UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LARISSA BRITO BASTOS

Infecção do trato genital inferior por *Chlamydia trachomatis* em gestantes de um estudo aninhado à coorte BRISA

Ribeirão Preto
2020

LARISSA BRITO BASTOS

Infecção do trato genital inferior por *Chlamydia trachomatis* em gestantes de um estudo aninhado à coorte BRISA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia – Biologia da Reprodução

Orientatora: Profa. Dra. Silvana Maria Quintana

Ribeirão Preto

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Bastos, Larissa Brito

Infecção do trato genital inferior por Chlamydia trachomatis em gestantes de um estudo aninhado a coorte BRISA. Ribeirão Preto, 2020.

84 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientador: Quintana, Silvana Maria.

1. Parto Pré-termo. 2. Infecção. 3. *Chlamydia trachomatis*. 4. Resposta Imune. 5. Mediadores imunológicos.

Folha de Avaliação

Nome: BASTOS, Larissa Brito

Título: Infecção do trato genital inferior por *Chlamydia trachomatis* em gestantes de um estudo aninhado a coorte BRISA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovada em:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Silvana Maria Quintana

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Julgamento:_____

Profa. Dra. Viviane Cunha Cardoso

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Julgamento:_____

Profa. Dra. Iara Moreno Linhares

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Julgamento:_____

Dedicatória

Este trabalho é dedicado, primeiramente, à minha mãe, que é uma das pessoas que eu mais amo na vida e que há 25 anos desistiu no próprio mestrado para se dedicar às três filhas. Mãe, você é meu maior exemplo de bondade e integridade.

À minha avó Adélia, a mulher mais forte do mundo, por sempre me dar carinho, amor e apoio incondicionais.

Este trabalho existe por vocês, para vocês e graças a vocês. Minha gratidão é imensurável.

Agradecimentos

À Professora Doutora Silvana Maria Quintana pelo apoio, orientação e paciência ao longo desses dois anos de pós graduação. Professora, sua paixão e entusiasmo pela pesquisa e docência são inspiradores. Obrigada por ser um exemplo de profissional.

À minha família, que sempre respeitou, valorizou e se interessou pelo meu trabalho. Em tempos em que a Ciência vem sendo cada vez mais desvalorizada, ter o incentivo de vocês foi essencial.

Aos meus amigos, que tornaram essa jornada mais leve e prazerosa.

Ao meu namorado, que sempre apoiou minhas decisões e escutou minhas maiores ansiedades. Obrigada por permitir que eu compartilhe minha vida com você e por ser o melhor companheiro que eu poderia ter.

À Stella, Suleimy e Suelen pela paciência e ajuda indispensáveis para que eu pudesse finalizar esta dissertação e por serem excelentes profissionais.

À Giulia, pela parceria e pela ajuda, que foi essencial para a qualidade deste trabalho.

Aos professores Doutor Ricardo de Carvalho Cavalli e Doutora Viviane Cunha Cardoso pela paciência, orientação e apoio neste projeto.

Ao Núcleo de Pesquisas em Saúde Coletiva da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e ao Núcleo de Estudos de Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA) da Universidade de São Paulo (USP – Campus Ribeirão Preto) e toda equipe envolvida no Projeto BRISA de Ribeirão Preto e São Luís pelo fornecimento do banco de dados e por solucionar todas as minhas dúvidas prontamente. Ainda, agradeço também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), FAEPA e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao BRISA.

Por fim, ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) que se deu por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX). Além disso, este trabalho foi desenvolvido com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a quem eu agradeço pela concessão da minha bolsa de estudo de Mestrado.

Sumário

Resumo viii
Abstract x
LISTA DE FIGURAS xii
LISTA DE TABELAS xiii
LISTA DE SIGLAS xiv
Introdução 16
Objetivos 21
Pacientes e métodos 21
Dosagem de TGF-α, IFN-γ, IL-10, IL-13, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α, TNF-β 23
Dosagem de MMP-2 e MMP-9 24
Diagnóstico de infecção por *Chlamydia trachomatis* 25
Análise estatística 26
Resultados 27
Discussão 29
Conclusão 40
Sugestões para trabalhos futuros 40
Bibliografia 41
ANEXOS 47
APÊNDICE 61

Resumo

BASTOS, Larissa Brito. **Infecção do trato genital inferior por *Chlamydia trachomatis* em gestantes de um estudo aninhado a coorte BRISA**. 2020. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Ginecologia e Obstetrícia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

O Parto Pré-Termo (PPT) está relacionado a um elevado grau de morbidade materna e neonatal. Embora sua etiologia seja multifatorial, as infecções bacterianas têm sido responsabilizadas por até 50% dos casos, constituindo um importante fator de risco. Dentre as potenciais bactérias que podem estar associadas ao PPT, destacamos a *Chlamydia trachomatis* (CT). Por isso, este trabalho visou avaliar a associação entre infecção por *Chlamydia trachomatis* e PPT espontâneo (PPTe) nas gestantes da coorte pré-natal do Projeto BRISA. Para isso, foram analisadas parte das gestantes entre 20 e 25 semanas e 6 dias provenientes da coorte pré-natal de 2010-2011 do Projeto BRISA. Neste recorte, incluímos todas as gestantes de PPTe e os casos de parto a termo (Controle) foram selecionados randomicamente. Para o diagnóstico de CT, foi realizado Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com amostras de conteúdo cervicovaginal. Os mediadores inflamatórios TGF-α, IFN-γ, IL-10, IL-13, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α, TNF-β foram dosados por Ensaio Multiplex®, as MMP-2 e -9 foram quantificadas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA) a partir de amostras de plasma. As gestantes incluídas também para coleta de dados sociodemográficos, comportamentais e histórico clínico. Todas as participantes assinaram o TCLE concordando em participar do estudo e as amostras foram coletadas no momento da inclusão. Os dados obtidos foram analisados pelo software SAS – versão 9.4 e os resultados com $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Ao todo, foram analisadas 561 gestantes, sendo 121 de PPTe e 440 de parto a termo. Dentre os principais achados, destacamos a ausência de associação entre a infecção por CT e desfecho de PPTe (OR 1,127; IC 95% 0,497 – 2,558) e a relação entre histórico de PPT prévio e desencadeamento de um PPTe (aOR 17,442; IC 95% 8,773 – 34,677). Ainda, foi observado maior frequência de diagnóstico positivo para CT entre as gestantes com idade igual ou inferior a 19 anos ($p=0,0032$; OR 4,046; IC 95% 1,734 – 9,436). Os níveis de TGF-α, IFN-γ, IL-10, IL-13, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α, TNF-β não diferiram entre as gestantes, no entanto, o nível de MMP-2 esteve aumentado no grupo Controle ($p=0,0184$), já no caso da MMP-9, seus níveis estavam

significativamente aumentados no grupo de PPTe ($p<0,0001$). Desta forma, a infecção por *Chlamydia trachomatis* não esteve associada ao desfecho de PPTe na parcela da coorte BRISA analisada, no entanto, a associação da bactéria com gestantes jovens sugere maior cautela no manejo clínico dessas pacientes. A avaliação do perfil imunológico de gestantes deve ser mais profundamente investigada para que se possa chegar a uma conclusão concreta sobre a relação de algum mediador e o desfecho gestacional.

Palavras chave: Parto Pré-termo, Infecção, *Chlamydia trachomatis,* Resposta Imune, Mediadores Imunológicos.

