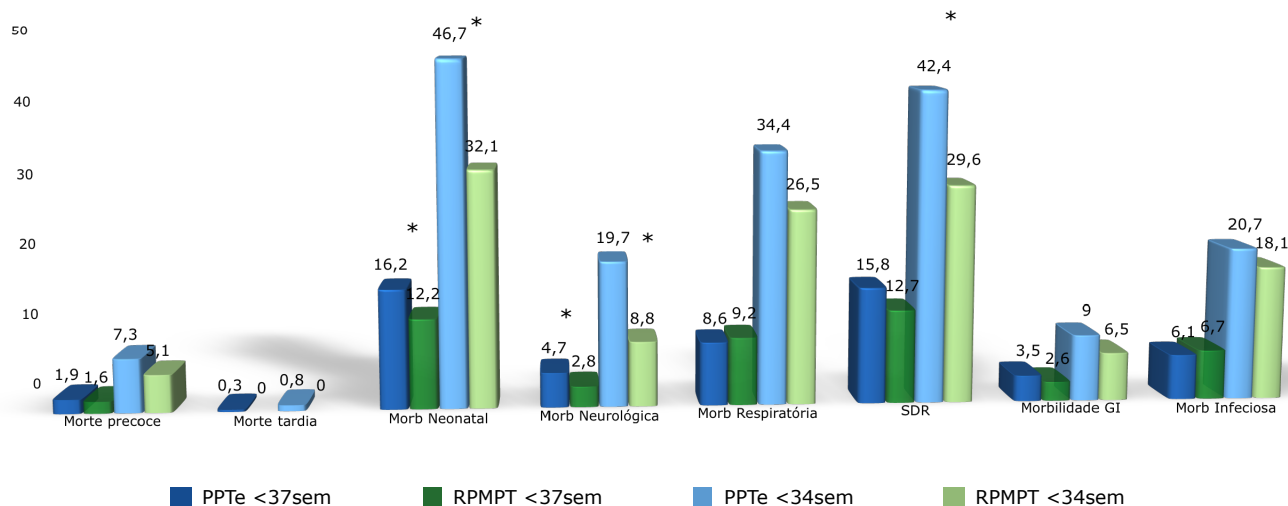


Figura 21 - Mortalidade e morbidade neonatal dos PPT espontâneo global e precoce, com e sem RPMPT. (*p<0,05)

1.2. Fatores associados a parto pré-termo precoce com e sem rotura prematura de membranas

Perante as diferenças nos resultados, efectuámos uma análise no sentido de identificar fatores associados ao PPT precoce com e sem RPMPT.

No caso de PPTe^p, a análise efectuada determinou que a existência de complicações durante a gravidez (nomeadamente metrorragias, diabetes gestacional e internamentos anteriores) estão associados a um risco superior da sua ocorrência - Tabela 15.

Tabela 15 - Fatores associados a parto prematuro espontâneo precoce sem RPMPT.

	p-Valor	OR (IC95%)		
		OR	LI	LS
Complicações durante grav.: Metrorragias	0,022	2,796	1,157	6,758
Complicações durante grav.: Intern. Anterior	0,002	2,260	1,342	3,806
Complicações durante grav.: D. gestacional	0,001	4,242	1,870	9,627

Quando as mulheres não trabalham, são provenientes de outros hospitais e apresentam valores de leucócitos à entrada iguais ou superiores a $13 \times 10^9/L$, têm uma probabilidade aumentada de RPMPT^p. Pelo contrário, o fato de terem na gravidez uma APPT, está associado a um risco inferior - Tabela 16.

Tabela 16 - Fatores associados a parto prematuro espontâneo precoce com RPMPT.

	p-Valor	OR (IC95%)		
		OR	LI	LS
D. Dem.: Trabalho não renumerado	0,005	4,230	1,540	11,618
Proveniência: Outros hospitais	<0.001	12,202	5,193	28,670
Durante internamento: Leuc ≥ 13	0,002	2,990	1,475	6,064
Complicações durante grav.: APPT	<0.001	0,100	0,030	0,330

1.3. Fatores associados a morbidade neonatal

Perante as diferenças nos resultados neonatais, efectuámos uma análise no sentido de identificar fatores associados a morbidade neonatal nos PPTe^p e RPMPT^p, entre as variáveis consideradas anteriormente.

Nos resultados neonatais verificámos que existiam diferenças significativas, entre os PPTe^P e RPMPT^P, para a morbilidade neonatal no seu geral, para a morbilidade neurológica e para a ocorrência de SDR, sendo as taxas de ocorrência significativamente superiores no grupo do PPTe^P.

No caso da morbilidade neonatal no seu geral, a regressão logística efectuada determinou que a presença de RPMPT^P se associa a uma diminuição do risco, enquanto a existência de complicações na gravidez aumentam 1,6x o risco de morbilidade neonatal - Tabela 17.

Tabela 17 - Fatores associados a morbilidade neonatal

	p-Valor	OR (IC95%)		
		OR	LI	LS
Tipo de PPT: RPMPT (comparando com PPT)*	0,057	0,792	0,622	1,007
Presença de Complicações durante grav.	0,048	1,610	1,004	2,582

No caso da morbilidade neurológica, a regressão logística efectuada determinou que a presença de RPMPT^P se associa a uma diminuição do risco da sua ocorrência, enquanto a toma de antibióticos ao internamento se associa a um aumento de 2,7x do risco da sua ocorrência - Tabela 18.

Tabela 18 - Fatores associados a morbilidade neonatal neurológica

	p-Valor	OR (IC95%)		
		OR	LI	LS
Tipo de PPT: RPMPT (comparando com PPT):	0,001	0,520	0,357	0,757
Medic. Grav.: Antibióticos	0,019	2,725	1,181	6,286

No caso do SDR, a regressão logística determinou que a presença de RPMPT^P está associada a uma diminuição do risco, enquanto a ameaça de

abortamento durante a gravidez aumenta 4,1x o risco da sua ocorrência-

Tabela 19.

Tabela 19 - Fatores associados a SDR

	p-Valor	OR (IC95%)		
		OR	LI	LS
Tipo de PPT: RPMPT (comparando com PPT	0,015	0,751	0,596	0,947
Complicações durante grav.: A. Aborto	0,048	4,162	1,010	17,155

2. Estudo genético

2.1. Genotipagem do *DEFB1/HBD1*

Os SNPs c.-20G>A, c.-44G>C e c.-52G>A do gene *DEFB1/HBD1* foram analisados em 22 mulheres com RPMPT^P e em 102 controlos com partos a termo.

As frequências genotípicas de todos os SNPs estudados estavam em equilíbrio Hardy-Weinberg, tanto nos casos como nos controlos.

2.1.1. SNP c.-20G>A

O resultado da análise do SNP c.-20G>A do *DEFB1/HBD1* após a PCR em tempo real está representada na Figura 22 para o grupo das mulheres com RPMPT^P (A) e controlos (B).

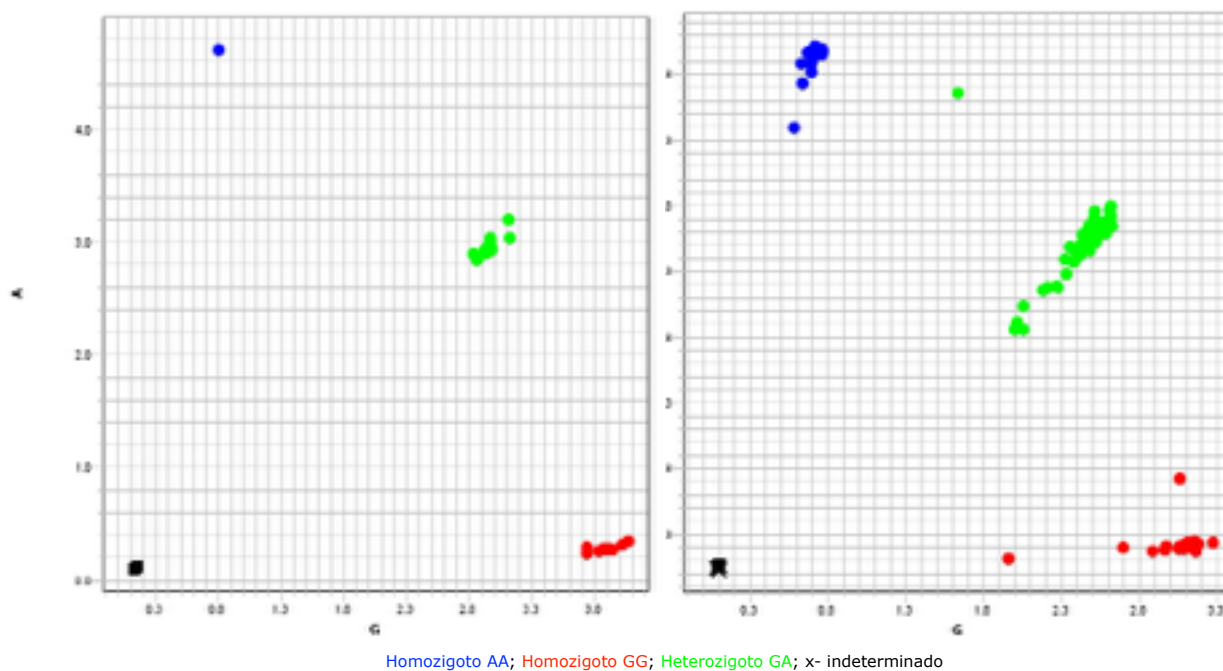


Figura 22 - Distribuição alélica para o ensaio c.-20G>A no grupo das RPMPT^P (A) e nos controles (B).

Não se observaram diferenças significativas nas frequências genotípicas e alélicas do SNP c.-20G>A entre o grupo das RPMPT^P e os controles (Tabela 20).

Tabela 20 - Frequência genotípica e alélica do SNP c.-20G>A.

SNP c.-20G>A	RPMPT	Controlos (n=101)	valor de p e OR (IC95%)
	n (frequência)	n (frequência)	
GENÓTIPO	G/G	9 (0,409)	p=0,398
	G/A	12 (0,60)	
	A/A	1 (0,045)	
ALELO	G	30 (0,682)	p=0,31; OR 0,66 (0,33-1,31)
	A	14 (0,318)	

A análise da distribuição das frequências dos genótipos e dos alelos nas mulheres com RPMPT de acordo com os parâmetros idade da grávida, IG da RPMPT, valor da PCR e leucócitos, infecção cervico-vaginal, IG ao parto e morbidade neonatal, encontra-se representada nas Figuras 23-27 e na Tabela 21. Esta análise revelou que os recém-nascidos de mulheres portadoras do alelo A apresentam um efeito protetor na ocorrência de SDR, $p=0,03$ (OR=0,09; IC 0,01-0,66).

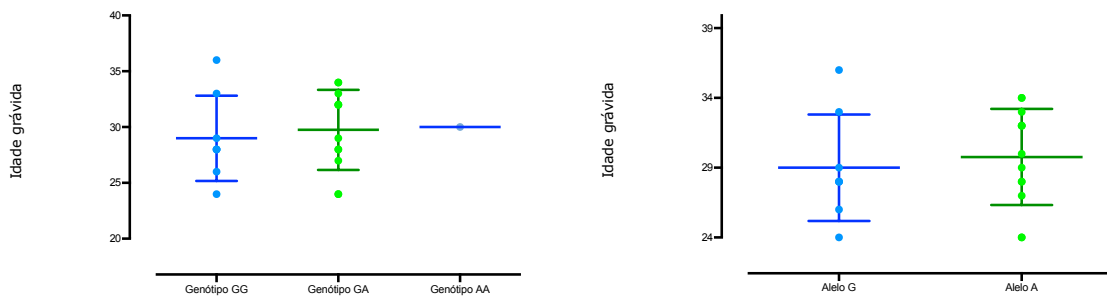


Figura 23 - Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-20G>A no grupo das RPMPT^P, de acordo com a idade da grávida.

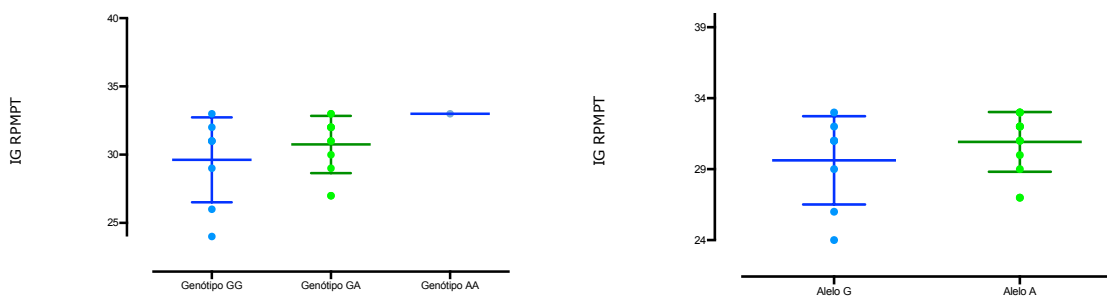


Figura 24 - Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-20G>A no grupo das RPMPT^P, de acordo com a IG da RPMPT.

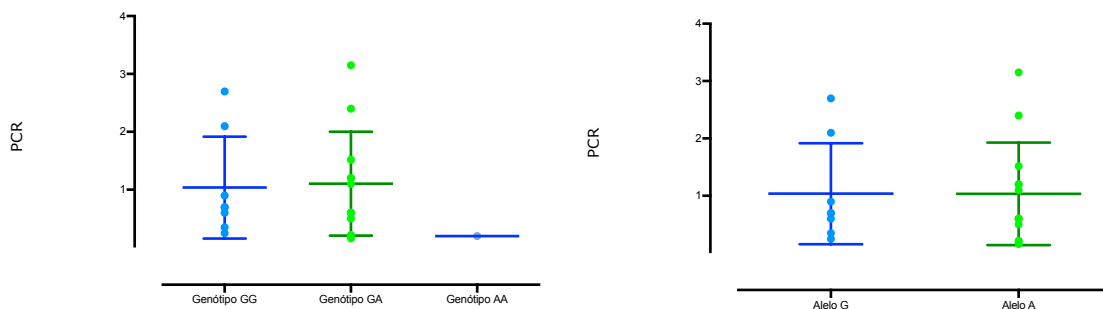


Figura 25 - Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-20G>A no grupo das RPMPT^P, de acordo com o valor da PCR.

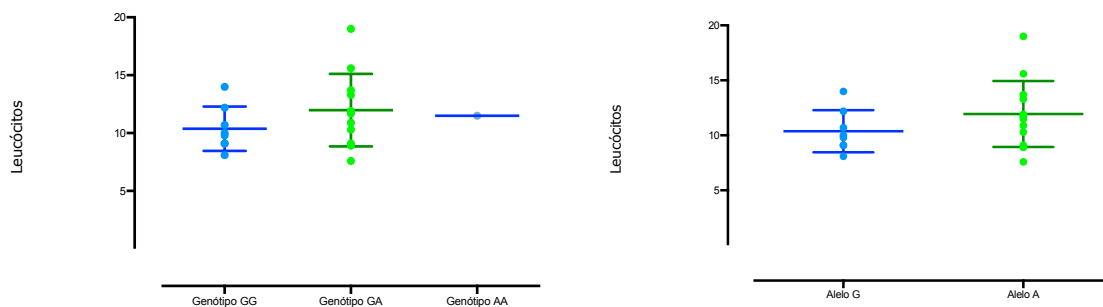


Figura 26 - Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-20G>A no grupo das RPMPT^P, de acordo com o valor dos leucóцитos.

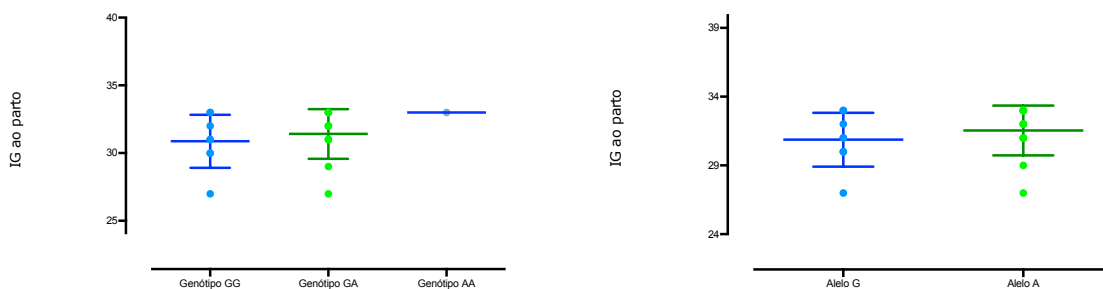


Figura 27 - Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-20G>A no grupo das RPMPT^P, de acordo com a IG ao parto.

Tabela 21 - Distribuição de fatores clínicos de acordo com os genótipos e alelos do SNP c.-20G>A, no grupo de mulheres com RPMPT^p (n=22).