Abstract

BASTOS, Larissa Brito. ***Chlamydia trachomatis* lower genital tract infection in pregnant women from a study nested in the BRISA cohort**. 2020. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Ginecologia e Obstetrícia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Preterm Birth (PTB) is associated with a high degree of maternal and neonatal morbidity. Although its etiology is multifactorial, bacterial infections have been responsible for up to 50% of cases, constituting an important risk factor. Among the potential bacteria that may be associated with PTB, we highlight *Chlamydia trachomatis* (CT). So, we aimed to evaluate the association between Chlamydia trachomatis infection and spontaneous PTB (sPTB) in pregnant women of a prenatal cohort named BRISA Project. This study analyzed part of the pregnant women with 20-25 gestational weeks and 6 days all from BRISA prenatal cohort of 2010-2011. All pregnant women with sPTB were included and the cases of term delivery were randomly selected for the Control group. Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed for CT's diagnosis in cervicovaginal fluid samples. The immune mediators TGF-α, IFN-γ, IL-10, IL-13, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α, and TNF-β were measured using Multiplex Assay, MMP-2 and -9 were quantified by Immunoenzymatic Assay (ELISA) in plasma samples. All pregnants included were also interviewed for sociodemographic, behavioral and clinical history data collection. They also had signed the Consent Form at the time of inclusion and before samples collection. Our results were analyzed using SAS software – version 9.4, results with $p<0.05$ were considered statistically significant. 561 pregnant were evaluated, 121 of them had sPTB and 440 had term delivery (Control). Among our main findings, we highlight the absence of association between CT infection and sPTB (OR 1.127; 95% CI 0.497 – 2.558) and the association between previous PTB in triggering a sPTB (aOR 17.42; 95% CI 8.773 – 34.677). Besides, we observed a higher frequency of CT infection among younger pregnant (19 years old or less) ($p=0.0032$; OR 4.046; 95% CI 1.734 – 9.436). Levels of TGF-α, IFN-γ, IL-10, IL-13, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α and TNF-β did not differ between the groups, however, MMP-2 level was increased in Control group ($p=0.0184$), whereas MMP-9 was significantly increased in sPTB group ($p<0.0001$). Therefore, Chlamydia trachomatis infection was not associated with sPTB in this part

of BRISA cohort that we had analyzed. However, its correlation with younger pregnant suggests that these patients require more caution in clinical management. The immunological profile of pregnant should be further investigated to achieve concrete knowledge about the relationship of any immune mediator and pregnancy outcome.

Key words: Preterm Birth, Infection, *Chlamydia trachomatis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma para triagem e inclusão das gestantes no Projeto BRISA e recorte da amostra para análise no presente estudo 55

Figura 2. Gráficos box-plot dos níveis de TGF-α (a), IFN-γ (b), IL-10 (c), IL-13 (d), IL-1α (e), IL-1β (f), IL-2 (g), IL-4 (h), IL-6 (i), IL-8 (j), TNF-α (k), TNF-β (l), MMP-2 (m) e MMP-9(n) no plasma das gestantes (n=561). BRISA, 2010 – 2011..... 57

Figura 3. Árvore de inferência condicional com as variáveis: PPT em gestação anterior (Previous PTB) e níveis de MMP-9 no plasma. BRISA, 2010 – 2011..... 58

Figura 4. Árvore de inferência condicional considerando apenas os níveis de MMP-9. BRISA, 2010 – 2011 59

Figura 5. Curva ROC e área sob a curva para mensurar o valor preditivo da MMP-9 no desencadeamento do PPTe. BRISA, 2010 – 2011 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características sociodemográficas, comportamentais e histórico médico das gestantes (n=561) de acordo com o desfecho gestacional. BRISA, 2010 – 2011.....47

Tabela 2. Valores de Odds Ratio bruto de acordo com desfecho gestacional (n=561). BRISA, 2010 – 2011.....49

Tabela 3. Valores de Odds Ratio ajustada para as variáveis de Tabagismo e PPT anterior (n=561). BRISA, 2010 – 2011 51

Tabela 4. Distribuição das gestantes em relação a presença da infecção por CT em cada categoria de idade (n=636). BRISA, 2010 – 2011 52

Tabela 5. Valores de Odds Ratio bruto para a variável de idade de acordo com o desfecho de presença de infecção por C. trachomatis (n=636). BRISA, 2010 – 2011 53

Tabela 6. Níveis dos mediadores inflamatórios no plasma das gestantes (n=561). BRISA, 2010 – 2011.....54

LISTA DE SIGLAS

aOR: *odds ratio* ajustado

BRISA: *Brazilian Ribeirão Preto and São Luís Birth Cohort Studies*

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CEPEC: Centro de Pesquisas Clínicas

CR1: Receptor de Complemento 1

CT: *Chlamydia trachomatis*

DIP: Doença Inflamatória Pélvica

DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

G-CSF: Fator estimulador de colônias granulocitárias

HC – FMRP – USP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicida de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

Hsp: Proteína de choque térmico (*heat-shock protein*)

IFN: Interferon

IL: Interleucina

MMP: Metaloproteinase de Matriz

NESCA: Núcleo de Estudos de Saúde da Criança e do Adolescente

OMS: Organização Mundial de Saúde

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PPT: Parto Pré-Termo

PPTe: Parto Pré-Termo espontâneo

RN: Recém nascido

RPM: Ruptura Prematura de Membranas

RPMPT: Ruptura Prematura de Membranas Pré-Termo

SUS: Sistema Único de Saúde

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF: Fator de Transformação do Crescimento (*transforming growth factor*)

TGIF: Trato Genital Inferior Feminino

Th1/Th2: T helper 1 ou 2

TIMP: Inibidor tecidual de metaloproteinase

TLR: Receptor do tipo Toll

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TV: Transmissão vertical

UFMA: Universidade Federal do Maranhão

UPC: Unidade de Pesquisa Clínica

USP: Universidade de São Paulo

Introdução

No cenário mundial, a prematuridade é um desfecho com elevada prevalência e morbidade. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2014 nasceram 14,8 milhões de crianças prematuras no mundo, o que correspondeu a 10,6% dos nascidos vivos (CHAWANPAIBOON et al., 2019). No mesmo ano, a prevalência de partos pré-termo no Brasil foi de 11,2% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). O estudo “Nascer no Brasil” demonstrou que a taxa de prematuridade não difere entre as regiões brasileiras assim como em relação ao tipo de atendimento (público ou privado). Entretanto, ela é mais elevada nas capitais e os casos de Parto Pré-Termo (PPT) são de etiologia predominantemente espontâneas tardias (LEAL et al., 2016).

De acordo com o relatório da OMS intitulado “*Born Too Soon –The Global Action Report on Preterm Birth*” publicado em 2012, a prematuridade e as complicações decorrentes do nascimento prematuro são uma das principais causas de morte neonatal (HOWSON; KINNEY; LAWN, 2012). Em 2016, as complicações decorrentes de PPT foram a principal causa de morte em crianças com menos de 5 anos, correspondendo a 16% de todas as mortes no mundo e, dentre essas, 35% foram de recém-nascidos (RN) (CHILDREN’S FUND, 2017). A revisão sistemática de BLENCOWE et al. (2013) mostrou ainda que a prematuridade pode gerar sequelas a longo prazo como deficiência auditiva, doença cardiovascular, paralisia cerebral, problemas de aprendizagem além de outros efeitos neurocomportamentais.

Segundo a definição clássica estabelecida pela OMS em 1977, Parto Pré-Termo (PPT) é aquele que ocorre antes de completar a 37ª semana de gestação ou com menos de 259 dias após o primeiro dia do último ciclo menstrual (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1977). Pode ainda ser classificado de acordo com a idade gestacional ao nascer, sendo prematuro extremo aquele em que o nascimento antes da 28ª semana, moderado nascido entre 28 e 32 e tardio entre 32 e 37 semanas gestacionais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Ainda, é possível subdividir o PPT como espontâneo, quando se inicia de forma espontânea ou em decorrência de Ruptura Prematura de Membranas (RPM), ou como PPT iatrogênico, quando ocorre a indução do trabalho de parto ou cesariana eletiva antes de 37 semanas completas de gestação por indicações maternas e/ou fetais ou por outras razões não médicas (GOLDENBERG et al., 2012; BLENCOWE et al., 2013).