	Genótipos n(frequência)				Alelos n(frequência)		
	G/G	G/A	A/A	p	G	A	p
Infecção cervico-vaginal	3 (0,33)	4 (0,33)	0 (0)	0,780	3 (0,33)	4 (30,8)	1,000
Morbilidade neonatal	5 (0,56)	4 (0,33)	0 (0)	0,41	5 (0,56)	4 (30,8)	0,380
Morbilidade neurológica	1 (0,11)	1 (0,09)	0 (0)	0,93	1 (0,11)	1 (0,08)	1,000
Morbilidade respiratória	5 (0,56)	5 (0,71)	0 (0)	0,53	5 (0,56)	5 (0,38)	0,67
SDR	7 (0,78)	4 (0,33)	0 (0)	0,078	7 (0,78)	3 (0,30)	0,03*
Morbilidade infecciosa	3 (0,33)	3 (0,25)	0 (0)	0,75	3 (0,33)	3 (0,30)	0,66

*p<0,05

2.1.2. SNP c.-44G>C

O resultado da análise do SNP c.-44G>C do *DEFB1/HBD1* após a PCR em tempo real está representada na Figura 28 para o grupo das mulheres com RPMPT^p e controlos.

Não se observaram diferenças significativas nas frequências genotípicas e alélicas do SNP c.-44G>C entre o grupo das RPMPT^p e os controlos (Tabela 22).

Tabela 22 - Frequência genotípica e alélica do SNP c.-44G>C.

SNP c.-44G>C		RPMPT n (frequência)	Controlos (n=102) n (frequência)	valor de p e OR (IC95%)
GENÓTIPO	G/G	0 (0)	2 (0,02)	p=0,580
	G/C	9 (0,41)	32 (0,31)	
	C/C	13 (0,591)	68 (0,67)	
ALELO	G	9 (0,205)	36 (0,18)	p=0,66; OR 0,83 (0,37-1,89)
	C	35 (0,795)	168 (0,82)	

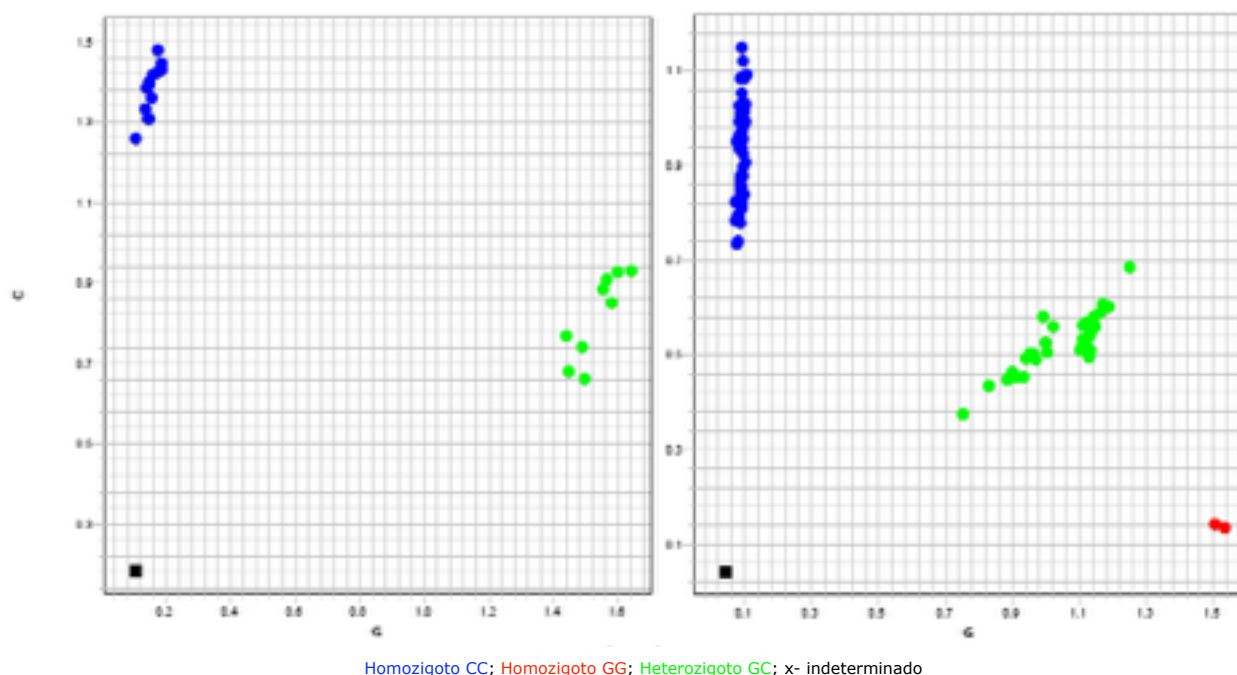


Figura 28 - Distribuição alélica para o ensaio c.-44G>C no grupo RPMPT (A) e controles (B).

A análise da distribuição das frequências dos genótipos e dos alelos nas mulheres com RPMPT^p de acordo com os parâmetros idade da grávida, IG da RPMPT, valor da PCR e leucócitos, infecção cervico-vaginal, IG ao parto e morbidade neonatal, encontra-se representada nas Figuras 29-33 e na Tabela 23. Esta análise não revelou alterações significativas.

Tabela 23 - Distribuição de fatores clínicos de acordo com os genótipos e alelos do SNP c.-44G>C, no grupo de mulheres com RPMPT^p (n=22).

	Genótipos n(frequência)				Alelos n(frequência)		
	G/G	G/C	C/C	p	G	C	p
Infeção cervico-vaginal	0 (0)	3 (0,33)	4 (0,31)	0,870	3 (0,33)	7 (0,32)	1,000
Morbilidade neonatal	0 (0)	4 (0,44)	5 (0,38)	0,93	4 (0,44)	9 (0,41)	1,000
Morbilidade neurológica	0 (0)	0 (0)	2 (0,15)	0,14	0 (0)	2 (0,09)	1,000
Morbilidade respiratória	0 (0)	5 (0,56)	5 (0,38)	0,73	5 (0,56)	5 (0,23)	0,11
SDR	0 (0)	5 (0,56)	6 (0,46)	0,91	5 (0,56)	6 (0,38)	0,11
Morbilidade infecciosa	0 (0)	2 (0,22)	4 (0,31)	0,72	2 (0,22)	4 (0,18)	1

*p<0,05

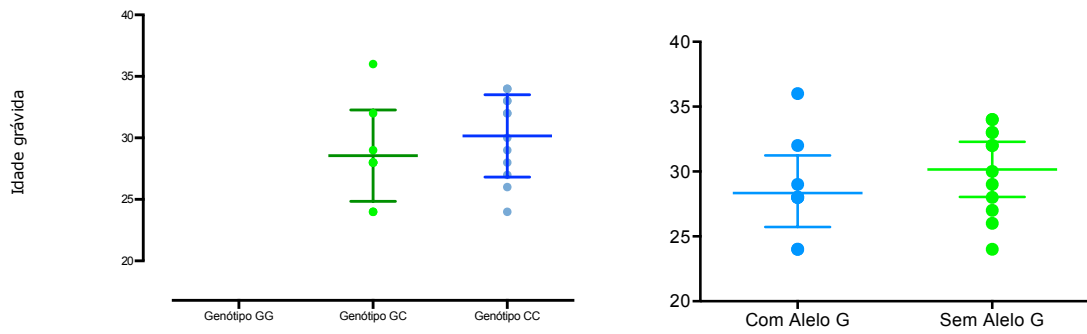


Figura 29 - Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-44G>C no grupo das RPMPT^P, de acordo com a idade da grávida.

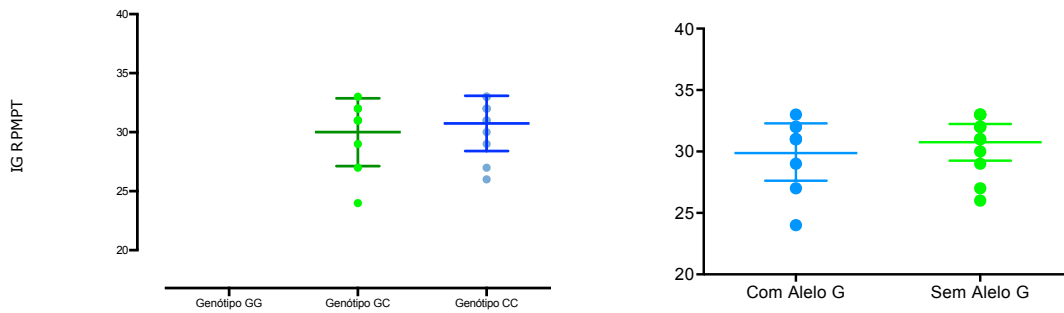


Figura 30 - Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-44G>C no grupo das RPMPT^P, de acordo com a IG da RPMPT.

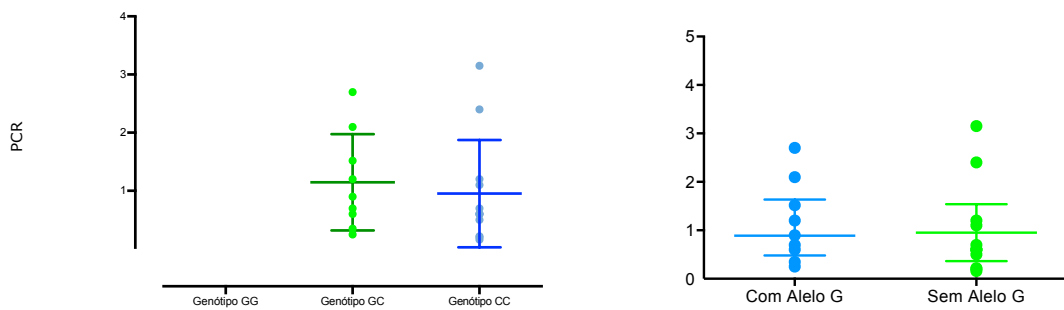


Figura 31 - Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-44G>C no grupo das RPMPT^P, de acordo com o valor da PCR.

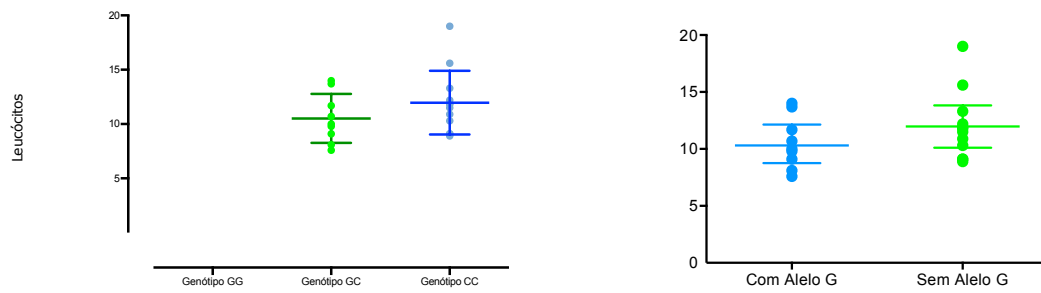


Figura 32 - Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-44G>C no grupo das RPMPT^P, de acordo com o valor de leucócitos.

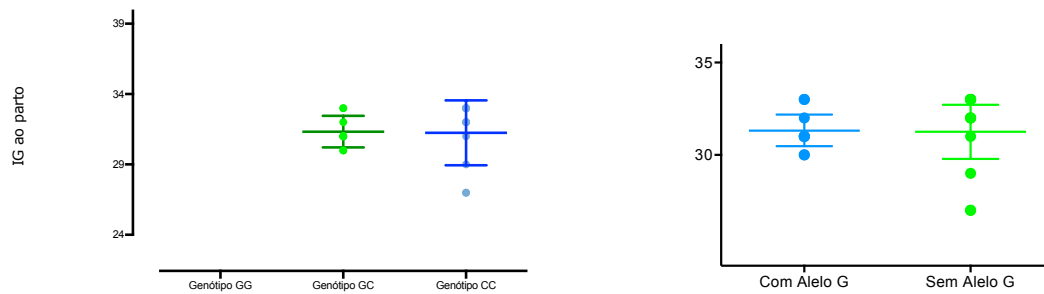


Figura 33 - Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-44G>C no grupo das RPMPT^P, de acordo com a IG ao parto.

2.1.3.SNP c.-52G>A

O resultado da análise do SNP c.-52G>A do *DEFB1/HBD1* após a PCR em tempo real está representada na Figura 34, para o grupo das mulheres com RPMPT^P e respetivos controlos.

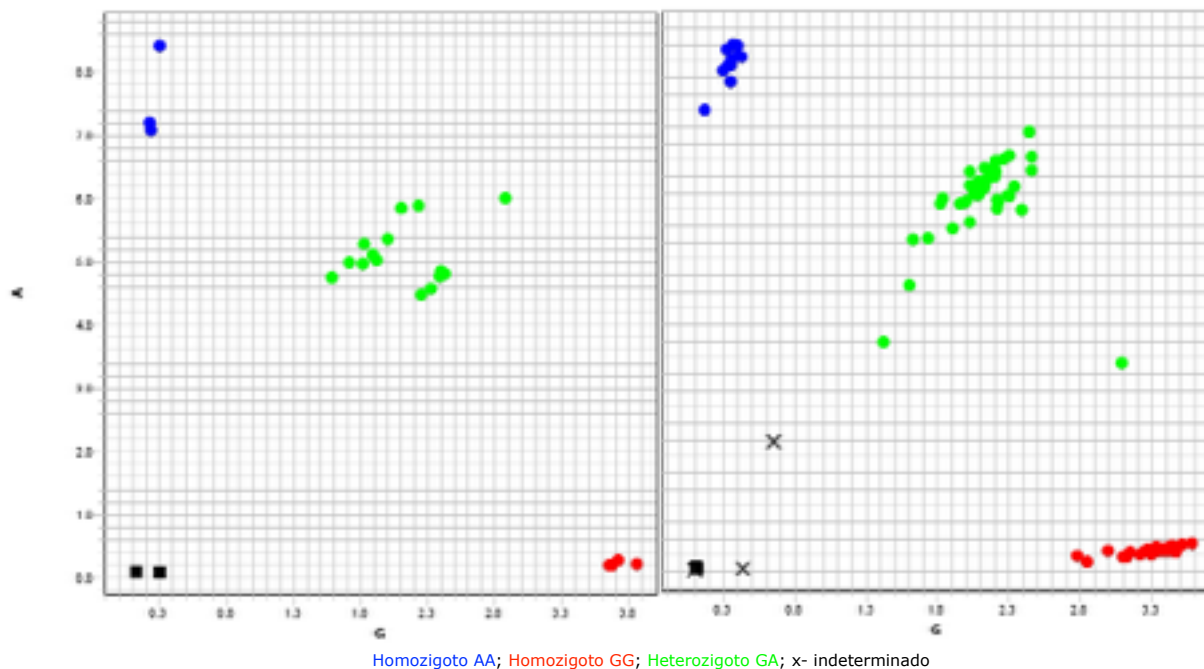


Figura 34 - Distribuição alélica para o ensaio c.-52G>A no grupo das RPMPT (A) e nos controles (B).

Não se observaram diferenças significativas nas frequências genotípicas e alélicas do SNP c.-52G>A entre o grupo das RPMPT^P e os controles (Tabela 24).

Tabela 24 - Frequência genotípica e alélica do SNP c.-52G>A.

SNP c.-52G>A	RPMPT		Controlos (n=101)		valor de p e OR (IC95%)
	n (frequência)		n (frequência)		
GENÓTIPO	G/G	4 (0,18)	34 (0,33)		p= 0,327
	G/A	15 (0,68)	53 (0,52)		
	A/A	3 (0,14)	15 (0,15)		
ALELO	G	23 (0,52)	121 (0,59)		p=0,404; OR 1,33 (0,692-2,561)
	A	21 (0,48)	83 (0,41)		

A análise da distribuição das frequências dos genótipos e dos alelos nas mulheres com RPMPT^P de acordo com os parâmetros idade da grávida, IG da RPMPT, valor da PCR e leucócitos, infecção cervico-vaginal, IG ao parto e morbidade neonatal, encontra-se representada nas Figuras 35-39 e na Tabela 25. Esta análise não revelou diferenças significativas.

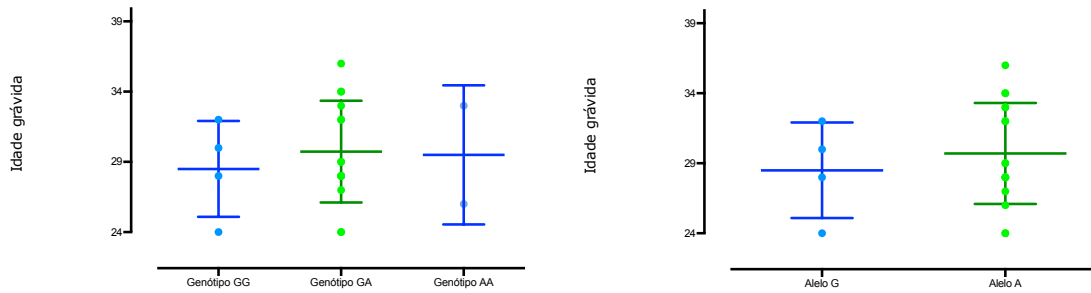


Figura 35 - Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-52G>A no grupo das RPMPT^P, de acordo com a idade da grávida.