Atualmente acredita-se que o PPT seja uma síndrome com influência de múltiplos fatores, porém sem causa definida na maioria dos casos. Dentre os fatores ambientais relacionados ao PPT, destaca-se o tabagismo, a dieta e o estresse (SHAPIRO et al., 2013; TONG et al., 2002); quanto aos fatores endógenos, inclui-se histórico de PPT em gestação anterior, colo curto e polimorfismos em genes reguladores da resposta inflamatória do Trato Genital Inferior Feminino (TGIF) (BERGHELLA; BAXTER; HENDRIX, 2014; GÓMEZ et al., 2010). Ressaltam-se também as infecções do trato genital feminino como importante fator de risco, podendo estar associadas a aproximadamente 25 – 40% dos casos de PPT (NADEAU; SUBRAMANIAM; ANDREWS, 2015).

As situações de estresse causadas por esses fatores de risco desencadeiam a ativação do fator de transcrição NF-kB, responsável pela transcrição de genes de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias além de ser capaz de inibir o mecanismo de autofagia pelo aumento da produção intracelular de hsp70. Este meio pró-inflamatório facilita a atividade da cicloxigenase e produção de prostaglandina, as quais estimulam a contração do miométrio para desencadeamento do trabalho de parto (SISTI; KANNINEN; WITKIN, 2015). Quando a gestante é exposta aos fatores de risco ao longo de toda a gestação, esta cascata de reações pode ocorrer precocemente.

O mecanismo que envolve a infecção bacteriana como desencadeadora do processo que culmina no PPT não é completamente conhecido, no entanto, em revisão sistemática, Nadeau et al.(2015) propõe que o mais provável é a ascensão de microrganismos patogênicos que infectam o TGIF para a cavidade amniótica. Esta ascensão desencadeia uma resposta imune nos tecidos fetais e maternos (decídua) após os agentes infecciosos serem reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), sendo os receptores do tipo Toll (TLR) os principais envolvidos. Após o reconhecimento, esses microrganismos induzem uma cascata de reações intracelulares que culminam na produção de quimiocinas, como IL-8, e citocinas como IL-1β, IL-6, TNF-α e G-CSF além de induzirem a ativação de neutrófilos e síntese e liberação de prostaglandinas, responsáveis por estimularem as contrações uterinas e liberação de Metaloproteinases de Matriz (MMP). As MMPs, por sua vez, vão atuar na degradação das membranas corioamnióticas e do colágeno do colo uterino, favorecendo a ocorrência de uma RPM e PPT.

Dentre as infecções que podem estar associadas ao desencadeamento de um PPT espontâneo, destacamos a *Chlamydia trachomatis* (CT). Esta bactéria é um patógeno gram negativo, intracelular obrigatório, sexualmente transmissível, altamente prevalente na população jovem e, de acordo com a OMS, durante o ano de 2012, foi responsável por 131 milhões de novos casos na população mundial feminina. Apesar de sua alta prevalência, 70% a 80% dos casos de infecção clamidiana se apresentam de forma assintomática, favorecendo o desenvolvimento de infecções crônicas, as quais podem levar ao desenvolvimento de Doença Inflamatória Pélvica (DIP) e infertilidade. Em mulheres no período de vida reprodutiva, a idade abaixo de 19 anos é um dos principais fatores associados com a infecção por *C. trachomatis.* Destacam-se também o início da vida sexual antes dos 15 anos, o maior número de parceiros sexuais, co-infecção por *Neisseria gonorrhoeae* ou HIV, ectopia cervical, tabagismo, escolaridade e baixa renda (GARCÊS et al., 2013; PINTO et al., 2011; WITKIN et al., 2017).

Em gestantes, estima-se que a prevalência de infecção por *C. trachomatis* esteja entre 2 e 37%. De acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atendimento Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis do Ministério da Saúde, em 2011, a prevalência de infecção clamidiana em gestantes brasileiras foi de 9,8% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Além do PPT, a infecção clamidiana durante a gestação também tem sido associada a RPM, endometrite puerperal, natimortalidade, morte perinatal, infecção neonatal e baixo peso ao nascer (COSTA et al., 2010). Esses desfechos podem ser parcialmente explicados pela infecção fetal e pelo comprometimento placentário pela bactéria (BAUD; GREUB, 2011; GOLDENBERG et al., 2011).

Apesar de o mecanismo pelo qual a *C. trachomatis* desencadeia desfechos obstétricos adversos não ser completamente conhecido, sabe-se que a resposta inflamatória desenvolvida pelo organismo infectado pela CT é do tipo Th1. Esta resposta é baseada principalmente no estímulo de células fagocíticas para controle de patógenos intracelulares como a CT, tendo o interferon γ (IFN- γ) como importante mediador para controle da replicação bacteriana no interior da célula (WITKIN et al., 2000). Este mecanismo de defesa ainda pode envolver a produção e liberação de metaloproteinases de matriz (MMP) como a MMP-9, que são capazes de degradar colágeno, proteoglicanos e fibronectina (VASILEVSKY; GREUB; NARDELLI-

HAEFLIGER, 2014; WITKIN et al., 2000), contribuindo para o desencadeamento do PPT.

Outro possível mecanismo de resposta imune materna contra a CT que pode influenciar no desfecho gestacional é a resposta contra as proteínas *heat-shock*-60kDa (CHSP-60) da bactéria que, por serem muito semelhantes às CHSP-60 humanas, levariam à rejeição do feto. A resposta materna às CHSP-60 pode ainda ser responsável pelo comprometimento tubário que leva à infertilidade e gestação ectópica, sequelas típicas desta infecção (ADACHI; NIELSEN-SAINES; KLAUSNER, 2016; AULT et al., 1998; BAKKEN, 2008; STEPHENS; AUBUCHON; SCHUST, 2011; WITKIN et al., 2017).

Ainda, a transmissão vertical (TV) transplacentária da CT pode ocorrer, principalmente após o primeiro trimestre (HONKILA et al., 2017), mas também é possível a TV na passagem do feto pelo canal do parto. Durante sua passagem pelo canal do parto, os recém nascidos (RN) apresentam 50% a 75% de chance de adquirir clamídia das mães não tratadas (DARVILLE, 2005), com 30% a 50% dos RN desenvolvendo conjuntivite e 10 a 20% pneumonia (HAMMERSCHLAG, 2011) nos primeiros 60 dias de vida (BORBOREMA-ALFAIA et al., 2013). A transmissão da CT no nascimento ainda pode ocasionar otite e faringite ao RN, além disso, podem ocorrer sequelas a longo prazo como a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (MARDH, 2002). Considerando as possíveis consequências da infecção para o RN, a ausência de programa adequado de pré-natal para rastreio desta infecção no sistema público de saúde brasileiro é preocupante (COSTA et al., 2010).

Apesar disso, ainda existe um conflito na literatura sobre a associação entre CT e PPT ou outros resultados obstétricos adversos. Esta disparidade se deve principalmente aos diferentes desenhos de estudo, às diferentes populações analisadas e às técnicas e amostras utilizadas para diagnóstico de CT. Em estudo de metanálise conduzido por SILVA et al. (2011), a infecção por CT durante a gestação esteve associada com aumento no risco de PPT (RR 1,35; IC 95% 1,11 – 1,63), baixo peso ao nascer (RR 1,52; IC 95% 1,24 – 1,87) e mortalidade perinatal (RR 1,84; IC 95% 1,15 – 2,94). Outro estudo, conduzido por Liu et al. (2013), mostrou que o diagnóstico de clamidíase, dado tanto em momento anterior quanto durante a gestação, está associado a um PPT espontâneo (aOR 1,17; IC 95% 1,01 – 1,37).