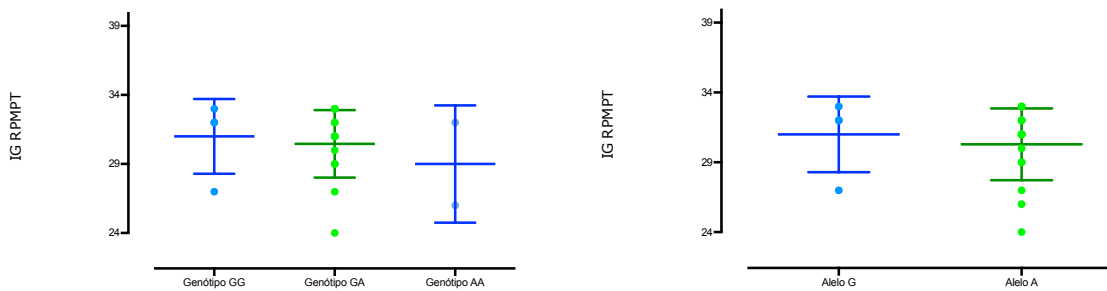


Figura 36 - Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-52G>A no grupo das RPMPT^P, de acordo com a IG da RPMPT.

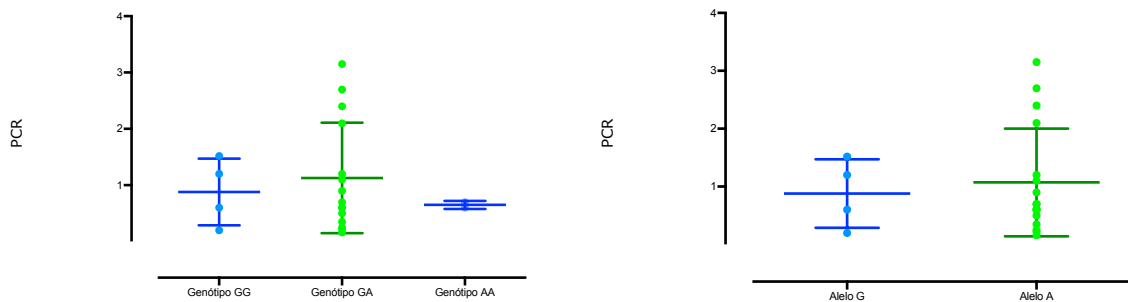


Figura 37 - Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-52G>A no grupo das RPMPT^P, de acordo com o valor da PCR.

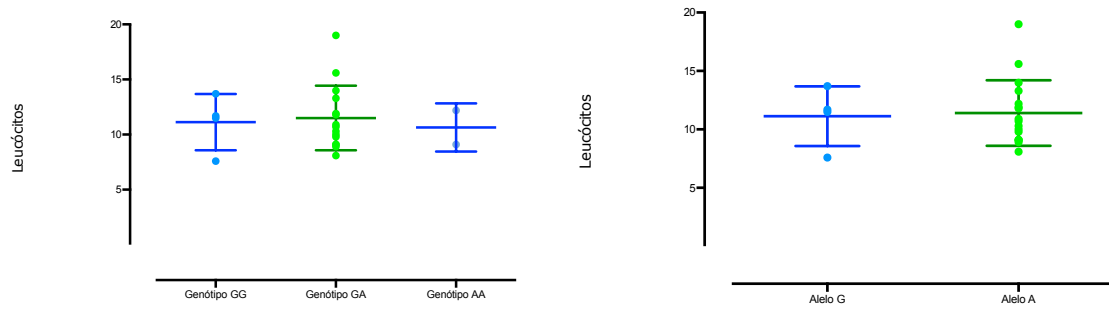


Figura 38 - Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-52G>A no grupo das RPMPT^p, de acordo com o valor dos leucócitos.

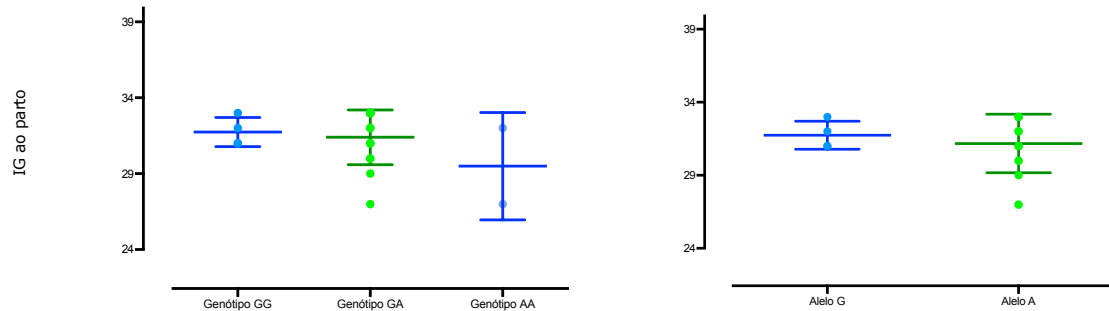


Figura 39 - Distribuição genotípica (A) e alélica (B) do ensaio c.-52G>A no grupo das RPMPT^p, de acordo com a IG ao parto.

Tabela 25 - Distribuição de fatores clínicos de acordo com os genótipos e alelos do SNP c.-52G>A, no grupo de mulheres com RPMPT^p (n=22).

	Genótipos n(frequência)				Alelos n(frequência)		
	G/G	G/A	A/A	p	G	A	p
Infeção cervico-vaginal	0 (0)	7 (0,47)	0 (0)	0,090	0 (0)	7 (0,39)	0,260
Morbilidade neonatal	1 (0,25)	6 (0,40)	0 (0)	0,54	1 (0,11)	8 (0,80)	0,620
Morbilidade neurológica	0 (0)	1 (0,07)	0 (0)	0,27	0 (0)	2 (0,11)	1,000
Morbilidade respiratória	2 (0,50)	6 (0,40)	0 (0)	0,68	2 (0,50)	8 (0,80)	1
SDR	0 (0)	9 (0,60)	0 (0)	0,09	0 (0)	11 (0,61)	0,09
Morbilidade infecciosa	0 (0)	5 (0,50)	0 (0)	0,39	0 (0)	6 (0,33)	0,54

2.1.4. Haplotipos

A análise dos haplotipos dos 3 SNP c.-20G>A, c.-44G>C e c.-52G>A apresentam-se na Tabela 26. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos haplotipos entre os grupos.

Tabela 26 - Frequências dos haplótipos dos SNP do DEFB1 (-20G>A/-44G>C/-52G>A) em mulheres com RPMPTp e controlos.

Haplotipos	RPMPTp	Controlos (n=102)	p
GCA	0,477	0,404	0,372
ACG	0,318	0,408	0,269
GGG	0,204	0,168	0,566

V. DISCUSSÃO

1. Seleção das amostras

1.1. Caracterização da prematuridade espontânea

Para esta caracterização escolhemos avaliar todos os casos de parto pré-termo (24 semanas e 0 dias a 36 semanas e 6 dias), fazendo a caracterização desta amostra global e simultaneamente da prematuridade precoce (24 semanas e 0 dias a 33 semanas e 6 dias) dado considerarmos que a prematuridade tardia (70,6% partos) poderia contribuir para um enviesamento dos resultados globais, uma vez que a atitude clínica, os objetivos da terapêutica e as consequências neonatais são distintas nestes dois intervalos da idade gestacional. Na prematuridade precoce é universalmente aceite um tratamento conservador, o que corresponde a um prolongamento da gravidez no sentido de melhorar os resultados neonatais, o mesmo já não acontecendo na prematuridade tardia. Pareceu-nos ser uma amostra mais homogénea e sem dúvida o grupo mais preocupante em termos de mortalidade e morbidade neonatal.

1.2. Estudo genético

A escolha da amostra para este estudo foi efetuada após a análise da caracterização da prematuridade espontânea precoce e recaiu sobre o grupo das RPMPT^p por, na literatura e em comparação com o grupo PPTe^p, se associarem a níveis mais elevados de inflamação amniótica traduzida pela presença de defensina no líquido amniótico (Buhimschi CS 2007, Buhimschi, Rosenberg et al. 2008, Tambor, Kacerovsky et al. 2013). Todos os estudos disponíveis na literatura incluíram partos pré-termo <37 semanas, mas concluíram que as mulheres que apresentavam os biomarcadores proteómi-

cos positivos, incluindo a defensina, manifestavam uma IG ao parto significativamente mais precoce (média pelas 30-31 semanas) pelo que o estudo do *DEFB1/HBD1* nas RPMPT^P se revelava adequado na amostragem do presente estudo.

2. Caracterização da prematuridade espontânea precoce

A taxa global de prematuridade correspondente à nossa amostra (7,5%) no intervalo de tempo estudado, é sobreponível à incidência registrada a nível nacional em 2012 pelo INE (INE 2013), e está dentro do intervalo descrito na literatura (6-12%) (Romero, Espinoza et al. 2008, Cobo, Palacio et al. 2009, Stella, Bennett et al. 2009). Apesar da inexistência de tendência linear, quer de aumento quer de diminuição, da sua frequência neste período, verificamos uma subida em relação aos 5,7% registados no serviço no biénio 1994/1995¹, o que estando de acordo com os dados nacionais, também reflete a evolução dos cuidados perinatais, que levou a um aumento da iatrogenia.

Dentro de toda a prematuridade, 29,4% de partos ocorreram abaixo das 34 semanas; destes, 58,5% foram consequência de um PPT espontâneo, dos quais, 63,3% associados a RPMPT. Assim, verificamos que dentro da prematuridade espontânea precoce, as RPMPT são o principal grupo, com uma taxa superior aos 48,1% registados no serviço no biénio 1994/1995.

Verificamos que nos **dados demográficos**, a idade materna, o estado civil, a situação laboral e a residência não apresentaram diferenças signifi-

¹ dados do serviço analisados em 1996 num trabalho coordenado pela Sra. Dra. Isabel Fagulha

cativas entre os grupos PPTe^P e RPMPT^P. Também não se registou qualquer tendência linear ao longo dos anos analisados, nas frequências dos vários parâmetros. Estes resultados são idênticos aos da prematuridade espontânea global (<37 semanas IG), o que nos faz concluir que os dados demográficos não sofreram grandes alterações ao longo deste período, nem influenciam o tipo de prematuridade espontânea, quer em termos da IG da sua ocorrência quer em termos da sua etiologia. Esta inexistência de alterações nos antecedentes socio-demográficos da prematuridade precoce, ao longo deste período temporal, contrasta com outros estudos que revelam um aumento significativo da média da idade materna e da primiparidade. No entanto, estes estudos apesar de compararem abaixo das 37 semanas os diferentes tipos de prematuridade entre si, não estratificam a prematuridade por IG ou tipo de PPT, fazendo com que esse aumento seja, em muito, devido à prematuridade iatrogénica que os autores também englobam na análise (Hammond, Langridge et al. 2013).

No que respeita aos **antecedentes pessoais e familiares patológicos**, verificamos que não existem diferenças significativas entre a RPMPT^P e o PPTe^P, o que está de acordo com os dados da prematuridade global, mas diverge de outros estudos sobre caracterização de fatores de risco para PPT, que reportam um aumento significativo de condições médicas pré-existent. Mais uma vez, o fato de estes autores englobarem na sua análise todos os tipos de prematuridade e IG ao parto <37 semanas, pode explicar estas diferenças (Hammond, Langridge et al. 2013).

A avaliação dos dados demográficos e dos antecedentes pessoais ou familiares apenas na prematuridade espontânea precoce não se encontra especificamente abordada na literatura, onde a maioria dos estudos se refe-

re a prematuridade global. Assim sendo, podemos concluir que os fatores de risco apontados estarão mais diretamente relacionados com a prematuridade tardia do que com a precoce, dado termos verificado não haver diferenças relativamente a estes parâmetros neste segmento importante de prematuridade.

Quanto aos **antecedentes obstétricos**, não se registaram diferenças significativas, nem qualquer tendência linear, nos antecedentes de esterilidade, gravidez induzida e paridade entre as grávidas com RPMPT^P e PPTe^P. Apesar de continuarmos a não ter qualquer tendência linear, verificamos que as mulheres com RPMPT^g são mais frequentemente nulíparas (59,7 vs 49,3%, $p < 0,001$) que as com PPTe^g. Esta estabilidade nas frequências destes parâmetros para a prematuridade precoce ao longo dos anos também contrasta com a literatura, mas poderá ser explicável por esta subdivisão não ser considerada por outros autores, e o facto de incluírem a iatrogenia e a prematuridade tardia fazer com que tenham um aumento da nuliparidade e dos antecedentes de esterilidade ao longo dos anos (Hammond, Langridge et al. 2013). A frequência de PPT em gestações anteriores é significativamente inferior nas RPMPT^P comparativamente aos PPTe^P (11,6 vs 28%). Estes dados são concordantes com a literatura e são idênticos aos da prematuridade global, reforçando a ideia de que se um PPT anterior é um fator de risco significativo para um subsequente, na base deste risco poderá estar um fator intrínseco, nomeadamente uma suscetibilidade genética.

Em termos de **vigilância da gravidez**, a quase totalidade das gestações foram vigiadas, sendo que um maior número das que culminou em RPMPT^P ou ^g foi vigiada no Centro de Saúde, outro hospital ou não teve vigi-

lância, enquanto que um número significativamente inferior foi vigiada na nossa instituição, o que poderia sugerir diferenças na vigilância pré-natal destas grávidas. Quando analisados os diferentes parâmetros da vigilância pré-natal, verificamos não haver diferenças nas rotinas pré-natais ecográficas e analíticas realizadas. No entanto, é impossível avaliar a qualidade da vigilância pré-natal, uma vez que não temos dados que permitam comparar o número de consultas pré-natais.

Em relação à **altura, peso inicial e final, IMC inicial e final e ganho ponderal**, que não sofreram alterações ao longo dos anos, nem foram significativamente diferentes nas mulheres com RPMPT^p ou PPTe^p, estes resultados contrastam com os verificados na análise da prematuridade global. Nestes, as mulheres com PPTe^g apresentaram valores significativamente inferiores de peso inicial ($60,2 \pm 10,6$ vs $62,8 \pm 12$ Kg, $p < 0,001$), IMC inicial ($23,2 \pm 3,9$ vs $24,3 \pm 4,5$, $p < 0,001$), peso final ($70,5 \pm 11$ vs $73,7 \pm 12,3$ Kg, $p < 0,001$), IMC final ($27,3 \pm 4,1$ vs $28,5 \pm 4,6$, $p < 0,001$) e ganho ponderal ($10,5 \pm 4,6$ vs $11,1 \pm 4,8$ Kg, $p = 0,029$) comparativamente com os RPMPT^g. Estas diferenças indiciam que um mais baixo peso ou IMC e um ganho ponderal inferior durante a gravidez, podem influenciar a prematuridade tardia, com um risco mais significativo de PPTe, mas que não influenciam a prematuridade precoce.

Estes resultados estão de acordo com os de outros autores, que comparando os diferentes tipos de prematuridade (<37semanas), descrevem um aumento de prematuridade nos extremos do IMC, referindo um aumento do risco RPMPT^p nas mulheres obesas, enquanto os baixos pesos e IMC são associados a PPTe (Lynch, Hart et al. 2014). A relação entre o baixo peso/IMC materno e parto pré-termo tem sido atribuída à sub-nutrição cró-

nica, aos baixos níveis de macro e micronutrientes na dieta, fatores endócrinos e a possíveis alterações do sistema imune que condicionam uma base inflamatória/infeciosa. Tem sido também sugerido que o estado nutricional pré-concepcional é mais importante que a nutrição ao longo da gravidez como fator de risco de prematuridade, pelo que, apesar de não verificarmos diferenças na prematuridade precoce relativamente a estes parâmetros, constatamos que essa situação se altera na prematuridade tardia, onde estes fatores parecem ter mais impacto. Assim, será sempre importante reforçar o aconselhamento nutricional, preferencialmente no período pré-concepcional ou, na sua impossibilidade, desde cedo na gravidez.

Quanto às **complicações durante a gravidez**, verificamos que as RPMPT^p têm significativamente menos complicações que os PPTe^p (30,1 vs 62,4%), sendo as APPT, as ITU, a DG e conseqüentemente os internamentos anteriores, significativamente mais prevalentes nos casos de PPTe^p. Esta maior prevalência também se verifica para os PPTe^g comparativamente às RPMPT^g (33,9 vs 28,1%, $p=0,019$), onde apenas é relevante a APPT (11,4 vs 5%, $p<0,001$) e os conseqüentes internamentos anteriores (17,8 vs 8,6, $p<0,001$).

Em relação **ao internamento**, as grávidas com RPMPT^p provêm mais frequentemente de outros hospitais da rede de referência do que os PPTe^p (56,5 vs 24,8%) e em IG significativamente mais precoces (30,2 vs 32,9 semanas). À data do internamento, nos rastreios infecciosos loco-regionais - exsudados cervico-vaginais e uroculturas, não se registam diferenças quanto à positividade das mesmas.

Se os valores médios de leucócitos à entrada não são significativamente diferentes ($13,6$ vs $13,6 \times 10^9/L$), o mesmo não se verifica para os valores médios da PCR, significativamente mais baixos nas mulheres com RPMPT⁹ ($1,5$ vs $3,1$ mg/L). Estes dados voltam a ser idênticos aos encontrados na prematuridade global, em que na avaliação efectuada ao internamento dos parâmetros séricos infecciosos (PCR e leucócitos), a sua elevação foi significativamente superior no grupo PPTe⁹ em relação às RPMPT⁹ ($2,2 \pm 3,6$ vs $1,2 \pm 1,5$ mg/L, $p < 0,001$ e $13,3 \pm 5,7$ vs $12,4 \pm 3,7 \times 10^9/L$, $p = 0,005$, respetivamente).

De realçar que, se na prematuridade espontânea precoce os valores médios dos leucócitos não são significativamente diferentes nas mulheres com e sem RPMPT, quando consideramos a prematuridade global, verificamos que os casos de RPMPT⁹ apresentam estes valores tendencialmente mais baixos.

Na análise da tendência para valores de PCR mais altos nos PPTe, temos que ter em conta que poucos estudos existem sobre as alterações destes valores ao longo da gravidez normal, sendo que um trabalho mais recente de Ferguson *et al*, demonstra uma elevação cedo na gravidez até às 20 semanas, seguido por um declínio até ao parto. Estes autores concluem, também, que diversas características maternas influenciavam a PCR, com mulheres de níveis escolares mais elevados, utentes de serviços de saúde públicos, múltiparas, com excesso de peso ou obesas a apresentarem valores de PCR mais elevados (Ferguson, McElrath et al. 2014). De fato, na nossa amostra, verificámos que o grupo dos PPTe⁹ (que apresenta valores médios de PCR significativamente mais elevados) engloba um significativo número de mulheres múltiparas e com excesso de peso ou obesas, relativamente às RPMPT⁹. Assim, será importante avaliar até que ponto estas características influenciam os valores analíticos que apontam para um estado in-

flamatório sistémico, sub-clínico, como potencial fator desencadeante de todo o processo de trabalho de parto espontâneo não associado a RPMPT, correlacionando-se com a literatura (na qual se menciona a inflamação/infeção como um potencial fator etiológico do PPTe). A infeção associada ou como causa de parto pré-termo pode ter 3 origens: trato genital inferior, intra-uterina ou extra-uterina (infeção materna generalizada). A infeção intra-uterina pode originar-se numa infeção ascendente a partir da vagina, numa transmissão hematógica via placentar, numa infeção transtubar de uma infeção peritoneal ou numa introdução iatrogénica após procedimento invasivo (biópsia das vilosidades coriônicas, amniocentese, cordocentese). A forma mais comum será a via ascendente, que poderá causar ou não RPM. Uma vaginose bacteriana é caracterizada por uma flora vaginal alterada - a flora normal é substituída por bactérias anaeróbias como a *Gardnerella vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Prevotella spp* e outros. Numerosos estudos reportaram uma prevalência deste tipo de infeção de 15-20% nas grávidas e enfatizaram a sua importância no desenvolvimento do PPT, RPMPT e endometrite pós-parto (Holst and Garnier 2008). O potencial papel patogénico dos *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* foi recentemente revisto, com alguns estudos a mostrarem uma associação da infeção vaginal por estes microorganismos com PPT, RPMPT e corioamniotite, e outros a não evidenciarem essa associação (Vouga, Greub et al. 2014). Este autor identificou como fatores de risco para colonização por aquelas espécies a idade materna jovem, a nuliparidade, a obesidade e o consumo de álcool, cigarros ou drogas. Demonstrou, ainda, que as grávidas quando infetadas e tratadas com clindamicina apresentavam uma taxa de PPT inferior àquelas que por não estarem infetadas não efetuavam tratamento, com menos internamentos na UCIN dos respetivos RN, bem como uma diminuição significativa das complicações respiratórias agudas.

As infecções intra-uterinas sintomáticas ou assintomáticas induzem uma resposta intramniótica inflamatória que inclui a libertação de múltiplas citocinas que por sua vez levam a contrações miometriais, modificações cervicais e/ou rotura de membranas que podem desencadear o trabalho de parto. Um rápido reconhecimento da inflamação intra-uterina é crítica mas, no entanto, não existem testes rápidos, sensíveis e específicos para esta deteção (Buhimschi, Christner et al. 2005, Buhimschi, Zhao et al. 2008). A etiologia e patofisiologia no PPT sem RPMPT é complexa, mas a inflamação/ infecção é importante. A invasão microbiana evoca a síndrome de resposta inflamatória, no entanto as bactérias nem sempre são detetáveis na inflamação intramniótica. Mulheres com PPT com ou sem RPMPT têm inflamação intramniótica em cerca de 50% dos casos, o que corresponde a 2-3x mais que a presença detetável de bactérias (Ruetschi, Rosen et al. 2005). O PPT associado com inflamação intramniótica parece estar associado a elevada proporção de complicações perinatais como a paralisia cerebral, a leucomalácia periventricular e a displasia broncopulmonar.

Relativamente à **medicação** instituída, o grupo das RPMPT^p efetuou corticoterapia para maturação pulmonar fetal em ciclo completo numa IG média significativamente mais tardia do que o grupo PPTe^p (30 ± 3 vs 29 ± 3 semanas), o que, tendo em conta que estes últimos têm uma IG ao internamento significativamente mais tardia (32 semanas), nos faz concluir que a maioria das gestações que culminam em PPTe^p e que efetuaram corticoterapia, o fizeram em internamentos anteriores por APPT, que efetivamente apresentam em taxas superiores.

A antibioterapia foi significativamente mais prevalente no grupo das RPMPT^p em relação aos PPTe^p (83,3 vs 34,4%). Resultados idênticos verificam-se nas RPMPT^g em relação aos PPTe^g (54,7 vs 16,9%, $p=0,002$). Não deixa de ser interessante analisar este fato quando os parâmetros séricos de infecção avaliados à data de internamento são, em média significativamente superiores nos PPT^p e ^g. Sendo consensual a administração de antibióticos nas RPMPT, o mesmo não acontece para os PPTe. A antibioterapia nas RPMPT está associada a uma redução significativa de corioamniotite, de partos nas 48h seguintes, de morbidade neonatal infecciosa, uso de surfactante e oxigénio, mas não interfere na mortalidade perinatal. No entanto, dada a inflamação sub-clínica associada à RPMPT, mesmo com os benefícios acima descritos, a antibioterapia não parece resolver a inflamação existente (Kenyon, Boulvain et al. 2013). No PPT com membranas intactas, a mais recente revisão da *Cochrane* não recomenda a sua utilização rotineira na ausência de sinais claros de infecção, dado não reduzir o parto pré-termo nem qualquer resultado neonatal clinicamente importante. Pelo contrário, quando comparado com placebo, a administração de antibióticos apresenta um aumento marginal, não significativo, de défices motores e paralisia cerebral (Flenady V 2013).

A utilização de tocolíticos não foi avaliada pois os resultados iriam demonstrar as diferenças protocolares da sua administração na prematuridade precoce com e sem RPMPT. A tocolise no parto pré-termo não demonstrou melhorar a mortalidade perinatal, mas permite adiar o parto pelo menos 48h de forma a ser efetuada corticoterapia para maturação pulmonar fetal. Nas grávidas com RPMPT, a sua utilização é controversa, principalmente quando estas não se apresentam em trabalho de parto iminente. Uma recente revisão da *Cochrane* concluiu que, nas RPMPT, a tocolise não

está associada a um efeito significativo na mortalidade perinatal, estando associada a períodos de latência mais longos e poucos partos nas 48h seguintes. No entanto, a sua utilização está relacionada com um aumento dos APGAR ao 5' <7 e a um aumento da necessidade de ventilação assistida aos RN. Nas RPMPT precoces, a sua utilização levou a um aumento significativo do risco de corioamniotite, pelo que a sua utilização não é preconizada (Mackeen AD 2014).

O **prolongamento da gravidez** foi significativamente superior nas RPMPT^P relativamente aos PPTe^P (62 vs 26,4%), o que faz com que não seja surpreendente que a IG ao **parto** seja significativamente superior nas RPMPT^P do que nos PPTe^P (30,9±2,3 vs 30,1±2,7 semanas), ao contrário do que sucede com a IG ano momento do internamento.

A taxa de cesarianas foi significativamente superior no grupo das RPMPT^P, sendo que os principais motivos para esta decisão foram apresentações pélvicas, EFNT e IF. Na prematuridade global também se verificam taxas de cesarianas significativamente superiores no grupo das RPMPT (31,3 vs 18,5%, p<0,001), em IG semelhantes (34±2 vs 34±3 semanas). Daqui podemos concluir que IG mais precoces não influenciam a via do parto.

Se os **dados neonatais** foram idênticos nas RPMPT^P e PPTe^P e nas RPMPT^G e PPTe^G no que respeita a peso, APGAR, género, admissões na UCIN e mortalidade precoce e tardia, o mesmo não aconteceu com a morbidade neonatal registada para os mesmos.

Verificámos que os RN do grupo das RPMPT^P apresentaram taxas significativamente inferiores aos PPTe^P de morbidade neonatal global (32,1 vs

46,7%, $p=0,008$), e em particular de morbidade neurológica (8,8 vs 19,7%; $p=0,004$) e SDR (29,6 vs 42,4%; $p=0,017$).

Para explicar estas diferenças podemos referir que estes RN nascem em IG significativamente mais tardias mas, no entanto, se considerarmos os dados da prematuridade global verificamos que também os RN de PPTe^g têm morbidade neonatal significativamente superior (16,2 vs 12,2%; $p=0,032$), e especialmente à custa da morbidade neurológica (4,8 vs 2,8%; $p=0,048$). Se a IG mais precoce do parto pode justificar as diferenças na ocorrência de SDR (também relacionada também com a menor taxa de realização de corticoterapia completa nos PPTe^p), a mesma não parece poder justificar completamente a morbidade neurológica.

Para tentarmos encontrar uma resposta para estas diferenças, analisando os possíveis fatores associados a uma morbidade neurológica superior, a antibioterapia demonstrou estar relacionada com o aumento do risco da sua ocorrência. Um dado importante para este resultado neonatal são os valores sistémicos de PCR e leucócitos significativamente mais elevados nos PPTe^p e ^g, uma vez que uma inflamação intraamniótica está associada a resultados perinatais mais adversos, quer haja ou não identificação directa de agentes infecciosos. Esta inflamação apresenta diversos graus de severidade, os quais se relacionam diretamente com as sequelas neonatais, especialmente as neurológicas (Combs, Gravett et al. 2014). A relação da morbidade neurológica neonatal com o grau de inflamação intraamniótica tem sido amplamente debatida e demonstrada, e não parece ser alterada pela administração sistemática de antibióticos nestas grávidas, dado não oferecerem benefícios na ausência de RPMPT e aumentarem paradoxalmente o risco de paralisia cerebral e enterocolite necrotizante neonatal (Flenady, Hawley et al. 2013). No entanto, poderia eventualmente justificar-se a ad-

ministração de agentes anti-inflamatórios que efetivamente quebrem a cascata da inflamação iniciada.

Um fator comum encontrado nas análises dos potenciais fatores associados a morbidades neonatais, foi o carácter aparentemente protector da RPMPT, o que reforça a importância do tratamento conservador nas RPMPT^P e aumento do concomitante tempo de latência. Este prolongamento da gravidez, apesar de interferir positivamente nas morbidades neonatais, pode aumentar o risco de corioamniotite e descolamento prematuro de placenta, pelo que estas grávidas devem ser intensamente vigiadas (Ekin, Gezer et al. 2014).

Destes resultados, será relevante questionarmos se o efeito protetor da RPMPT estará relacionado apenas com a IG ao parto mais tardia, com a antibioterapia instituída, com a elevada taxa de corticoterapia completa ou com a associação das duas. É conhecido o efeito benéfico na infeção da administração de corticóides, anti-inflamatórios não-esteróides, IL10 e um antagonista do TLR4 em modelos animais. Além disso, níveis baixos de bactérias existem e colonizam o meio intra-uterino e as membranas fetais na gravidez normal, em equilíbrio com uma baixa resposta inflamatória. Quando esse equilíbrio se rompe (por proliferação exagerada da flora existente ou por estirpes mais virulentas), é desencadeada uma resposta inflamatória mais vigorosa, e é essa resposta inflamatória e não a presença bacteriana por si só, que desencadeia toda a cascata de eventos bioquímicos que provocam contrações uterinas e/ou modificações cervicais (Combs, Gravett et al. 2014).

Os melhores resultados neonatais das RPMPT estarão relacionados não só com a IG ao parto mais tardia, mas também com a terapêutica anti-

biótica e anti-inflamatória (corticóides) efetuada, dado que não só é controlada a proliferação bacteriana como é travado o processo bioquímico da inflamação subjacente. Estes resultados apontam para que a terapêutica anti-inflamatória possa ser um factor relevante, co-adjuvada pela antibioterapia quando necessário, para travar o processo inflamatório intra-amniótico que desencadeia contrações uterinas e modificações cervicais, associadas ou não a RPMPT. Se quisermos travar o início de trabalho de parto pré-termo, será crucial tentar transpor os estudos destes fármacos existentes em animais (ex.: corticóides, anti-inflamatórios não-esteróides, IL10, antagonista do TLR4), para os humanos.

As **complicações no puerpério** registaram-se em número significativamente superior após RPMPT^p, mas nenhuma complicação em particular foi mais prevalente, nomeadamente endometrites. Resultados idênticos são encontrados para as RPMPT^g vs PPTe^g (6,2 vs 3,4%, $p=0,014$), o que nos leva a concluir que o parto em IG mais precoces não está associado a maior risco de complicações no puerpério.

Como **fatores associados ao risco** de PPTe^p identificámos a ocorrência de complicações na gravidez, nomeadamente metrorragias, diabetes gestacional e internamentos anteriores.

Nas RPMPT^p identificámos como fatores associados a um maior risco para a sua ocorrência: mulheres desempregadas, provenientes de outros hospitais e com leucocitose $\geq 13 \times 10^9/L$ à data do internamento. Mulheres desempregadas e provenientes de outros hospitais cuja área de referência se localiza em zonas mais desfavorecidas, podem refletir um nível económico mais baixo que leva a uma assistência pré-natal mais deficitária, com

menor número de consultas. Estes fatores, por vezes associados a défices nutricionais e comportamentos de risco como tabagismo, álcool ou consumo de drogas, podem contribuir para o desencadear dos mecanismos bioquímicos locais que levam à RPMPT.

Como fator protetor associado a RPMPT^p identificámos a ocorrência de APPT como complicação na gravidez, o que contradiz alguns autores que, encontrando uma associação entre RPMPT e APPT, o justificam devido ao enfraquecimento da membrana aquando das contrações durante a APPT. Os nossos resultados não corroboram esta teoria, parecendo, pelo contrário, existir alguma proteção das membranas fetais com a terapêutica instituída aquando das APPT.

A falta de associação entre a prematuridade e infeções genito-urinárias, presente na nossa amostra, é também descrito por outros autores, não invalidando a ligação deste tipo de infeções ao desencadear de todo o processo (Hackenhaar, Albernaz et al. 2014). Pode, contudo, ser o reflexo da utilização de antibióticos para o tratamento empírico de sintomatologia vaginal ou urinária sem confirmação laboratorial da colonização. A administração de antibióticos pode erradicar as bactérias, mas não é suficiente para travar o processo inflamatório subjacente. Apesar da existência de bactérias na membranas fetais ter sido identificada em 80% das RPMPT, a sua presença, por si só, não é suficiente para causar um parto pré-termo. Esta presença bacteriana foi também identificada em membranas fetais de grávidas a termo em trabalho de parto ou não (Stout, Conlon et al. 2013, Fortner, Grotegut et al. 2014).

Por outro lado, se uma base inflamatória/infecciosa está claramente presente nas grávidas com PPTe⁹ da nossa amostra, quando a RPMPT está presente, essa origem não é tão claramente identificável, o que sugere um mecanismo sub-clínico mais localizado às membranas fetais.

Assim, outras hipóteses se colocam para a origem das RPMPT, sendo uma delas a de que o córion é significativamente mais fino no local da rotura quando comparado com locais mais distantes em todos os tipos de PPTe (pré-termo e termo), sugerindo que o córion naquela zona sofre significativa remodelação ao longo da gestação. Contrariamente, o córion nos casos de RPMPT é significativamente mais fino em todos os locais, independentemente do local da rotura, sugerindo um processo global, não local, na sua origem. Nas mulheres com RPMPT, a presença de bactérias é superior no local da rotura, no entanto todas as membranas fetais, independentemente da IG, trabalho de parto ou rotura têm bactérias, cuja presença é inversamente proporcional à espessura do córion. A RPMPT terá o seu próprio processo fisiopatológico, onde a diminuição da espessura do córion sugere que um processo, seja apoptose, estiramento mecânico ou eventos bioquímicos, decorre na globalidade das membranas. O córion sofre uma diminuição patológica da sua espessura, que enfraquece a sua força tensil, a barreira física e potencia a invasão bacteriana (Fortner, Grotegut et al. 2014).

Apesar da avançada pesquisa dos últimos anos, prematuridade continua a ser um problema central na medicina perinatal. É responsável pela maior parte da mortalidade e morbidade neonatal e pós-neonatal, com complicações severas nos RN, que incluem a hemorragia cerebral extensa com dano irreversível da substância branca e paralisia cerebral ou outras doenças de desenvolvimento como a displasia broncopulmonar, enterocolite necrotizante ou retinopatia (Holst and Garnier 2008). Continua a ser um problema major de saúde pública com repercussões familiares e sociais devastadoras. As estratégias de prevenção falharam globalmente até hoje e a prematuridade contribui para cerca de 70% das mortes e 75% da morbidade neonatal.