Todavia, um estudo retrospectivo de caso-controle realizado por JOHNSON et al. (2011) não encontrou associação entre a clamídia e o nascimento prematuro, apenas com o baixo peso ao nascer (aOR 2,09. IC 95% 1,01 – 4,24). Outro estudo de coorte, mais recente e com amostra de base populacional, também não encontrou associação significativa entre esta bactéria e PPT (OR 1,08, IC 95% 0,91 – 1,28), natimortalidade (OR 0,93, IC 95% 0,61 – 1,42) e RNs pequenos para idade gestacional (OR 0,95, IC 95% 0,85 – 1,07), com ajuste para idade, etnia, tabagismo e histórico para outras infecções (REEKIE et al., 2018). Essas discrepâncias de resultados acerca da relação da infecção por *Chlamydia trachomatis* com o PPT ou outros desfechos adversos não fornece informação suficientemente consistente para incluir seu rastreio nas gestantes da rede pública de saúde.

Considerando a relação que a prematuridade tem com o aumento da morbimortalidade neonatal e seus altos índices de prevalência, investigar os fatores predisponentes para o Parto Pré-Termo (PPT) é de grande importância para a saúde pública (HAQUE et al., 2017). Baseado nisso, o Núcleo de Pesquisas em Saúde Coletiva da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) em São Luís – MA juntamente com o Núcleo de Estudos de Saúde da Criança e do Adolescente (NESCA) da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto – SP iniciaram o estudo de coorte “Fatores etiológicos do Parto Pré-Termo e consequências de fatores perinatais na saúde das crianças: coortes de nascimento em duas cidades brasileiras” também denotado BRISA (Brazilian Ribeirão Preto and São Luís Birth Cohort Studies) para analisar os fatores neuroendócrinos e imunoinflamatórios sobre o desencadeamento do PPT.

Devido ao possível impacto das infecções bacterianas sobre o desfecho gestacional, o presente trabalho trata de um recorte na coorte pré-natal de 2010 – 2011 do projeto BRISA para avaliar a prevalência da infecção por *Chlamydia trachomatis* nas gestantes incluídas neste momento e a influência deste patógeno no PPT. Trata-se do primeiro trabalho relacionando essas variáveis nas populações de Ribeirão Preto – SP e São Luís – MA. Além disso, ele pode contribuir com novas evidências para reafirmar ou não a hipótese imunoinflamatória do PPT em relação a infecção clamidiana. Visto que o Brasil não apresenta um programa de rastreio para CT e as consequências tanto de uma infecção clamidiana quanto da prematuridade

ao RN, todo estudo que apresente um delineamento e execução corretos é importante visto que poderá contribuir para a melhora nos cuidados das gestantes.

Objetivos

Avaliar a prevalência da infecção por *Chlamydia trachomatis* na coorte pré-natal de gestantes dos anos 2010 – 2011 do Projeto "Fatores etiológicos do Parto Pré-Termo e consequências de fatores perinatais na saúde das crianças: coortes de nascimento em duas cidades brasileiras", denotado BRISA (Brazilian Ribeirão Preto and São Luís Birth Cohort Studies), relacionando o *status* da infecção com o desfecho gestacional de Parto Pré-Termo e com os principais mediadores inflamatórios associados a infecção bacteriana e desencadeamento do trabalho de parto.

Pacientes e métodos

Este trabalho é um recorte do projeto temático intitulado "Fatores etiológicos do Parto Pré-Termo e consequências dos fatores perinatais na saúde da criança: coortes de nascimento em duas cidades brasileiras" que consistiu em uma coorte de nascimentos com amostra de conveniência que aconteceu em dois centros distintos: Ribeirão Preto (SP) e São Luís (MA). O objetivo do projeto foi investigar fatores de risco para a prematuridade através de hipóteses neuroendócrina, imunoinflamatória e de intervenção médica em uma coorte com amostra de conveniência. No caso do presente trabalho, avaliamos apenas as amostras e variáveis relacionadas à hipótese imunoinflamatória para relacionar o PPT com a presença de infecção por *C. trachomatis*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) com processo de número 11157/2008 e pelo CEP do Hospital da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) com processo de número 4771/2008-30.

O Projeto BRISA é uma coorte com amostra de conveniência que incluiu gestantes que recebiam cuidados de pré-natal em redes de serviços de saúde públicas e privadas. Portanto, elas eram triadas em Unidades Básicas de Saúde, clínicas de ultrassonografia, clínicas particulares e nas unidades de internação do

Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Maranhão (UFMA, São Luís – Maranhão, Brasil) e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP USP, Ribeirão Preto – São Paulo, Brasil).

Quanto aos critérios de elegibilidade, foram incluídas gestantes de feto único que se encontravam entre 20 e 25 semanas gestacionais, de acordo com exame de ultrassonografia. As mulheres triadas eram convidadas a participar do estudo e encaminhadas ao Centro de Pesquisas Clínicas (CEPEC) do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, ou à Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) da Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto onde consentiam em participar da pesquisa assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para posteriormente responderem a um questionário para coleta de dados socioeconômicos, comportamentais e de história médica. Após o questionário, as gestantes eram submetidas a coleta de sangue e urina, exame ginecológico e odontológico e ultrassonografia para confirmação da idade gestacional.

De acordo com cálculo amostral, foi planejada a inclusão de 1500 mulheres em cada centro de pesquisa. O cálculo foi baseado nas prevalências relatadas das variáveis explanatórias que são objetos de estudo do Projeto BRISA e que variam de 10 a 50%. Desta forma, considerando-se uma taxa de prematuridade de 12%, partiu-se da amostra inicial de 1500 mulheres e seus respectivos RN.

O recrutamento das gestantes em ambos os centros ocorreu entre os anos de 2010 e 2011. Considerando a idade gestacional no momento do nascimento, as mulheres classificadas da seguinte maneira: gestantes com parto à termo (Controle) aquelas cujo parto ocorreu igual ou após 37 semanas gestacionais completas e gestantes com parto pré termo (PPT), sendo considerados PPT aqueles que aconteceram em momento anterior a 37 semanas gestacionais.

Os casos de PPT foram classificados como espontâneos ou iatrogênicos de acordo com o motivo da hospitalização da gestante no momento do parto. As gestantes que foram hospitalizadas por motivos de sangramento, perda de líquido amniótico e presença de contração, dor ou cólica antes das 37 semanas foram consideradas como tendo PPT espontâneo (PPTe). Para uma análise mais fidedigna dos fatores associados ao PPT, incluímos apenas as gestantes de PPTe no grupo de

PPT, uma vez que os PPTs “não espontâneos” foram induzidos por razões maternas e/ou fetais.

Dentre os casos de PPTe e parto a termo selecionados de ambos os centros de pesquisa para o presente estudo, foram consideradas apenas as amostras de plasma e de conteúdo cervical que se encontravam viáveis e disponíveis em laboratório para as análises propostas. As amostras referentes às gestantes de São Luís foram encaminhadas para processamento em Ribeirão Preto.