3. Análise genética de SNPs do *DEFB1/HBD1*

No sentido de prevenir o dano fetal e facilitar o desenvolvimento de novos tratamentos há uma necessidade urgente de compreender os mecanismos moleculares na base do parto pré-termo espontâneo e identificar novos biomarcadores que possam classificar estas mulheres em diferentes subgrupos etiológicos que requeiram diferentes abordagens clínicas e terapêuticas (Ruetschi, Rosen et al. 2005).

Da investigação resultante da procura de componentes genéticos, estão incluídos os polimorfismos, em estudos de associação com variações de sequência em genes candidatos ou estudos de ligação do genoma alargados. Doenças complexas como o parto pré-termo podem ter múltiplos mecanismos subjacentes e podem ter de ser re-classificados em diferentes subclasses e a heterogeneidade alélica pode complicar o seu estudo. Contrastam com doenças mendelianas numa heterogeneidade etimológica e de traço. A genómica ou a proteómica podem identificar respondedoras a tratamentos farmacológicos especiais (farmacogenómica) e permitir uma predição do prognóstico e desenvolvimento de conceitos preventivos e/ou terapêuticos (Holst and Garnier 2008).

O sistema imune inato confere proteção contra patogénios e organismos multicelulares através da secreção de substâncias com alto espetro antibiótico, como as defensinas. Estas agem como uma primeira linha de defesa e amplificam as respostas do sistema imune inato e adaptativo, como a ativação de mastócitos, ILs, TNF, células dendríticas e células T de memória. O gene *DEFB1/HBD1* (8p23.1-23.2) codifica a hBD-1 e sendo expresso de forma constitutiva, tem sido alvo de interesse, nomeadamente 3 SNPs localizados na região 5'UTR têm sido apontados como causadores de

variações funcionais com impacto na expressão deste gene (Sandrin-Garcia, Brandao et al. 2012).

Em estudos anteriores, alterações destes SNPs foram associados a diferentes riscos de transmissão vertical de HIV na gravidez. A expressão de RNAm para tradução de hBD-1, 2 e 3 nas membranas fetais e na placenta, revelou um aumento da expressão dos transcritos de RNAm da hBD-1 e uma diminuição do RNAm da hBD-3, nas estruturas fetais de mães HIV positivas. Este aumento da expressão da hBD-1 pode ser devido ao estímulo viral e representar um dos mecanismos de proteção contra a transmissão vertical de HIV. No entanto, a análise de SNPs no gene *DEFB1/HBD1* não elucidou ainda o papel destas variações genéticas na função da hBD-1. O estímulo viral do HIV em associação aos SNPs no *DEFB1/HBD1* são propostos como mediadores de diferentes níveis de expressão das hBD, tendo estas proteínas um potencial papel protetor no mecanismo de defesa contra a transmissão vertical de HIV (Aguilar-Jimenez, Zapata et al. 2011).

O parto pré-termo é atualmente considerado uma síndrome com um mecanismo multifatorial na sua origem que resultará da interação de fatores genéticos, ambientais, infecciosos e imunológicos, embora o mecanismo exato ainda seja ainda desconhecido.

Estudos do papel da defensina no parto pré-termo começaram a surgir em 2007, após a sua identificação como uma das proteínas presentes nos casos com *scores* de infecção moderada a grave, em estudos de proteômica no líquido amniótico, tendo esses *scores* sido associados ao parto pré-termo, corioamniotite e sépsis neonatal precoce. Nestes estudos iniciais, as RPMPT, quando comparadas com PPT sem RPMPT, estavam associadas a níveis mais altos de infecção amniótica traduzida pela presença de defensina,

calgranulina e doseamentos de IL6 e MMP8 mais elevados no líquido amniótico. Essa gravidade da inflamação foi mais frequente a nível do córion das membranas fetais, em concordância com o trabalho de Fortner *et al* (Buhimschi CS 2007, Buhimschi, Rosenberg *et al.* 2008, Tambor, Kacarovsky *et al.* 2013, Fortner, Grotegut *et al.* 2014). Por outro lado, quando não associado a inflamação/infeção, a defensina não foi identificada no líquido amniótico por proteômica (Buhimschi, Zhao *et al.* 2008). Outros autores estudaram o valor da proteômica na identificação de marcadores para parto pré-termo, mas sempre incluindo partos pré-termo < 37 semanas e com membranas íntegras, concluindo que as mulheres que apresentavam os biomarcadores proteômicos positivos apresentavam PPT em IG mais precoce, níveis mais elevados de IL6 e graus superiores de corioamnionite (Romero, Espinoza *et al.* 2008, Cobo, Palacio *et al.* 2009).

Com base nestes estudos, e após verificação de que, na amostra de prematuridade espontânea precoce do presente estudo, as RPMPT ocorriam em IG significativamente mais antecipadas, sem apresentarem um fator causal aparente para a sua ocorrência, e sem indicadores laboratoriais de inflamação/infeção detetáveis, procedeu-se ao estudo da possível influência de alterações genéticas no *DEFB1*, nomeadamente polimorfismos previamente descritos em associação a outras doenças com uma forte componente infecciosa ou inflamatória, investigando o seu envolvimento no aumento da suscetibilidade destas grávidas a sofrerem uma RPMPT.

Inicialmente, pretendia-se sequenciar o gene *DEFB1/HBD1* e relacionar possíveis alterações encontradas com os resultados clínicos e laboratoriais, um estudo certamente aliciante e inovador. No entanto, após meses de tentativas infrutíferas de otimização e sequenciação do gene e perante a

inexistência de dados na literatura sobre essa metodologia aplicada a este gene, no sentido de garantir a apresentação de resultados, optou-se por realizar um estudo de genotipagem e apresentar um estudo de associação preliminar, dado o reduzido número de casos (n=22) com RPMPT.

Dos 4 ensaios inicialmente planeados, um foi excluído por apresentar um defeito de fabrico na sonda de deteção.

Os resultados obtidos são preliminares e não permitem observar associação entre os SNP c.-20G>A, c.-44G>C e c.-52G>A do *DEFB1/HBD1* e a ocorrência de RPMPT precoce. Também não foram encontradas diferenças significativas nas frequências dos diferentes haplotipos formados por estes SNP, entre os casos e os controlos.

No entanto, os efeitos dos SNPs estudados na expressão do *DEFB1/HBD1* ainda está por determinar. Um estudo *in silico* recente determinou como a região 5'UTR do gene afeta a estrutura secundária do seu RNAm e sugere uma possível correlação com a eficiência de tradução na suscetibilidade à doença. Se os SNPs c.-20G>A e c.-44G>C podem interagir espacialmente quando se encontram no RNAm mais longo, o c.-52G>A sozinho causa alterações à estrutura terminal 5' no RNAm intermediário. Este modelo de regulação pós-transcrição pode explicar os dados controversos encontrados em alguns estudos de associação, em que o mesmo alelo pode ser associado a proteção ou a risco para uma patologia (Naslavsky, Crovella et al. 2010). Assim, como por exemplo no caso do HIV, as mulheres afetadas poderão ter níveis de expressão de RNAm para hBD-1 aumentados, mas os efeitos dos SNPs na sua expressão é difícil de determinar pelo que foi acima exposto.

Não foi possível de realizar a avaliação da expressão da hBD-1 neste trabalho dado o carácter retrospectivo com que as amostras foram colhidas,

mas certamente seria uma mais valia para estes resultados e será alvo de um estudo prospetivo no futuro.

Quando foi avaliada a interação entre os diferentes genótipos e alelos dos 3 SNPs em estudo com características clínicas e laboratoriais, verificou-se que os RN de mães portadoras do alelo A para o SNP c.-20G>A apresentam taxas de SDR significativamente inferiores. Este facto, poderá indicar um aumento de expressão do RNAm da hBD-1 que poderá contribuir para a proteção respiratória destes RN. Nos RN, por ainda não terem desenvolvido o sistema imune adaptativo, o sistema imune inato é fundamental para a sua proteção nos primeiros tempos da sua vida. O *DEFB1* é expresso de forma constitutiva no epitélio das vias aéreas e está sobre-regulado em resposta à infeção, pelo que a hBD1 terá um papel fundamental na manutenção de um ambiente relativamente estéril nas vias aéreas, contribuindo para a sua correta função.

Foi também estudado previamente o papel dos SNPs do *DEFB1/HBD1* na asma, doença pulmonar obstrutiva crónica e na colonização da via aérea em doentes com fibrose quística, mas foram obtidos resultados díspares.

Em 2005, Vankeerberghen *et al.*, estudou a eventual relação destes SNPs com a gravidade da doença pulmonar na fibrose quística em populações europeias, não evidenciando associação significativa (Vankeerberghen, Scudiero *et al.* 2005).

Em 2006, outro estudo tentando correlacionar o efeito dos referidos SNPs no declínio da função pulmonar em fumadores, não revelou qualquer associação positiva (Wallace, He *et al.* 2006).

Também em 2006, o estudo de Leung *et al.*, descreve uma associação significativa das alterações nos SNPs do *DEFB1/HBD1* com asma em crianças chinesas. Descreveram um diagnóstico de asma e atopia significa-

tivamente mais comum associado ao genótipo -20AA, apoiando a ideia de que a *hBD1* tem um papel na suscetibilidade de desenvolver asma (Leung, Li et al. 2006). Estes autores encontraram ainda diferenças étnicas significativas nas frequências dos 3 SNPs na região 5'UTR do *DEFB1*, com alelos minor nas populações afro-americanas e europeias a serem mais frequentes na população chinesa. Este foi o segundo estudo a relacionar SNPs do *DEFB1/HBD1* com a asma, depois de Levy *et al.*, terem encontrado uma associação entre a asma e os SNPs -1816T>C e IVS+692G>A (Levy, Raby et al. 2005). Estas diferenças étnicas nas frequências dos alelos para os SNPs analisados e o modelo de regulação pós-transcrição já exposto acima, podem explicar os dados controversos obtidos em alguns estudos de associação, em que o mesmo alelo pode ser associado a proteção ou a suscetibilidade, como acontece quando comparamos os resultados do presente estudo e o de Leung et al. (2006), demonstrando e reforçando a importância de definir a etnia em estudos de natureza genética.

Em 2008, Tesse *et al.*, investigou os SNPs do *DEFB1/HBD1* em associação com a colonização das vias aéreas em doentes com fibrose quística, dizendo que os portadores do genótipo -52AA e -20GG tinham níveis superiores de colonização, comparativamente aos doentes com os outros genótipos, mas estes resultados não foram comprovados por outros autores na população do norte de Itália (Tesse, Cardinale et al. 2008, Segat, Morgutti et al. 2010).

Reconhecendo que o número limitado das amostras disponíveis para análise poderá ter contribuído para não se encontrar uma associação positiva dos SNPs do gene *DEFB1* em estudo e a ocorrência de RPMPT^p, é pertinente reconhecer que o presente estudo é inovador e de grande importância na investigação translacional da prematuridade. A continuidade deste

trabalho, que se encontra em curso, trará uma contribuição mais consistente no estudo de associação que se pretende realizar.

No entanto, apesar da limitação apontada, foi possível observar que os RN de mães portadoras do alelo A para o SNP c.-20G>A apresentam taxas de SDR significativamente inferiores ($p=0,03$), embora seja necessário um maior número de casos para confirmar este resultado.

Uma associação entre polimorfismos do gene *DEFB1/HBD1* e doenças inflamatórias, auto-imunes e alérgicas foi já demonstrada, assim como o aumento da expressão de RNAm da hBD-1 em membranas fetais e placentas em mulheres infetadas por HIV. No entanto, tanto quanto é do nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo a investigar uma possível associação entre RPMPT^p e resultados neonatais com polimorfismos do *DEFB1*. Estes resultados preliminares são encorajadores para a continuidade da investigação da relação entre alterações da prematuridade em associação a variantes genéticas do gene *DEFB1*.

VI. CONCLUSÕES

Com o presente trabalho, é possível propor as seguintes conclusões:

Na **caracterização da prematuridade espontânea precoce** (partos em idades gestacionais compreendidas entre as 24s0d-33s6d) nos últimos 10 anos, concluímos que:

- a sua frequência tem-se mantido constante ao longo dos anos;
- ao contrário da prematuridade global, na prematuridade precoce não há modificações nos fatores de risco associados às características demográficas, antecedentes pessoais, obstétricos e familiares, peso e IMC inicial e final da grávida, nem diferenças destes fatores de risco na presença ou não de RPMPT associada, pelo que nenhuma intervenção neste campo poderá melhorar os resultados perinatais;
- nas RPMPT^P, a vigilância e a proveniência da grávida relaciona-se maioritariamente com instituições de saúde mais próximas da área de residência, com significativamente menos complicações durante a gravidez, parâmetros infecciosos sistémicos mais baixos; as grávidas são internadas significativamente mais cedo, fazem corticoterapia e antibioterapia em taxas superiores, apresentam tempos de latência até ao parto maiores, sendo a IG deste significativamente mais tardia em relação aos PPTe^P;
- como fatores associados a um maior risco de PPTe^P encontrámos complicações da gravidez, nomeadamente metrorragias e diabetes gestacional; enquanto que as mulheres que não trabalham, que são provenientes de outros hospitais e apresentam valores de leucócitos à entrada iguais ou superiores a $13 \times 10^9/L$, têm uma probabilidade aumentada de RPMPT^P;

- as RPMPT^p não constituem um fator de risco para resultados neonatais mais adversos, pelo contrário, os RN (apesar da maior precocidade do evento da RPMPT), apresentam índices significativamente menores de morbidade neonatal, especialmente à custa de menor morbidade neurológica e de SDR;

Na genotipagem do *DEFB1/HBD1*:

- apesar do papel específico dos SNPs da 5'UTR na regulação da expressão do gene e o papel da hBD-1 na gravidez ainda estar por esclarecer, no presente estudo foi investigada pela primeira vez a possibilidade de associação entre os SNPs c.-20G>A, c.-44G>C e c.-52G>A do *DEFB1/HBD1* e a suscetibilidade para RPMPT^p, embora não fosse encontrada ainda uma associação positiva.
- foi evidenciado um efeito protetor do alelo A do SNP c.-20G>A no desenvolvimento de SDR nos RN de mães portadoras deste alelo;
- estudos adicionais de associação e funcionais, no parto pré-termo com e sem RPMPT, tornam-se necessários para reforçar esta conclusão e possibilitar a identificação de outros resultados importantes que possam ter impacto positivo na abordagem clínica e terapêutica da prematuridade.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar-Jimenez, W., W. Zapata and M. T. Rugeles (2011). "Differential expression of human beta defensins in placenta and detection of allelic variants in the DEFB1 gene from HIV-1 positive mothers." *Biomedica* 31(1): 44-54.
- Aguilar-Jiménez W, Z. W., Rugeles MT. (2011). "Differential expression of human beta defensins in placenta and detection of allelic variants in the DEFB1 gene from HIV-1 positive mothers." *Biomedica* 31(1): 44-54.
- Allaire, A. D., N. D'Andrea, P. Truong, M. J. McMahon and B. A. Lessey (2001). "Cervical stroma apoptosis in pregnancy." *Obstet Gynecol* 97(3): 399-403.
- Allen, J., N. Uldbjerg, L. K. Petersen and N. J. Secher (1989). "Intracervical 17 beta-oestradiol before induction of second-trimester abortion with a prostaglandin E1 analogue." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 32(2): 123-127.
- Alm, P., J. Alumets, E. Brodin, R. Hakanson, G. Nilsson, N. O. Sjoberg and F. Sundler (1978). "Peptidergic (substance P) nerves in the genito-urinary tract." *Neuroscience* 3(4-5): 419-425.
- Amory, J. H., J. Hitti, R. Lawler and D. A. Eschenbach (2001). "Increased tumor necrosis factor-alpha production after lipopolysaccharide stimulation of whole blood in patients with previous preterm delivery complicated by intra-amniotic infection or inflammation." *Am J Obstet Gynecol* 185(5): 1064-1067.
- Bacon, C. R., J. J. Morrison, G. O'Reilly, I. T. Cameron and A. P. Davenport (1995). "ETA and ETB endothelin receptors in human myometrium characterized by the subtype selective ligands BQ123, BQ3020, FR139317 and PD151242." *J Endocrinol* 144(1): 127-134.
- Baggiolini, M., A. Walz and S. L. Kunkel (1989). "Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils." *J Clin Invest* 84(4): 1045-1049.
- Bansal, R. K., P. C. Goldsmith, Y. He, C. J. Zaloudek, J. L. Ecker and R. K. Riemer (1997). "A decline in myometrial nitric oxide synthase expression is associated with labor and delivery." *J Clin Invest* 99(10): 2502-2508.
- Baroncelli, S., E. Ricci, M. Andreotti, G. Guidotti, P. Germano, M. C. Marazzi, S. Vella, L. Palombi, A. De Rossi and M. Giuliano (2008). "Single-nucleotide polymorphisms in human beta-defensin-1 gene in Mozambican HIV-1-infected women and correlation with virologic parameters." *AIDS* 22(12): 1515-1517.
- Batra, S. and I. Fadeel (1994). "Release of intracellular calcium and stimulation of cell growth by ATP and histamine in human ovarian cancer cells (SKOV-3)." *Cancer Lett* 77(1): 57-63.
- Bell, S. C. and T. M. Malak (1994). "Formation of the chorio-decidual interface of human fetal membranes. Is it analogous to anchoring villi development in the placenta?" *Ann N Y Acad Sci* 734: 166-168.
- Bennett, P. R., M. P. Rose, L. Myatt and M. G. Elder (1987). "Preterm labor: stimulation of arachidonic acid metabolism in human amnion cells by bacterial products." *Am J Obstet Gynecol* 156(3): 649-655.