As amostras de plasma foram coletadas por punção venosa, em sistema a vácuo, no momento de inclusão no estudo utilizando-se tubo de polietileno com EDTA para quantificação de mediadores inflamatórios. Essas amostras foram centrifugadas a 3500rpm por 10 minutos a 4ºC, posteriormente aliquotadas em tubos eppendorfs de 2 µL e congeladas em freezer -80ºC localizado no Laboratório Multiusuário da FMRP/USP até seu processamento. Os mediadores inflamatórios TGF-α, IFN-γ, IL-10, IL-13, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α, TNF-β foram dosados por MILLIPLEX Ensaio Multiplex®, as MMP-2 e -9 foram quantificadas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

As amostras de conteúdo cervical foram coletadas durante exame ginecológico, também realizado no momento de inclusão, utilizando *cytobrush.* Este permaneceu armazenado em criotubos devidamente identificados para cada paciente contendo 1 mL de Soro Fisiológico 0,9% e congelados em freezer -80ºC localizado no Laboratório Multiusuário da FMRP/USP. O processamento dessas amostras se deu por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para diagnóstico de infecção por *Chlamydia trachomatis*.

Dosagem de TGF-α, IFN-γ, IL-10, IL-13, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α, TNF-β

Para a dosagem dos mediadores TGF-α, IFN-γ, IL-10, IL-13, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α, TNF-β foi confeccionado um painel específico para ensaio Milliplex com tecnologia multiplex. Por isso, todos os analitos foram dosados conjuntamente e sem a necessidade de grande volume de amostra. Para isso, foi

utilizado o kit MILLIPLEX® Multiplex Assays utilizando Luminex LX 200® (Cat #: HCYTOMAG-60K – Merck).

Para a confecção da curva padrão do ensaio, foi preparado a solução padrão de citocina humana através da reconstituição da solução padrão liofilizada em água deionizada. Desta forma, obtivemos as seguintes concentrações de solução padrão: 2000, 400, 80, 16 e 3,2 pg/mL.

A leitura das placas com as amostras e curva padrão foi realizada pelo equipamento Luminex LX 200® com limite de detecção de 50 *beads* por *set* e os resultados foram calculados através do MilliPlex Analyst utilizando o *Curve Fit 4-parameter*.

Dosagem de MMP-2 e MMP-9

As MMPs foram dosadas pelo método de ELISA. A MMP-2 foi quantificada utilizando o kit R&D Systems® (SMP2F0) de acordo com as instruções do fabricante. Para a MMP-2, as amostras foram previamente diluídas em calibrador diluente RD5-32 em proporção 1:10 ou 1:20. A preparação da curva padrão foi realizada utilizando as seguintes concentrações de solução padrão: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 e 0,78 ng/mL, com o próprio calibrador diluente RD5-32 como padrão zero (0 ng/mL).

A dosagem da MMP-9 se fez com o kit Invitrogen® (Catalog #KHC3061) de acordo com seu protocolo original. Para a MMP-9, as amostras foram previamente diluídas em *buffer* diluente padrão em razão 1:10. Posteriormente, houve nova diluição utilizando mesmo *buffer* em proporção 1:80. Ainda, as amostras do grupo de PPTe passaram por nova diluição até chegarem na proporção 1:160. A curva padrão foi preparada com as seguintes concentrações do Hu MMP-9: 750, 375, 187,5, 93,8, 46,9 e 23,5 pg/mL com o diluente padrão sendo utilizado como “zero” (0 pg/mL).

A leitura das placas para análise de MMP-2 e MMP-9 foi realizada em equipamento Spectra Max M3 Molecular Devices com limite de detecção de 450nm. Como se trata de um ensaio colorimétrico cuja dosagem dos níveis do analito é feita pela medida da densidade ótica das soluções, os níveis de MMP-2 e MMP-9 nas amostras foram quantificados utilizando o *software* SoftMax Pro 6.2.1 com o parâmetro *Curve Fit 4-parameter*.

Diagnóstico de infecção por *Chlamydia trachomatis*

A extração do DNA genômico de *C. trachomatis* foi realizada a partir do conteúdo vaginal, utilizando o kit de extração QIAamp® (Cat. Number: 51306) segundo as instruções do fabricante.

A integridade das amostras do DNA extraído, foi observada em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed® (Biotium). Todas as amostras de DNA foram quantificadas no equipamento NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific), segundo as instruções do fabricante.

Para a indentificação da *C. trachomatis* foi realizada a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) multiplex utilizando 2 pares de *primers* específicos do DNA plasmidial: o CtP1: 5'-TAGTAACTGCCACTTCATCA-3', CtP2: 5´-TTCCCCTTGTAATTCGTTGC-3' e PL6.1: 5´-AGAGTACATCGGTCAACGA-3', PL6.2: 5'-TCACAGCGGTTGCTCGAAGCA-3', (Morreé, S. A., et.al., 1996) (fabricados pela IDT-Integrated DNA Technologies).

As reações de PCR multiplex com volume final de 25 µL continham: 12,5 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, Cat. Number: M7132); 0,1 µM de cada primer; 15 ng/µL de DNA e UltraPure Distiled Water (Invitrogen, Cat. No. 10977-015) q.s.p. Foram utilizados como controle negativo: sem DNA reação contendo os demais reagentes e UltraPure Distiled Water (Invitrogen, Cat. No. 10977-015), e controles negativos com DNA humano e DNA de *E. coli*.

Todas as reações de PCR foram realizadas no termociclador Veriti (Applied Biosystems) segundo o programa de termociclagem: desnaturação inicial de 95°C durante 5 minutos; 40 ciclos: desnaturação a 95°C durante 1 minuto, anelamento a 54°C durante 1 minuto, extensão a 72°C durante 1 minuto e 30 segundos, seguido de extensão final a 72°C durante 5 minutos.

Os fragmentos gerados pelos pares de primers CtP de 201bp e do PL6 de 130bp, foram observados em gel de agarose 2,5% corado com GelRed® (Biotium), comparados ao marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (Promega, Part. No. G210A), após eletroforese em tampão TBE 1x, para separação das bandas. Amostras

que apresentaram as duas bandas relativas à 201bp e 130bp foram consideradas positivas.

Análise estatística

Inicialmente foi realizada uma análise exploratória de dados através de medidas de posição central e de dispersão. Gráficos de Box-plot foram realizados para verificar a distribuição dos dados em cada grupo. As variáveis qualitativas estão apresentadas em relação as frequências absolutas e relativas.

Uma análise univariada foi desempenhada através de Qui-quadrado e teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras independentes com a finalidade de verificar quais das variáveis diferiam entre os grupos estudados.

Além disso, foram construídos modelos de Regressão Logística univariados e multivariados. Estes modelos possibilitaram encontrar quais as variáveis estavam associadas com o desfecho de prematuridade e quantificar esta associação através da medida de tamanho de efeito *odds ratio* (OR).

Para identificar os fatores associados ao PPTe, foi construída uma árvore de inferência condicional. A árvore de inferência condicional é uma classe de regressão não paramétrica que incorpora modelos regressão estruturados em árvore dentro de uma estrutura bem definida de procedimentos de inferência condicional. Ela é aplicada a todos os tipos de modelos estatísticos, modelos específicos para variáveis dependente quantitativas ou qualitativas (Hothorn et al. 2015). Para esta análise foi utilizando o programa R versão 3.3.3.

Para verificar o poder discriminativo das citocinas sob o desfecho estudado, foi realizado cálculo da curva ROC (Receiver Operating Characteristic) utilizando também o programa R versão 3.3.3.

Resultados com $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A análise exploratória, assim como cálculo dos testes de Qui-quadrado, Wilcoxon para amostras independentes e Regressão Logística deste estudo foram realizados pelo software SAS versão 9.4.

Resultados

Na coorte de Ribeirão Preto (SP), 1400 mulheres passaram por triagem e atenderam aos critérios de elegibilidade, dentre essas, 1363 tiveram seguimento no estudo após o nascimento do RN. Para o presente trabalho, foram selecionados os 72 PPTe encontrados nesta amostra da coorte de Ribeirão Preto (SP) e randomizados os casos de parto a termo (Controle). Por fim, foi obtido um valor amostral de 258 partos a termo (Controle) e 72 PPTe.