- Bian, J. and Y. Sun (1997). "p53CP, a putative p53 competing protein that specifically binds to the consensus p53 DNA binding sites: a third member of the p53 family?" *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(26): 14753-14758.
- Bick, R. J., B. J. Poindexter, L. M. Buja, C. H. Lawyer, S. M. Milner and S. Bhat (2007). "Nuclear localization of HBD-1 in human keratinocytes." *J Burns Wounds* 7: e3.
- Bokstrom, H., M. Brannstrom, M. Alexandersson and A. Norstrom (1997). "Leukocyte subpopulations in the human uterine cervical stroma at early and term pregnancy." *Hum Reprod* 12(3): 586-590.
- Boniotto, M., M. H. Hazbon, W. J. Jordan, G. P. Lennon, J. Eskdale, D. Alland and G. Gallagher (2004). "Novel hairpin-shaped primer assay to study the association of the -44 single-nucleotide polymorphism of the DEFBI gene with early-onset periodontal disease." *Clin Diagn Lab Immunol* 11(4): 766-769.
- Bottari, S. P., A. Vokaer, E. Kaivez, J. P. Lescrainier and G. Vauquelin (1985). "Regulation of alpha- and beta-adrenergic receptor subclasses by gonadal steroids in human myometrium." *Acta Physiol Hung* 65(3): 335-346.
- Bowen, J. M., L. Chamley, M. D. Mitchell and J. A. Keelan (2002). "Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women." *Placenta* 23(4): 239-256.
- Boyle, M. B., N. J. MacLusky, F. Naftolin and L. K. Kaczmarek (1987). "Hormonal regulation of K⁺-channel messenger RNA in rat myometrium during oestrus cycle and in pregnancy." *Nature* 330(6146): 373-375.
- Braida, L., M. Boniotto, A. Pontillo, P. A. Tovo, A. Amoroso and S. Crovella (2004). "A single-nucleotide polymorphism in the human beta-defensin 1 gene is associated with HIV-1 infection in Italian children." *AIDS* 18(11): 1598-1600.
- Bryant-Greenwood, G. D. and S. Y. Yamamoto (1995). "Control of peripartal collagenolysis in the human chorion-decidua." *Am J Obstet Gynecol* 172(1 Pt 1): 63-70.
- Buhimschi, C. S., V. Bhandari, B. D. Hamar, M. O. Bahtiyar, G. Zhao, A. K. Sfakianaki, C. M. Pettker, L. Magloire, E. Funai, E. R. Norwitz, M. Paidas, J. A. Copel, C. P. Weiner, C. J. Lockwood and I. A. Buhimschi (2007). "Proteomic profiling of the amniotic fluid to detect inflammation, infection, and neonatal sepsis." *PLoS Med* 4(1): e18.
- Buhimschi CS, B. V., Hamar BD, Bahtiyar MO, Zhao G, Sfakianaki AK, Pettker CM, Magloire L, Funai E, Norwitz ER, Paidas M, Copel JA, Weiner CP, Lockwood CJ, Buhimschi IA. (2007). "Proteomic Profiling of the Amniotic Fluid to Detect Inflammation, Infection, and Neonatal Sepsis." *PLoS Med.* 4(1): e18.
- Buhimschi CS, B. V., Hamar BD, Bahtiyar MO, Zhao G, Sfakianaki AK, Pettker CM, Magloire L, Funai E, Norwitz ER, Paidas M, Copel JA, Weiner CP, Lockwood CJ, Buhimschi IA. (2007). "Proteomic Profiling of the Amniotic Fluid to Detect Inflammation, Infection, and Neonatal Sepsis." *PLoS Med.* 4(1): e18.
- Buhimschi, C. S., A. T. Dulay, S. Abdel-Razeq, G. Zhao, S. Lee, E. J. Hodgson, V. Bhandari and I. A. Buhimschi (2009). "Fetal inflammatory response in women with proteomic biomarkers characteristic of intra-amniotic inflammation and preterm birth." *BJOG* 116(2): 257-267.

- Buhimschi, C. S., V. A. Rosenberg, A. T. Dulay, S. Thung, A. K. Sfakianaki, M. O. Bahtiyar and I. A. Buhimschi (2008). "Multidimensional system biology: genetic markers and proteomic biomarkers of adverse pregnancy outcome in preterm birth." Am J Perinatol 25(3): 175-187.
- Buhimschi IA, B. C. (2008). "Proteomics of the amniotic fluid in assessment of the placenta. Relevance for preterm birth." Placenta. 29(Suppl A): S95-101.
- Buhimschi, I. A., R. Christner and C. S. Buhimschi (2005). "Proteomic biomarker analysis of amniotic fluid for identification of intra-amniotic inflammation." BJOG 112(2): 173-181.
- Buhimschi, I. A., G. Zhao, V. A. Rosenberg, S. Abdel-Razek, S. Thung and C. S. Buhimschi (2008). "Multidimensional proteomics analysis of amniotic fluid to provide insight into the mechanisms of idiopathic preterm birth." PLoS One 3(4): e2049.
- Bulbring, E. and T. Tomita (1987). "Catecholamine action on smooth muscle." Pharmacol Rev 39(1): 49-96.
- Bullard, R. S., W. Gibson, S. K. Bose, J. K. Belgrave, A. C. Eaddy, C. J. Wright, D. J. Hazen-Martin, J. M. Lage, T. E. Keane, T. A. Ganz and C. D. Donald (2008). "Functional analysis of the host defense peptide Human Beta Defensin-1: new insight into its potential role in cancer." Mol Immunol 45(3): 839-848.
- Cabrol, D., P. Dubois, E. Sedbon, E. Dallot, J. Legagneux, G. Amichot, L. Cedard and C. Sureau (1987). "Prostaglandin E2-induced changes in the distribution of glycosaminoglycans in the isolated rat uterine cervix." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 26(4): 359-365.
- Cagliani, R., M. Fumagalli, S. Riva, U. Pozzoli, G. P. Comi, G. Menozzi, N. Bresolin and M. Sironi (2008). "The signature of long-standing balancing selection at the human defensin beta-1 promoter." Genome Biol 9(9): R143.
- Calder, A. A. and I. A. Greer (1991). "Pharmacological modulation of cervical compliance in the first and second trimesters of pregnancy." Semin Perinatol 15(2): 162-172.
- Calder, A. A. and I. A. Greer (1992). "Prostaglandins and the cervix." Baillieres Clin Obstet Gynaecol 6(4): 771-786.
- Carbonne, B., T. M. Mignot, V. Tsatsaris and F. Ferre (1998). "Changes in plasma and amniotic fluid endothelin levels during pregnancy: facts or artefacts?" Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 76(1): 15-19.
- Casey, M. L., S. M. Cox, R. A. Word and P. C. MacDonald (1990). "Cytokines and infection-induced preterm labour." Reprod Fertil Dev 2(5): 499-509.
- Castanotto, D. and J. J. Rossi (2009). "The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics." Nature 457(7228): 426-433.
- Caughey, A. B., J. N. Robinson and E. R. Norwitz (2008). "Contemporary diagnosis and management of preterm premature rupture of membranes." Rev Obstet Gynecol 1(1): 11-22.
- Challis, J. R. G. (2000). "Mechanism of parturition and preterm labor." Obstet Gynecol Surv 55(10): 650-660.
- Chen, Q. X., C. Lv, L. X. Huang, B. L. Cheng, G. H. Xie, S. J. Wu and X. M. Fang (2007). "Genomic variations within DEFB1 are associated with the suscepti-

- bility to and the fatal outcome of severe sepsis in Chinese Han population." Genes Immun 8(5): 439-443.
- Chibbar, R., F. D. Miller and B. F. Mitchell (1993). "Synthesis of oxytocin in amnion, chorion, and decidua may influence the timing of human parturition." J Clin Invest 91(1): 185-192.
- Chwalisz, K. and R. E. Garfield (1998). "Role of nitric oxide in the uterus and cervix: implications for the management of labor." J Perinat Med 26(6): 448-457.
- Chwalisz, K. and R. E. Garfield (2000). "Role of nitric oxide in implantation and menstruation." Hum Reprod 15 Suppl 3: 96-111.
- Cobo, T., M. Palacio, A. Navarro-Sastre, A. Ribes, J. Bosch, X. Filella and E. Gratacos (2009). "Predictive value of combined amniotic fluid proteomic biomarkers and interleukin-6 in preterm labor with intact membranes." Am J Obstet Gynecol 200(5): 499 e491-496.
- Coburn, R. F. (1987). "Stretch-induced membrane depolarization in ferret trachealis smooth muscle cells." J Appl Physiol (1985) 62(6): 2320-2325.
- Combs, C. A., M. Gravett, T. J. Garite, D. E. Hickok, J. Lapidus, R. Porreco, J. Rael, T. Grove, T. K. Morgan, W. Clewell, H. Miller, D. Luthy, L. Pereira, M. Nageotte, P. A. Robilio, S. Fortunato, H. Simhan, J. K. Baxter, E. Amon, A. Franco, K. Trofatter, K. Heyborne and N. ProteoGenix/Obstetrix Collaborative Research (2014). "Amniotic fluid infection, inflammation, and colonization in preterm labor with intact membranes." Am J Obstet Gynecol 210(2): 125 e121-125 e115.
- Danforth, D. N., J. C. Buckingham and J. W. Roddick, Jr. (1960). "Connective tissue changes incident to cervical effacement." Am J Obstet Gynecol 80: 939-945.
- Denison, F. C., S. C. Riley, C. L. Elliott, R. W. Kelly, A. A. Calder and H. O. Critchley (2000). "The effect of mifepristone administration on leukocyte populations, matrix metalloproteinases and inflammatory mediators in the first trimester cervix." Mol Hum Reprod 6(6): 541-548.
- Dennes, W. J., D. M. Slater, L. Poston and P. R. Bennett (1999). "Myometrial nitric oxide synthase messenger ribonucleic acid expression does not change throughout gestation or with the onset of labor." Am J Obstet Gynecol 180(2 Pt 1): 387-392.
- DGS, D. G. d. S. (2013). Registo de Complicações de Interrupção de Gravidez. Definições e modelo de registo. D. G. d. S. DGS. 001/2013 de 29/01/2013.
- Diamond, G., N. Beckloff, A. Weinberg and K. O. Kisich (2009). "The roles of antimicrobial peptides in innate host defense." Curr Pharm Des 15(21): 2377-2392.
- Duits LA, R. B., Rademaker M, Hiemstra PS, Nibbering PH. (2002). "Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells." Immunology 106(4): 517-525.
- Egarter, C. H. and P. Husslein (1992). "Biochemistry of myometrial contractility." Baillieres Clin Obstet Gynaecol 6(4): 755-769.
- Ekerhovd, E., B. Weijdegard, M. Brannstrom, I. Mattsby-Baltzer and A. Norstrom (2002). "Nitric oxide induced cervical ripening in the human: Involvement of cyclic guanosine monophosphate, prostaglandin F(2 alpha), and prostaglandin E(2)." Am J Obstet Gynecol 186(4): 745-750.

- Ekin, A., C. Gezer, C. E. Taner, M. Ozeren, I. Uyar and I. Gulhan (2014). "Risk factors and perinatal outcomes associated with latency in preterm premature rupture of membranes between 24 and 34 weeks of gestation." Arch Gynecol Obstet.
- Ellwood, D. A. (1980). "The hormonal control of connective-tissue changes in the uterine cervix in pregnancy and at parturition." Biochem Soc Trans 8(5): 662-667.
- Erkinheimo, T. L., K. Saukkonen, K. Narko, J. Jalkanen, O. Ylikorkala and A. Ristimäki (2000). "Expression of cyclooxygenase-2 and prostanoid receptors by human myometrium." J Clin Endocrinol Metab 85(9): 3468-3475.
- Eude, I., B. Paris, D. Cabrol, F. Ferre and M. Breuiller-Fouche (2000). "Selective protein kinase C isoforms are involved in endothelin-1-induced human uterine contraction at the end of pregnancy." Biol Reprod 63(5): 1567-1573.
- Ferguson, K. K., T. F. McElrath, Y. H. Chen, B. Mukherjee and J. D. Meeker (2014). "Longitudinal Profiling of Inflammatory Cytokines and C-reactive Protein during Uncomplicated and Preterm Pregnancy." Am J Reprod Immunol.
- Flenady, V., G. Hawley, O. M. Stock, S. Kenyon and N. Badawi (2013). "Prophylactic antibiotics for inhibiting preterm labour with intact membranes." Cochrane Database Syst Rev 12: CD000246.
- Flenady V, H. G., Stock OM, Kenyon S, Badawi N. (2013). "Prophylactic antibiotics for inhibiting preterm labour with intact membranes (Review)." Cochrane Database Syst Rev. 12(CD000246).
- Fortner, K. B., C. A. Grotegut, C. E. Ransom, R. C. Bentley, L. Feng, L. Lan, R. P. Heine, P. C. Seed and A. P. Murtha (2014). "Bacteria localization and chorion thinning among preterm premature rupture of membranes." PLoS One 9(1): e83338.
- Fortunato, S. J. and R. Menon (2001). "Distinct molecular events suggest different pathways for preterm labor and premature rupture of membranes." Am J Obstet Gynecol 184(7): 1399-1405; discussion 1405-1396.
- Fortunato, S. J., R. Menon, C. Bryant and S. J. Lombardi (2000). "Programmed cell death (apoptosis) as a possible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrane degradation in premature rupture of membranes." Am J Obstet Gynecol 182(6): 1468-1476.
- Garfield, R. E., M. Ali, C. Yallampalli and H. Izumi (1995). "Role of gap junctions and nitric oxide in control of myometrial contractility." Semin Perinatol 19(1): 41-51.
- Garfield, R. E. and R. H. Hayashi (1981). "Appearance of gap junctions in the myometrium of women during labor." Am J Obstet Gynecol 140(3): 254-260.
- Germain, A. M., J. Smith, M. L. Casey and P. C. MacDonald (1994). "Human fetal membrane contribution to the prevention of parturition: uterotonic degradation." J Clin Endocrinol Metab 78(2): 463-470.
- Gibbins, I. L., J. B. Furness, M. Costa, I. MacIntyre, C. J. Hillyard and S. Girgis (1985). "Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs." Neurosci Lett 57(2): 125-130.

- Goldenberg, R. L., B. M. Mercer, P. J. Meis, R. L. Copper, A. Das and D. McNellis (1996). "The preterm prediction study: fetal fibronectin testing and spontaneous preterm birth. NICHD Maternal Fetal Medicine Units Network." Obstet Gynecol 87(5 Pt 1): 643-648.
- Golichowski, A. M., S. R. King and K. Mascaro (1980). "Pregnancy-related changes in rat cervical glycosaminoglycans." Biochem J 192(1): 1-8.
- Gomez, R., R. Romero, S. S. Edwin and C. David (1997). "Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intra-amniotic infection." Infect Dis Clin North Am 11(1): 135-176.
- Gordon, A. J. and A. A. Calder (1977). "Oestradiol applied locally to ripen the unfavourable cervix." Lancet 2(8052-8053): 1319-1321.
- Gotsch, F., F. Gotsch, R. Romero, O. Erez, E. Vaisbuch, J. P. Kusanovic, S. Mazaki-Tovi, S. K. Kim, S. Hassan and L. Yeo (2009). "The preterm parturition syndrome and its implications for understanding the biology, risk assessment, diagnosis, treatment and prevention of preterm birth." J Matern Fetal Neonatal Med 22 Suppl 2: 5-23.
- Gravett, M. G., A. Thomas, K. A. Schneider, A. P. Reddy, S. Dasari, T. Jacob, X. Lu, M. Rodland, L. Pereira, D. W. Sadowsky, C. T. Roberts, Jr., M. J. Novy and S. R. Nagalla (2007). "Proteomic analysis of cervical-vaginal fluid: identification of novel biomarkers for detection of intra-amniotic infection." J Proteome Res 6(1): 89-96.
- Guimaraes, R. L., L. Segat, C. R. Rocha, L. A. Brandao, V. Zanin, J. Araujo, M. S. Naslavsky, J. L. de Lima Filho and S. Crovella (2009). "Functional polymorphisms of DEFB1 gene in type 1 diabetes Brazilian children." Autoimmunity 42(5): 406-413.
- Guzick, D. S. and K. Winn (1985). "The association of chorioamnionitis with preterm delivery." Obstet Gynecol 65(1): 11-16.
- Hackenhaar, A. A., E. P. Albernaz and T. M. da Fonseca (2014). "Preterm premature rupture of the fetal membranes: association with sociodemographic factors and maternal genitourinary infections." J Pediatr (Rio J) 90(2): 197-202.
- Hammond, G., A. Langridge, H. Leonard, R. Hagan, P. Jacoby, N. DeKlerk, C. Pennell and F. Stanley (2013). "Changes in risk factors for preterm birth in Western Australia 1984-2006." BJOG 120(9): 1051-1060.
- Hillier, K. and S. M. Karim (1970). "The human isolated cervix: a study of its spontaneous motility and responsiveness to drugs." Br J Pharmacol 40(3): 576P-577P.
- Hollox, E. J., J. C. Barber, A. J. Brookes and J. A. Armour (2008). "Defensins and the dynamic genome: what we can learn from structural variation at human chromosome band 8p23.1." Genome Res 18(11): 1686-1697.
- Holst, D. and Y. Garnier (2008). "Preterm birth and inflammation-The role of genetic polymorphisms." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 141(1): 3-9.
- Honore, J. C., B. Robert, M. C. Vacher-Lavenu, C. Chapron, M. Breuiller-Fouche and F. Ferre (2000). "Expression of endothelin receptors in human myometrium during pregnancy and in uterine leiomyomas." J Cardiovasc Pharmacol 36(5 Suppl 1): S386-389.

- Horne, A. W., S. J. Stock and A. E. King (2008). "Innate immunity and disorders of the female reproductive tract." Reproduction 135(6): 739-749.
- Hu, R. C., Y. J. Xu, Z. X. Zhang, W. Ni and S. X. Chen (2004). "Correlation of HDEFB1 polymorphism and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Chinese Han population." Chin Med J (Engl) 117(11): 1637-1641.
- Huang, W. M., J. Gu, M. A. Blank, J. M. Allen, S. R. Bloom and J. M. Polak (1984). "Peptide-immunoreactive nerves in the mammalian female genital tract." Histochem J 16(12): 1297-1310.
- Huxley, H. E. (1971). "The structural basis of muscular contraction." Proc R Soc Lond B Biol Sci 178(1051): 131-149.
- INE, I. N. d. E. (2013). Estatísticas Demográficas - 2012.
- Inoue, Y., K. Nakao, K. Okabe, H. Izumi, S. Kanda, K. Kitamura and H. Kuriyama (1990). "Some electrical properties of human pregnant myometrium." Am J Obstet Gynecol 162(4): 1090-1098.
- Ito, A., T. Sato, T. Iga and Y. Mori (1990). "Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) production by human fibroblasts." FEBS Lett 269(1): 93-95.
- James, C., M. Bajaj-Elliott, A. Syngelaki, N. Klein, K. Nicolaides and D. Peebles (2014). "Association of DEFB1 polymorphisms and in-vivo protein expression: a population-based, case-control study." The Lancet 383: S59.
- Jeffcoat, M. K., N. C. Geurs, M. S. Reddy, R. L. Goldenberg and J. C. Hauth (2001). "Current evidence regarding periodontal disease as a risk factor in preterm birth." Ann Periodontol 6(1): 183-188.
- Jeffrey, J. J. (1991). "Collagen and collagenase: pregnancy and parturition." Semin Perinatol 15(2): 118-126.
- Jeffrey, J. J., R. J. Coffey and A. Z. Eisen (1971). "Studies on uterine collagenase in tissue culture. II. Effect of steroid hormones on enzyme production." Biochim Biophys Acta 252(1): 143-149.
- Johnson, R. F., C. M. Mitchell, W. B. Giles, W. A. Walters and T. Zakar (2002). "The in vivo control of prostaglandin H synthase-2 messenger ribonucleic acid expression in the human amnion at parturition." J Clin Endocrinol Metab 87(6): 2816-2823.
- Junqueira, L. C., M. Zugaib, G. S. Montes, O. M. Toledo, R. M. Krisztan and K. M. Shigihara (1980). "Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilation." Am J Obstet Gynecol 138(3): 273-281.
- Jurevic, R. J., M. Bai, R. B. Chadwick, T. C. White and B. A. Dale (2003). "Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Human α -Defensin 1: High-Throughput SNP Assays and Association with Candida Carriage in Type I Diabetics and Nondiabetic Controls." Journal of Clinical Microbiology 41(1): 90-96.
- Kaiser V, D. G. (2000). "Expression of mammalian defensin genes." J Leukoc Biol. 68(6): 779-784.
- Kalus, A. A., L. P. Fredericks, B. M. Hacker, H. Dommisch, R. B. Presland, J. R. Kimball and B. A. Dale (2009). "Association of a genetic polymorphism (-44 C/G

- SNP) in the human DEFB1 gene with expression and inducibility of multiple beta-defensins in gingival keratinocytes." BMC Oral Health 9: 21.
- Katsura, M. (1989). "[Effect of human recombinant interleukin-1 alpha on glycosaminoglycan and collagen metabolism in cultured human chorionic cells]." Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi 41(12): 1943-1950.
- Keirse, M. J. (1990). "[Antiprogestagens]." Ned Tijdschr Geneesk 134(52): 2516-2518.
- Keirse, M. J. (1990). "Progestogen administration in pregnancy may prevent preterm delivery." Br J Obstet Gynaecol 97(2): 149-154.
- Kenyon, S., M. Boulvain and J. P. Neilson (2013). "Antibiotics for preterm rupture of membranes." Cochrane Database Syst Rev 12(CD001058): CD001058.
- Kenyon, S. L., D. J. Taylor, W. Tarnow-Mordi and O. C. Group (2001). "Broad-spectrum antibiotics for preterm, prelabour rupture of fetal membranes: the ORACLE I randomised trial. ORACLE Collaborative Group." Lancet 357(9261): 979-988.
- Kenyon, S. L., D. J. Taylor, W. Tarnow-Mordi and O. C. Group (2001). "Broad-spectrum antibiotics for spontaneous preterm labour: the ORACLE II randomised trial. ORACLE Collaborative Group." Lancet 357(9261): 989-994.
- Khan-Dawood, F. S. and M. Y. Dawood (1984). "Estrogen and progesterone receptor and hormone levels in human myometrium and placenta in term pregnancy." Am J Obstet Gynecol 150(5 Pt 1): 501-505.
- Kim, E., J. E. Lee, J. H. Namkung, P. S. Kim, S. Kim, E. S. Shin, E. Y. Cho and J. M. Yang (2009). "Single nucleotide polymorphisms and the haplotype in the DEFB1 gene are associated with atopic dermatitis in a Korean population." J Dermatol Sci 54(1): 25-30.
- Kinsler, V. A., S. Thornton, M. L. Ashford, P. Melin and S. K. Smith (1996). "The effect of the oxytocin antagonists F314 and F792 on the in vitro contractility of human myometrium." Br J Obstet Gynaecol 103(4): 373-375.
- Kleissl, H. P., M. van der Rest, F. Naftolin, F. H. Glorieux and A. de Leon (1978). "Collagen changes in the human uterine cervix at parturition." Am J Obstet Gynecol 130(7): 748-753.
- Kocsis, A. K., P. L. Lakatos, F. Somogyvari, P. Fuszek, J. Papp, S. Fischer, T. Szamosi, L. Lakatos, A. Kovacs, P. Hofner and Y. Mandi (2008). "Association of beta-defensin 1 single nucleotide polymorphisms with Crohn's disease." Scand J Gastroenterol 43(3): 299-307.
- Kokenyesi, R. and J. F. Woessner, Jr. (1990). "Relationship between dilatation of the rat uterine cervix and a small dermatan sulfate proteoglycan." Biol Reprod 42(1): 87-97.
- Koob, T. J., J. J. Jeffrey, A. Z. Eisen and E. A. Bauer (1980). "Hormonal interactions in mammalian collagenase regulation. Comparative studies in human skin and rat uterus." Biochim Biophys Acta 629(1): 13-23.
- Krantz, K. E. (1959). "Innervation of the human uterus." Ann N Y Acad Sci 75: 770-784.
- Lakatos, P. L., I. Altorjay, Y. Mandi, L. Lakatos, J. Tumpek, A. Kovacs, T. Molnar, Z. Tulassay, P. Miheller, K. Palatka, T. Szamosi, S. Fischer, J. Papp, I. B. D. S. G.

- Hungarian and M. Papp (2008). "Interaction between seroreactivity to microbial antigens and genetics in Crohn's disease: is there a role for defensins?" Tissue Antigens 71(6): 552-559.
- Ledingham, M. A., F. C. Denison, R. W. Kelly, A. Young and J. E. Norman (1999). "Nitric oxide donors stimulate prostaglandin F(2alpha) and inhibit thromboxane B(2) production in the human cervix during the first trimester of pregnancy." Mol Hum Reprod 5(10): 973-982.
- Ledingham, M. A., F. C. Denison, S. C. Riley and J. E. Norman (1999). "Matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors are produced by the human uterine cervix but their secretion is not regulated by nitric oxide donors." Hum Reprod 14(8): 2089-2096.
- Ledingham, M. A., A. J. Thomson, I. A. Greer and J. E. Norman (2000). "Nitric oxide in parturition." BJOG 107(5): 581-593.
- Ledingham, M. A., A. J. Thomson, F. Jordan, A. Young, M. Crawford and J. E. Norman (2001). "Cell adhesion molecule expression in the cervix and myometrium during pregnancy and parturition." Obstet Gynecol 97(2): 235-242.
- Ledingham, M. A., A. J. Thomson, A. Young, L. M. Macara, I. A. Greer and J. E. Norman (2000). "Changes in the expression of nitric oxide synthase in the human uterine cervix during pregnancy and parturition." Mol Hum Reprod 6(11): 1041-1048.
- Leppert, P. C. (1995). "Anatomy and physiology of cervical ripening." Clin Obstet Gynecol 38(2): 267-279.
- Leung, T. F., C. Y. Li, E. K. Liu, N. L. Tang, I. H. Chan, E. Yung, G. W. Wong and C. W. Lam (2006). "Asthma and atopy are associated with DEFB1 polymorphisms in Chinese children." Genes Immun 7(1): 59-64.
- Levy, H., B. A. Raby, S. Lake, K. G. Tantisira, D. Kwiatkowski, R. Lazarus, E. K. Silverman, B. Richter, W. T. Klimecki, D. Vercelli, F. D. Martinez and S. T. Weiss (2005). "Association of defensin beta-1 gene polymorphisms with asthma." J Allergy Clin Immunol 115(2): 252-258.
- Liggins, G. C. (1978). "Ripening of the cervix." Semin Perinatol 2(3): 261-271.
- Loo, W. T., L. J. Bai, C. B. Fan, Y. Yue, Y. D. Dou, M. Wang, H. Liang, M. N. Cheung, L. Chow, J. L. Li, Y. Tian and L. Qing (2012). "Clinical application of human beta-defensin and CD14 gene polymorphism in evaluating the status of chronic inflammation." J Transl Med 10 Suppl 1: S9.
- Lorenz, E., M. Hallman, R. Marttila, R. Haataja and D. A. Schwartz (2002). "Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population." Pediatr Res 52(3): 373-376.
- Lynch, A. M., J. E. Hart, O. C. Agwu, B. M. Fisher, N. A. West and R. S. Gibbs (2014). "Association of extremes of prepregnancy BMI with the clinical presentations of preterm birth." Am J Obstet Gynecol 210(5): 428 e421-429.
- Mackeen AD, S.-S. J., Muhammad J, Baxter JK, Berghella V (2014). "Tocolytics for preterm premature rupture of membranes (Review)." The Cochrane Collaboration(2).
- Macones, G. A., S. Parry, M. Elkousy, B. Clothier, S. H. Ural and J. F. Strauss, 3rd (2004). "A polymorphism in the promoter region of TNF and bacterial vaginosis: preliminary evidence of gene-environment interaction in the etiology

- of spontaneous preterm birth." Am J Obstet Gynecol 190(6): 1504-1508; discussion 1503A.
- Magann, E. F., K. G. Perry, Jr., J. R. Dockery, Jr., J. D. Bass, S. P. Chauhan and J. C. Morrison (1995). "Cervical ripening before medical induction of labor: a comparison of prostaglandin E₂, estradiol, and oxytocin." Am J Obstet Gynecol 172(6): 1702-1706; discussion 1704-1708.
- Malak, T. M., G. Mulholland and S. C. Bell (1994). "Morphometric characteristics of the decidua, cytotrophoblast, and connective tissue of the prelabor ruptured fetal membranes." Ann N Y Acad Sci 734: 430-432.
- Malak, T. M., C. D. Ockleford, S. C. Bell, R. Dalglish, N. Bright and J. Macvicar (1993). "Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes." Placenta 14(4): 385-406.
- Manabe, Y., S. Yoshimura, T. Mori and T. Aso (1985). "Plasma levels of 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin F₂ alpha, estrogens, and progesterone during stretch-induced labor at term." Prostaglandins 30(1): 141-152.
- Matsushita, I., K. Hasegawa, K. Nakata, K. Yasuda, K. Tokunaga and N. Keicho (2002). "Genetic variants of human beta-defensin-1 and chronic obstructive pulmonary disease." Biochem Biophys Res Commun 291(1): 17-22.
- Maymon, E., R. Romero, P. Pacora, M. T. Gervasi, S. S. Edwin, R. Gomez and D. E. Seubert (2000). "Matrilysin (matrix metalloproteinase 7) in parturition, premature rupture of membranes, and intrauterine infection." Am J Obstet Gynecol 182(6): 1545-1553.
- Maymon, E., R. Romero, P. Pacora, R. Gomez, N. Athayde, S. Edwin and B. H. Yoon (2000). "Human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase 8) in parturition, premature rupture of the membranes, and intrauterine infection." Am J Obstet Gynecol 183(1): 94-99.
- McLaren, J., T. M. Malak and S. C. Bell (1999). "Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: identification of an area of altered morphology overlying the cervix." Hum Reprod 14(1): 237-241.
- McLaren, J., D. J. Taylor and S. C. Bell (2000). "Increased concentration of pro-matrix metalloproteinase 9 in term fetal membranes overlying the cervix before labor: implications for membrane remodeling and rupture." Am J Obstet Gynecol 182(2): 409-416.
- McLaren, J., D. J. Taylor and S. C. Bell (2000). "Prostaglandin E₂-dependent production of latent matrix metalloproteinase-9 in cultures of human fetal membranes." Mol Hum Reprod 6(11): 1033-1040.
- McParland, P. C., S. C. Bell, J. H. Pringle and D. J. Taylor (2001). "Regional and cellular localization of osteonectin/SPARC expression in connective tissue and cytotrophoblastic layers of human fetal membranes at term." Mol Hum Reprod 7(5): 463-474.
- Mesiano, S., E. C. Chan, J. T. Fitter, K. Kwek, G. Yeo and R. Smith (2002). "Progesterone withdrawal and estrogen activation in human parturition are coordinated by progesterone receptor A expression in the myometrium." J Clin Endocrinol Metab 87(6): 2924-2930.

- Milanese, M., L. Segat, A. Pontillo, L. C. Arraes, J. L. de Lima Filho and S. Crovella (2006). "DEFB1 gene polymorphisms and increased risk of HIV-1 infection in Brazilian children." AIDS 20(12): 1673-1675.
- Millar, L. K., J. Stollberg, L. DeBuque and G. Bryant-Greenwood (2000). "Fetal membrane distention: determination of the intrauterine surface area and distention of the fetal membranes preterm and at term." Am J Obstet Gynecol 182(1 Pt 1): 128-134.
- Mitchell, B. F. and B. Schmid (2001). "Oxytocin and its receptor in the process of parturition." J Soc Gynecol Investig 8(3): 122-133.
- Monir-Bishty, E., S. J. Pierce, S. Kupittayanant, A. Shmygol and S. Wray (2003). "The effects of metabolic inhibition on intracellular calcium and contractility of human myometrium." BJOG 110(12): 1050-1056.
- Morrison, J. J., D. S. Charnock-Jones and S. K. Smith (1996). "Messenger RNA encoding thiol protein disulphide isomerase in amnion, chorion and placenta in human term and preterm labour." Br J Obstet Gynaecol 103(9): 873-878.
- Morrison, J. J., S. R. Dearn, S. K. Smith and A. Ahmed (1996). "Activation of protein kinase C is required for oxytocin-induced contractility in human pregnant myometrium." Hum Reprod 11(10): 2285-2290.
- Naeye, R. L. and E. C. Peters (1980). "Causes and consequences of premature rupture of fetal membranes." Lancet 1(8161): 192-194.
- Naslavsky, M. S., S. Crovella, J. L. Lima Filho and C. R. Rocha (2010). "The sound of silence: human beta-defensin-1 gene untranslated SNPs change the predicted mRNA secondary structure in a length-dependent manner." Immunol Lett 129(1): 53-55.
- Nathan, C. (1992). "Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells." FASEB J 6(12): 3051-3064.
- Nathan, C. F. (1987). "Secretory products of macrophages." J Clin Invest 79(2): 319-326.
- Negishi, M., Y. Sugimoto and A. Ichikawa (1995). "Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors." Biochim Biophys Acta 1259(1): 109-119.
- Nixon, W. C. (1951). "Uterine action, normal and abnormal." Am J Obstet Gynecol 62(5): 964-984.
- Norman, J. E., A. J. Thompson, J. F. Telfer, A. Young, I. A. Greer and I. T. Cameron (1999). "Myometrial constitutive nitric oxide synthase expression is increased during human pregnancy." Mol Hum Reprod 5(2): 175-181.
- Norman, J. E., L. M. Ward, W. Martin, A. D. Cameron, J. C. McGrath, I. A. Greer and I. T. Cameron (1997). "Effects of cGMP and the nitric oxide donors glyceryl trinitrate and sodium nitroprusside on contractions in vitro of isolated myometrial tissue from pregnant women." J Reprod Fertil 110(2): 249-254.
- Norstrom, A. (1984). "Acute effects of prostaglandins on the biosynthesis of connective tissue constituents in the non-pregnant human cervix uteri." Acta Obstet Gynecol Scand 63(2): 169-173.
- Norstrom, A., I. Bryman, B. Lindblom and N. J. Christensen (1985). "Effects of 9-deoxy-16,16-dimethyl-9-methylene PGE₂ on muscle contractile activity and collagen synthesis in the human cervix." Prostaglandins 29(3): 337-346.