Na coorte de São Luís (MA), 1447 gestantes foram triadas e atenderam aos critérios de elegibilidade, dentre estas, 1366 foram acompanhadas e deram seguimento na coorte após nascimento do RN. Neste trabalho, foram selecionados os 49 casos de PPTe e randomizado os casos de parto a termo obtendo um número de 182 partos a termo (Controle).

Desta forma, considerando os dois centros participantes, foram incluídas, ao todo, 668 gestantes para este estudo. Dentre essas, 636 tinham amostras disponíveis e suficientes para realizar o diagnóstico de infecção de *Chlamydia trachomatis*. No entanto, considerando que foram incluídas para análise apenas os casos de PPTe para constituir o grupo Caso, foi obtido um valor amostral de 561 mulheres. O percentual de PPTe na amostra foi de 21,6%. O Fluxograma de Inclusão (Figura 1) mostra com mais detalhes as gestantes dos grupos Caso e Controle.

No momento da inclusão, a idade gestacional das mulheres foi entre 20 e 25 semanas. A presença de *Chlamydia trachomatis* foi encontrada em 6,6% das gestantes que tiveram desfecho de PPTe e em 5,9% daquelas com parto a termo, como mostra a Tabela 1, com ausência de diferença significativa entre os grupos de acordo com teste de Chi-quadrado (p=0,7743). O cálculo do Odds Ratio, como demonstrado na Tabela 2, também mostra a ausência da associação entre o diagnóstico positivo para a infecção e o desfecho gestacional (OR 1,127; IC 95%: 0,497 – 2,558).

De acordo com as características sóciodemográficas das 561 gestantes incluídas, divididas em dois grupos de acordo com o desfecho gestacional de Parto Pré-Termo espontâneo (PPTe) ou Parto a termo (Controle), as participantes tinham, em média, 26 anos de idade em ambos os grupos. Quando categorizadas em relação a idade, cerca de metade delas tinham idade superior a 26 anos nos dois grupos,

como apresentado na Tabela 1. Além disso, como também mostra a Tabela 1, uma parcela de quase 70% se autodeclarou como negra ou parda, sem diferença estatística entre os grupos (p=0,9147). Quanto aos dados de escolaridade, também foi encontrado um percentual próximo a 70% nos grupos de PPTe e Controle de mulheres com ensino médio completo (p=0,9798). O estado civil (p=0,1374) e o número de parceiros sexuais ao longo da vida (p=0,4500) não diferiram entre as gestantes dos grupos analisados (Tabela 1).

Para o hábito tabagista durante a gestação, foi encontrado um percentual significativamente maior de gestantes tabagistas no grupo de PPTe em relação ao grupo Controle (15,7% vs 6,8%; p=0,0022). As variáveis associadas ao histórico clínico das gestantes, como hipertensão e diabetes, não mostraram associação com o desfecho de prematuridade, como evidenciado na Tabela 1. Da mesma forma, o histórico de gestações (p=0,4621), paridade (p=0,7866) e histórico de abortos (p=0,5955) também não foram diferentes entre as gestantes dos dois grupos. O histórico obstétrico de PPT em gestação anterior, por sua vez, se mostrou um fator importante visto que 66,7% das gestantes do grupo de PPTe tinham histórico de PPT em gestação anterior, comparado com 9,9% do grupo Controle (p<0,0001).

Após cálculo de Odds Ratio ajustado para as variáveis de tabagismo e histórico de PPT, foi observado relação apenas entre o histórico de PPT em gestação anterior com o desfecho de PPTe (aOR 17,442; IC 95% 8,773 – 34,677) (Tabela 3). O histórico obstétrico, desta forma, se mostrou fator de risco para desfecho gestacional de prematuridade.

Quando considerando o status de infecção por *C. trachomatis*, foi observado percentual significativamente maior de gestantes com idade inferior a 19 anos apresentando diagnóstico positivo para CT (p=0,0032), como mostra a Tabela 4. O cálculo de Odds Ratio bruto da Tabela 5 mostra, ainda, que idade inferior a 19 anos não só tem associação com a presença da infecção mas também pode ser considerado um fator de risco para a mesma (OR 4,046; IC 95% 1,734 – 9,436).

Quanto aos mediadores inflamatórios, suas medianas e valores de máximo e mínimo estão expressos na Tabela 6. No caso da MMP-2, seu nível foi encontrado significativamente aumentado nas gestantes do grupo Controle (p=0,0184). O contrário aconteceu para a MMP-9, cujos níveis estavam superiores nas gestantes do

grupo com PPTe (p<0,0001). Não foi encontrado diferença entre os grupos quanto aos níveis de TGF-α, IFN-γ, IL-10, IL-13, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α e TNF-β e seus valores também se encontram representados nos gráficos da Figura 2.

A árvore de inferência condicional, apresentada na Figura 3, mostra que gestantes sem histórico de PPT em gestações anteriores e que apresentaram níveis séricos de MMP-9 superiores a 114,31 pg/mL tiveram maior propensão ao desfecho de PPT na gestação atual comparado àquelas com níveis iguais ou inferiores a 114,31 pg/mL. Ao retirar a variável de PPT anterior do modelo de árvore de inferência condicional, nota-se que somente quando os níveis de MMP-9 estavam maiores que 112,8 pg/mL que ela foi preditora para PPTe (Figura 4).

Para a determinação do melhor ponto de corte para predizer PPTe na amostra do presente estudo foi realizada curva ROC. Desta forma, foi encontrada uma área sob a curva de 0,6706, como mostrado na Figura 5. Com os valores de sensibilidade de 0,85345 e especificidade de 0,41972 foi observado um ponto de corte de 43,557 pg/mL o qual evidencia o desfecho de PPTe.

Discussão

Dentre os principais achados deste trabalho, destacamos primeiramente a ausência de associação entre infecção por *Chlamydia trachomatis* e Parto Pré-Termo espontâneo. O percentual de mulheres com esta infecção no grupo que teve desfecho de PPTe foi próximo ao das mulheres no grupo Controle (6,6% vs. 5,9%, respectivamente). Também encontramos forte associação entre histórico obstétrico e PPTe, visto que mulheres com PPT em gestação anterior apresentavam cerca de 17 vezes mais chances de um novo PPT em relação às mulheres sem histórico de PPT prévio. Por fim, destacamos ainda o moderado valor preditivo da MMP-9 sob o desfecho de PPTe, sugerindo que gestantes com níveis de MMP-9 acima de 43,557 pg/mL estão em maior risco de ter um PPTe, com uma sensibilidade e especificidade aproximadas de 85% e 42%, respectivamente.

A composição e variação da microbiota vaginal no período gestacional se tornou um importante alvo de investigação visto a possibilidade de associar-se com desfechos obstétricos desfavoráveis como PPT, Ruptura Prematura de Membranas

Pré-Termo (RPMPT), baixo peso ao nascer e natimortalidade (HYMAN et al., 2014; LIU et al., 2013; NADEAU; SUBRAMANIAM; ANDREWS, 2015). Desta forma, a presença de bactérias patogênicas, como a *Chlamydia trachomatis*, teriam o potencial de gerar uma resposta inflamatória capaz de induzir um Parto Pré-Termo de forma espontânea, uma vez que o sistema imune materno fica suprimido durante a gestação para permitir e promover o desenvolvimento fetal (NADEAU; SUBRAMANIAM; ANDREWS, 2015; SISTI; KANNINEN; WITKIN, 2015).

Todavia, segundo a revisão sistemática de Ammerdorffer et al. (2017), o papel da CT durante a gestação ainda é contraditório, principalmente devido a multiplicidade de resultados na literatura. No caso do presente estudo, não foi encontrado relação entre infecção por CT e PPTe (p=0,7743), o que corrobora com trabalhos previamente citados (JOHNSON et al., 2011; REEKIE et al., 2018).

Em contrapartida, a revisão sistemática de Adachi et al. (2016) sustenta a relação de causalidade entre CT e PPTe devido ao maior número de estudos que evidenciaram o aumento do risco de PPTe e baixo peso ao nascer nos casos de infecção por CT. Ainda, em recente metanálise conduzida por Olson-Chen et al. (2018), a infecção por CT na gestação esteve associada com PPT (OR 1,27; IC 95% 1,05 – 1,54). Estes resultados nos levam a acreditar na importância do rastreio e tratamento dos casos de CT em gestantes. No entanto, um estudo clínico randomizado controlado com placebo mostrou que o tratamento profilático para CT durante a gestação não se mostrou eficaz na prevenção de PPT (BROEK et al., 2009).

Nossos dados também contrastam com resultados de outros estudos brasileiros, como o “Nascer no Brasil” de Leal et al. (2016), que encontrou associação entre PPTe e presença de infecção no momento do parto (aOR 4,89; IC 95% 1,72 – 13,88). Porém, Leal et al. (2016) incluem como infecção os casos de infecção urinária, corioamnionite e pneumonia, sem especificar e diferenciar o tipo de infecção encontrada, enquanto nosso estudo analisou apenas a CT. Destacamos ainda que os estudos apresentam desenhos diferentes, uma vez que nosso trabalho é um caso-controle aninhado e o “Nascer no Brasil” é uma coorte de amostra populacional. Ainda, nosso diagnóstico de infecção por CT foi realizado no segundo trimestre gestacional e não no momento do parto como em Leal et al. (2016).

Em outros estudos brasileiros, como o de Schmidt et al. (2015), em Vitória, ES foi encontrado CT em amostras de urina de 13,9% dos casos de PPT. Em Pelotas, RS, Da Silveira et al.(2017) obtiveram 12,3% de gestantes entre 15 e 29 anos com diagnóstico positivo para CT em amostras de conteúdo vaginal, sem associação com desfechos obstétricos adversos. Em Coari, AM, De Azevedo et al. (2019) encontraram a maior taxa de CT no Brasil, com um percentual de 18% de CT nas gestantes analisadas. Nenhum deles, no entanto, analisou a associação da CT com o desfecho de prematuridade. Por isso, podemos afirmar que este é o estudo brasileiro mais recente que avalia a relação entre infecção por *Chlamydia trachomatis* e PPTe.

Em nossos achados, as gestantes com idade igual ou inferior a 19 anos apresentaram maior risco de ter um diagnóstico positivo de CT (OR 4,046; IC 95% 1,734 – 9,436). De forma semelhante, Schmidt et al. (2015) também encontraram a infecção mais presente em mulheres jovens, principalmente abaixo de 24 anos (OR 2,0; IC 95% 1,1 – 3,8). Os estudos de Da Silveira et al.(2017) e De Azevedo et al. (2019), da mesma forma, evidenciaram maior prevalência de CT entre as gestantes mais jovens, o que corrobora com nossos achados.

A frequência de CT em gestantes jovens pode ser explicada pelo maior grau de ectopia cervical proporcionada pelo nível elevado de estrogênio que é comum na faixa etária entre 15 e 25 anos e intensificado no período gestacional. A exposição do epitélio endocervical glandular, que é pronunciada durante a gestação, torna o ambiente vaginal mais favorável para a replicação da CT, que infecta preferencialmente células glandulares (GARCÊS et al., 2013; HONKILA et al., 2017).

O histórico de PPT em gestação anterior esteve associado ao desfecho de PPTe (aOR 17,442; IC 95% 8,773 – 34,677), permitindo constatar que o histórico obstétrico pode ser um importante fator de risco para a prematuridade e, por isso, não deve deixar de ser considerado nos cuidados pré-natais às gestantes. Os dados de 2011 – 2012 do estudo “Nascer no Brasil” também mostraram relação entre PPT prévio e PPTe na gestação atual (OR 3,74; IC 95% 2,92 – 4,79). O histórico obstétrico, entretanto, é um dos fatores de risco mais conhecidos para o desfecho de prematuridade. Na prática clínica, segundo o Ministério da Saúde, gestantes que tiveram PPT em gestação anterior são classificadas como tendo gestação de alto risco (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

A revisão sistemática de KAZEMIER et al. (2014) mostrou que o risco de PPTe recorrente é influenciado pela ordem de gestações de feto único e gemelar. Assim, mulheres com gestação gemelar com PPT em gestação anterior de feto único tiveram risco absoluto de 57% (IC 95% 51,9 – 61,9%) de um novo PPT. E, mulheres com gestação de feto único com histórico de PPT em gestação prévia de feto único tiveram risco de 20% (IC 95% 19,9 – 20,6%) de um novo desfecho de PPT. Ainda, de acordo com metanálise e revisão sistemática de PHILLIPS et al. (2017), o risco absoluto de mulheres que tiveram PPTe em gestação anterior ter um PPTe recorrente é de 30% (IC 95% 27 – 34%).

Acredita-se que mulheres que já passaram por um PPT tendem a ficar mais ansiosas e amedrontadas na gestação seguinte e, como consequência, este estresse psicossocial poderia influenciar no desfecho de um novo PPT (LOOMANS et al., 2013; SHAPIRO et al., 2013). Entretanto, apesar de esta ser uma das hipóteses do Projeto BRISA, nosso estudo não tinha o objetivo de avaliar as variáveis relacionadas a estresse. Desta forma, nossos resultados somam evidências para a literatura acerca da relação de risco entre o histórico obstétrico e o desencadeamento de um PPTe.

Os mediadores inflamatórios nas amostras de plasma das gestantes incluídas foram escolhidos de acordo sua importância no processo de trabalho de parto e infecção no trato genital inferior feminino (NADEAU; SUBRAMANIAM; ANDREWS, 2015; SISTI; KANNINEN; WITKIN, 2015). A gestação é um período conhecido pela “tolerância imunológica”, em que há uma supressão do sistema imune da mulher a fim de evitar uma perda gestacional mas sem comprometer a proteção contra infecções patogênicas. Assim, os hormônios produzidos neste período, como progesterona e estradiol, promovem a produção de citocinas anti inflamatórias, como a IL-4, pelos tecidos maternos e fetais. Estas citocinas criam um ambiente com perfil de células da resposta Th2, que prevalece até o final da gestação (GOMEZ-LOPEZ et al., 2014; SYKES et al., 2012).

Dentre as citocinas produzidas e relacionadas às células T tipo 2 CD4+ estão: IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 e IL-6, sendo as IL-6 e IL-10 também produzidas por células da resposta Th1. Os mediadores da resposta Th2 são responsáveis pela defesa humoral do organismo além de inibirem a ativação da resposta imune celular do tipo Th1, a qual está relacionada à defesa mediada por células fagocíticas contra patógenos

intracelulares. As principais citocinas produzidas pelas células T tipo 1 CD4+ são: IFN-γ, IL-2, e TNF-α (SYKES et al., 2012).

Considerando o perfil de resposta Th2 durante a gestação, supõe-se que gestantes estejam mais vulneráveis a infecções causadas por patógenos intracelulares. Isto se dá porque o processo fisiológico do trabalho de parto é semelhante à resposta contra patógeno. Portanto, uma infecção durante o período gestacional ativaria uma resposta celular do tipo Th1 para eliminar o microrganismo invasor e isso, consequentemente, desencadearia um trabalho de parto (SYKES et al., 2012).