- Olah, K. S. and H. Gee (1992). "The prevention of preterm delivery--can we afford to continue to ignore the cervix?" Br J Obstet Gynaecol 99(4): 278-280.
- Osman, I., A. Young, M. A. Ledingham, A. J. Thomson, F. Jordan, I. A. Greer and J. E. Norman (2003). "Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term." Mol Hum Reprod 9(1): 41-45.
- Osmers, R., W. Rath, B. C. Adelman-Grill, C. Fittkow, M. Kuloczik, M. Szeverenyi, H. Tschesche and W. Kuhn (1992). "Origin of cervical collagenase during parturition." Am J Obstet Gynecol 166(5): 1455-1460.
- Osmers, R. G., J. Blaser, W. Kuhn and H. Tschesche (1995). "Interleukin-8 synthesis and the onset of labor." Obstet Gynecol 86(2): 223-229.
- Park, K. H., T. Chaiworapongsa, Y. M. Kim, J. Espinoza, J. Yoshimatsu, S. Edwin, R. Gomez, B. H. Yoon and R. Romero (2003). "Matrix metalloproteinase 3 in parturition, premature rupture of the membranes, and microbial invasion of the amniotic cavity." J Perinat Med 31(1): 12-22.
- Pazgier, M., A. Prah, D. M. Hoover and J. Lubkowski (2007). "Studies of the biological properties of human beta-defensin 1." J Biol Chem 282(3): 1819-1829.
- Petersen, L. K., K. Skajaa and N. Uldbjerg (1992). "Serum relaxin as a potential marker for preterm labour." Br J Obstet Gynaecol 99(4): 292-295.
- Prado-Montes de Oca, E. (2010). "Human beta-defensin 1: a restless warrior against allergies, infections and cancer." Int J Biochem Cell Biol 42(6): 800-804.
- Prado-Montes de Oca, E., A. Garcia-Vargas, R. Lozano-Inocencio, M. P. Gallegos-Arreola, L. Sandoval-Ramirez, N. O. Davalos-Rodriguez and L. E. Figuera (2007). "Association of beta-defensin 1 single nucleotide polymorphisms with atopic dermatitis." Int Arch Allergy Immunol 142(3): 211-218.
- Prado-Montes de Oca, E., J. S. Velarde-Felix, J. J. Rios-Tostado, V. J. Picos-Cardenas and L. E. Figuera (2009). "SNP 668C (-44) alters a NF-kappaB1 putative binding site in non-coding strand of human beta-defensin 1 (DEFB1) and is associated with lepromatous leprosy." Infect Genet Evol 9(4): 617-625.
- Presicce, P., S. Giannelli, A. Taddeo, M. L. Villa and S. Della Bella (2009). "Human defensins activate monocyte-derived dendritic cells, promote the production of proinflammatory cytokines, and up-regulate the surface expression of CD91." J Leukoc Biol 86(4): 941-948.
- Price, S. A. and A. L. Bernal (2001). "Uterine quiescence: the role of cyclic AMP." Exp Physiol 86(2): 265-272.
- Rath, W., B. C. Adelman-Grill, U. Pieper, W. Kuhn and R. Osmers (1988). "Collagenase activity in cervical tissue of the non-pregnant and pregnant human cervix." Acta Physiol Hung 71(4): 491-495.
- Rauk, P. N. and J. P. Chiao (2000). "Interleukin-1 stimulates human uterine prostaglandin production through induction of cyclooxygenase-2 expression." Am J Reprod Immunol 43(3): 152-159.
- Ricci, E., S. Malacrida, M. Zanchetta, M. Montagna, C. Giaquinto and A. De Rossi (2009). "Role of beta-defensin-1 polymorphisms in mother-to-child transmission of HIV-1." J Acquir Immune Defic Syndr 51(1): 13-19.

- Roberts, A. K., F. Monzon-Bordonaba, P. G. Van Deerlin, J. Holder, G. A. Macones, M. A. Morgan, J. F. Strauss, 3rd and S. Parry (1999). "Association of polymorphism within the promoter of the tumor necrosis factor alpha gene with increased risk of preterm premature rupture of the fetal membranes." Am J Obstet Gynecol 180(5): 1297-1302.
- Romero, R., J. Espinoza, W. T. Rogers, A. Moser, J. K. Nien, J. P. Kusanovic, F. Gotsch, O. Erez, R. Gomez, S. Edwin and S. S. Hassan (2008). "Proteomic analysis of amniotic fluid to identify women with preterm labor and intra-amniotic inflammation/infection: the use of a novel computational method to analyze mass spectrometric profiling." J Matern Fetal Neonatal Med 21(6): 367-388.
- Romero, R., Gomez, R., Mazor, M., Ghezzi, F. and Yoon, B. H. (1997). The preterm labor syndrome., New York:
- Churchill Livingstone.
- Romero, R., J. C. Hobbins and M. D. Mitchell (1988). "Endotoxin stimulates prostaglandin E2 production by human amnion." Obstet Gynecol 71(2): 227-228.
- Rosselli, M. (1997). "Nitric oxide and reproduction." Mol Hum Reprod 3(8): 639-641.
- Ruetschi, U., A. Rosen, G. Karlsson, H. Zetterberg, L. Rymo, H. Hagberg and B. Jacobsson (2005). "Proteomic analysis using protein chips to detect biomarkers in cervical and amniotic fluid in women with intra-amniotic inflammation." J Proteome Res 4(6): 2236-2242.
- Sadovsky, Y., D. M. Nelson, L. J. Muglia, G. A. Gross, K. C. Harris, A. Koki, J. L. Masferrer and L. M. Olson (2000). "Effective diminution of amniotic prostaglandin production by selective inhibitors of cyclooxygenase type 2." Am J Obstet Gynecol 182(2): 370-376.
- Sandrin-Garcia, P., L. A. Brandao, R. L. Guimaraes, J. A. Pancoto, E. A. Donadi, J. L. Lima-Filho, L. Segat and S. Crovella (2012). "Functional single-nucleotide polymorphisms in the DEFB1 gene are associated with systemic lupus erythematosus in Southern Brazilians." Lupus 21(6): 625-631.
- Sawdy, R. J., D. M. Slater, W. J. Dennes, M. H. Sullivan and P. R. Bennett (2000). "The roles of the cyclo-oxygenases types one and two in prostaglandin synthesis in human fetal membranes at term." Placenta 21(1): 54-57.
- Sayama, K., H. Komatsuzawa, K. Yamasaki, Y. Shirakata, Y. Hanakawa, K. Ouhara, S. Tokumaru, X. Dai, M. Tohyama, P. Ten Dijke, M. Sugai, H. Ichijo and K. Hashimoto (2005). "New mechanisms of skin innate immunity: ASK1-mediated keratinocyte differentiation regulates the expression of beta-defensins, LL37, and TLR2." Eur J Immunol 35(6): 1886-1895.
- Segat, L., M. Milanese, M. Boniotto, S. Crovella, M. Bernardon, M. Costantini, S. Alberico, S. H. I. V. i. O. Italian Group and Gynecology (2006). "DEFB-1 genetic polymorphism screening in HIV-1 positive pregnant women and their children." J Matern Fetal Neonatal Med 19(1): 13-16.
- Segat, L., M. Morgutti, E. Athanasakis, C. Trevisiol, A. Amaddeo, F. Poli and S. Crovella (2010). "Analysis of DEFB1 regulatory SNPs in cystic fibrosis patients from North-Eastern Italy." Int J Immunogenet 37(3): 169-175.
- Sennstrom, M. B., G. Ekman, G. Westergren-Thorsson, A. Malmstrom, B. Bystrom, U. Endresen, N. Mlambo, M. Norman, B. Stabi and A. Brauner (2000). "Hu-

- man cervical ripening, an inflammatory process mediated by cytokines." Mol Hum Reprod 6(4): 375-381.
- Slater, D., V. Allport and P. Bennett (1998). "Changes in the expression of the type-2 but not the type-1 cyclo-oxygenase enzyme in chorion-decidua with the onset of labour." Br J Obstet Gynaecol 105(7): 745-748.
- Slater, D. M., W. J. Dennes, J. S. Campa, L. Poston and P. R. Bennett (1999). "Expression of cyclo-oxygenase types-1 and -2 in human myometrium throughout pregnancy." Mol Hum Reprod 5(9): 880-884.
- Smaill, F. (2001). "Antibiotics for asymptomatic bacteriuria in pregnancy." Cochrane Database Syst Rev(2): CD000490.
- So, T., A. Ito, T. Sato, Y. Mori and S. Hirakawa (1992). "Tumor necrosis factor-alpha stimulates the biosynthesis of matrix metalloproteinases and plasminogen activator in cultured human chorionic cells." Biol Reprod 46(5): 772-778.
- Stella, C. L., M. R. Bennett, P. Devarajan, K. Greis, M. Wyder, S. Macha, M. Rao, C. Jodicke, H. Moussa, H. Y. How, L. Myatt, R. Webster and B. M. Sibai (2009). "Preterm labor biomarker discovery in serum using 3 proteomic profiling methodologies." Am J Obstet Gynecol 201(4): 387 e381-313.
- Stout, M. J., B. Conlon, M. Landeau, I. Lee, C. Bower, Q. Zhao, K. A. Roehl, D. M. Nelson, G. A. Macones and I. U. Mysorekar (2013). "Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations." Am J Obstet Gynecol 208(3): 226 e221-227.
- Sun, C. Q., R. Arnold, C. Fernandez-Golarz, A. B. Parrish, T. Almekinder, J. He, S. M. Ho, P. Svoboda, J. Pohl, F. F. Marshall and J. A. Petros (2006). "Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma." Cancer Res 66(17): 8542-8549.
- Tambor, V., M. Kacerovsky, J. Lenco, G. Bhat and R. Menon (2013). "Proteomics and bioinformatics analysis reveal underlying pathways of infection associated histologic chorioamnionitis in pPROM." Placenta 34(2): 155-161.
- Tesse, R., F. Cardinale, T. Santostasi, A. Polizzi, A. Manca, L. Mappa, G. Iacoviello, F. De Robertis, V. P. Logrillo and L. Armenio (2008). "Association of beta-defensin-1 gene polymorphisms with *Pseudomonas aeruginosa* airway colonization in cystic fibrosis." Genes Immun 9(1): 57-60.
- Thomas, J., A. J. Kelly and J. Kavanagh (2001). "Oestrogens alone or with amniotomy for cervical ripening or induction of labour." Cochrane Database Syst Rev(4): CD003393.
- Thomson, A. J., J. F. Telfer, A. Young, S. Campbell, C. J. Stewart, I. T. Cameron, I. A. Greer and J. E. Norman (1999). "Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process." Hum Reprod 14(1): 229-236.
- Thornton, S., J. I. Gillespie, J. R. Greenwell and W. Dunlop (1992). "Mobilization of calcium by the brief application of oxytocin and prostaglandin E2 in single cultured human myometrial cells." Exp Physiol 77(2): 293-305.
- Uldbjerg, N., G. Ekman, A. Malmstrom, K. Olsson and U. Ulmsten (1983). "Ripening of the human uterine cervix related to changes in collagen, glycosaminoglycans, and collagenolytic activity." Am J Obstet Gynecol 147(6): 662-666.

- Uldbjerg, N., A. Malmstrom, G. Ekman, J. Sheehan, U. Ulmsten and L. Wingerup (1983). "Isolation and characterization of dermatan sulphate proteoglycan from human uterine cervix." Biochem J 209(2): 497-503.
- Uldbjerg, N., U. Ulmsten and G. Ekman (1983). "The ripening of the human uterine cervix in terms of connective tissue biochemistry." Clin Obstet Gynecol 26(1): 14-26.
- Ulug, U., S. Goldman, I. Ben-Shlomo and E. Shalev (2001). "Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 and their inhibitor, TIMP-1, in human term decidua and fetal membranes: the effect of prostaglandin F(2alpha) and indomethacin." Mol Hum Reprod 7(12): 1187-1193.
- Van Meir, C. A., M. M. Ramirez, S. G. Matthews, A. A. Calder, M. J. Keirse and J. R. Challis (1997). "Chorionic prostaglandin catabolism is decreased in the lower uterine segment with term labour." Placenta 18(2-3): 109-114.
- Vankeerberghen, A., O. Scudiero, K. De Boeck, M. Macek, Jr., P. F. Pignatti, N. Van Hul, H. Nuytten, F. Salvatore, G. Castaldo, D. Zemkova, V. Vavrova, J. J. Cassiman and H. Cuppens (2005). "Distribution of human beta-defensin polymorphisms in various control and cystic fibrosis populations." Genomics 85(5): 574-581.
- Vouga, M., G. Greub, G. Prod'hom, C. Durussel, M. Roth-Kleiner, S. Vasilevsky and D. Baud (2014). "Treatment of genital mycoplasma in colonized pregnant women in late pregnancy is associated with a lower rate of premature labour and neonatal complications." Clin Microbiol Infect.
- Wallace, A. M., J. Q. He, K. M. Burkett, J. Ruan, J. E. Connett, N. R. Anthonisen, P. D. Pare and A. J. Sandford (2006). "Contribution of alpha- and beta-defensins to lung function decline and infection in smokers: an association study." Respir Res 7: 76.
- Wang, H., S. Parry, G. Macones, M. D. Sammel, H. Kuivaniemi, G. Tromp, G. Argypoulos, I. Halder, M. D. Shriver, R. Romero and J. F. Strauss, 3rd (2006). "A functional SNP in the promoter of the SERPINH1 gene increases risk of preterm premature rupture of membranes in African Americans." Proc Natl Acad Sci U S A 103(36): 13463-13467.
- WHO, W. H. O. (1993). International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. Geneve.
- Wilson, C. L., A. P. Schmidt, E. Pirila, E. V. Valore, N. Ferri, T. Sorsa, T. Ganz and W. C. Parks (2009). "Differential Processing of {alpha}- and {beta}-Defensin Precursors by Matrix Metalloproteinase-7 (MMP-7)." J Biol Chem 284(13): 8301-8311.
- Winkler, M., D. C. Fischer, P. Ruck, H. P. Horny, B. Kemp and W. Rath (1998). "[Cytokine concentrations and expression of adhesion molecules in the lower uterine segment during parturition at term: relation to cervical dilatation and duration of labor]." Z Geburtshilfe Neonatol 202(4): 172-175.
- Winkler, M. and W. Rath (1999). "[Evidence-based medicine: labor induction with prostaglandins]." Z Geburtshilfe Neonatol 203 Suppl 2: 6-11.
- Word, R. A., K. E. Kamm, J. T. Stull and M. L. Casey (1990). "Endothelin increases cytoplasmic calcium and myosin phosphorylation in human myometrium." Am J Obstet Gynecol 162(4): 1103-1108.

- Worldwide Atosiban versus Beta-agonists Study, G. (2001). "Effectiveness and safety of the oxytocin antagonist atosiban versus beta-adrenergic agonists in the treatment of preterm labour. The Worldwide Atosiban versus Beta-agonists Study Group." BJOG 108(2): 133-142.
- Wray, S. (1993). "Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation." Am J Physiol 264(1 Pt 1): C1-18.
- Wray, S., S. Kupittayanant and T. Shmigol (2002). "Role of the sarcoplasmic reticulum in uterine smooth muscle." Novartis Found Symp 246: 6-18; discussion 18-25, 48-51.
- Xu, P., N. Alfaidy and J. R. Challis (2002). "Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor." J Clin Endocrinol Metab 87(3): 1353-1361.
- Yang, D. and J. J. Oppenheim (2004). "Antimicrobial proteins act as "alarmins" in joint immune defense." Arthritis Rheum 50(11): 3401-3403.
- Yoshida, M., N. Sagawa, H. Itoh, S. Yura, D. Korita, K. Kakui, N. Hirota, T. Sato, A. Ito and S. Fujii (2001). "Nitric oxide increases matrix metalloproteinase-1 production in human uterine cervical fibroblast cells." Mol Hum Reprod 7(10): 979-985.
- Young, A., A. J. Thomson, M. Ledingham, F. Jordan, I. A. Greer and J. E. Norman (2002). "Immunolocalization of proinflammatory cytokines in myometrium, cervix, and fetal membranes during human parturition at term." Biol Reprod 66(2): 445-449.
- Zapata, W., B. Rodriguez, J. Weber, H. Estrada, M. E. Quinones-Mateu, P. A. Zimmermann, M. M. Lederman and M. T. Rugeles (2008). "Increased levels of human beta-defensins mRNA in sexually HIV-1 exposed but uninfected individuals." Curr HIV Res 6(6): 531-538.
- Zhu, S. and B. Gao (2013). "Evolutionary origin of beta-defensins." Dev Comp Immunol 39(1-2): 79-84.
- Zucht, H. D., J. Grabowsky, M. Schrader, C. Liepke, M. Jurgens, P. Schulz-Knappe and W. G. Forssmann (1998). "Human beta-defensin-1: A urinary peptide present in variant molecular forms and its putative functional implication." Eur J Med Res 3(7): 315-323.