Tendo isso em vista, esperávamos encontrar níveis aumentados de TNF-α, IL-1β, IL-8, IFN-γ e níveis diminuídos de IL-4, IL-13, IL-10, IL-6 e TGF-β no plasma das gestantes que tiveram desfecho de PPTe. Contudo, todos os mediadores, com exceção das MMP-2 e MMP-9, apresentaram valores de mediana baixos e com amplo intervalo entre os valores máximos e mínimos. As gestantes incluídas também não diferiram quanto aos níveis dessas citocinas, independentemente do desfecho gestacional. Isto pode sugerir a ausência de associação entre os níveis desses mediadores e o PPTe ou ainda uma possível degradação de todas as proteínas no período em que as amostras permaneceram armazenadas antes do processamento, visto que sua dosagem não foi realizada imediatamente após a coleta.

De forma semelhante, MANNING et al. (2019) dosaram as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e outras em gestantes de alto risco entre 22 e 24 semanas. Apesar de utilizarem amostras de conteúdo cervicovaginal, seus resultados também mostraram baixos níveis desses mediadores independente do histórico obstétrico e do desfecho gestacional. Esses dados, além de mostrarem concordância com nossos resultados, nos faz questionar se as amostras de conteúdo cervicovaginal, no caso do trabalho de MANNING et al. (2019), e de plasma, no caso do nosso estudo, foram coletadas antes que o organismo da mulher manifestasse qualquer sinal de resposta imunológica aumentada. Isso mostra, ainda, que tanto a nível local quanto a nível sistêmico, no período aproximado de 20 semanas gestacionais, os mediadores imunológicos estão em consonância, comprovando que a utilização de amostras de plasma para avaliação da resposta imune em gestantes é válida e pode refletir a resposta que acontece a nível local.

O grupo de PEREIRA et al. (2016) analisaram os níveis séricos de IL-10 e TGF-β em um grupo de gestantes de São Luís, MA provenientes do estudo BRISA, assim como parte das gestantes incluídas neste estudo. Contrapondo aos nossos achados, os níveis de IL-10 (p=0,003) e TGF-β (p<0,001) das mulheres de parto a termo foram maiores em comparação aos casos de PPT. O grupo também mostrou que baixos índices de IL-10 (OR 2,92; IC 95% 1,38 – 6,16) e de TGF-β (OR 16,9; IC 95% 6,42 – 44,51) estiveram associados ao PPT.

Ainda sobre o estudo de PEREIRA et al. (2016), é importante ressaltar que, diferentemente do presente estudo, eles incluíram apenas as gestantes de São Luís e não excluíram os casos de PPT iatrogênicos do grupo de prematuridade, o que pode ter interferido nos resultados e justifica parcialmente a diferença com nosso trabalho. Apesar dessa discrepância nos resultados das citocinas, destacamos que eles também encontraram relação entre o histórico de PPT em gestação anterior com o desfecho de prematuridade assim como também não encontraram associação entre Vaginose Bacteriana e PPT. Ambos os resultados confirmam nossos dados.

Para melhor compreender o mecanismo de interação entre a comunidade bacteriana presente no trato genital inferior e resposta imune no desencadeamento de um PPTe, ELOVITZ et al. (2019) investigaram a microbiota cervicovaginal e os níveis locais de β-defensina-2 (HBD-2) ao longo da gestação. O grupo constatou que os níveis de HBD-2 têm maior influência sob o desfecho gestacional do que a composição da microbiota, contribuindo com as evidências que refutam a hipótese de associação entre infecção e PPT. Além disso, neste estudo foi evidenciado que os maiores índices de PPT entre mulheres de etnia negra não podem ser atribuídos exclusivamente a composição de suas microbiotas não-lactobacilares. Nossos resultados também não mostraram associação entre etnia e desfecho gestacional.

Quanto às metaloproteinases de matriz (MMPs) 2 e 9, que também dosamos nas amostras de plasma das gestantes, tratam-se de enzimas proteolíticas da classe das gelatinases responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular. Durante a gestação, elas são importantes no processo de remodelamento dos tecidos vascular e uterino e na placenta, favorecendo a implantação do feto. Por isso, alterações nos níveis das MMP-2 e -9 podem contribuir para a patogênese de um trabalho de parto pré-termo e pré-eclampsia (CHEN; KHALIL, 2017).

A MMP-2 é constitutivamente expressa e produzida durante a gestação, enquanto a MMP-9 tem sua produção estimulada principalmente em ambiente pró-inflamatório ou durante o processo fisiológico ou patológico do trabalho de parto. No entanto, ambas têm sua produção e atividade aumentadas no trabalho de parto. O controle da produção dessas MMPs se faz por ação mecânica, com a extensão das fibras do miométrio, e por ação hormonal, com participação do estrógeno, progesterona e ocitocina, os quais são os principais hormônios envolvidos no curso gestacional. Até o momento, não encontramos estudos que tenham dosado MMP-2 e -9 no plasma de gestantes no período de 20-25 semanas, porém sabe-se que o aumento da expressão das MMPs na região do útero é paralelo a expressão e atividade das MMPs no espaço vascular (CHEN; KHALIL, 2017).

Em YONEMOTO et al. (2006), foi encontrado nível aumentado de MMP-2 na membrana amniótica de gestantes em trabalho de parto a termo comparadas com gestantes em trabalho de parto pré-termo. Apesar de o nosso estudo não ter dosado MMP-2 em membrana, também encontramos seus níveis aumentados nas amostras de plasma de gestantes com parto a termo. Em estudo anterior de MAYMON et al. (2000), a MMP-2 no líquido amniótico se encontrou diminuída ou inalterada nos casos de RPMPT ou RPM a termo, trabalho de parto pré-termo ou a termo e de invasão microbiana da cavidade amniótica. A MMP-9, por outro lado, esteve significativamente aumentada em todos estes casos. Os mesmos padrões de MMP-2 diminuída e MMP-9 aumentada nos casos de prematuridade foram observados em nosso trabalho.

Os níveis aumentados da MMP-2 no plasma das gestantes do grupo Controle sugerem a importância desta gelatinase durante o segundo trimestre gestacional para um desfecho a termo. Acreditamos que os níveis aumentados da MMP-2 sejam mantidos pela progesterona, hormônio relacionado com a manutenção da gestação. No entanto, os níveis diminuídos da MMP-2 nas gestantes de PPT precisam ser mais profundamente investigados.

O grupo de PARK et al. (2018) realizou a dosagem de MMP-9 no plasma de gestantes, assim como em nosso estudo. Contudo, não encontraram relação entre esta enzima e PPT iminente (parto dentro das 48 horas após admissão). Ainda neste trabalho, apesar de a MMP-9 não estar associada ao desfecho de prematuridade, foi encontrada uma correlação significativa entre ela e o comprimento cervical ($r= -0,269$; $p<0,001$), o qual não foi incluído nas análises no nosso estudo embora seja um

importante fator de risco para PPT. A MMP-2, por sua vez, não tem associação com o comprimento cervical, assim como a MMP-8, de acordo com estudo de WITKIN et al. (2019).

TENCY (2014) realizou a dosagem de MMP-3 e -9, além de seus inibidores teciduais (TIMP-1 a -4) e de vários marcadores inflamatórios, em gestantes e encontrou níveis séricos de MMP-9 significativamente superiores nas gestantes com trabalho de parto pré-termo e PPT comparado às gestantes de parto a termo ($p<0,001$) em análise ajustada. Estes resultados corroboram com nossos achados, no entanto ressaltamos que o momento na gestação em que a MMP-9 foi dosada em ambos os trabalhos foi diferente. Ademais, considerando que o nível sistêmico de MMP-9 se evidencia cerca de 24 horas antes do trabalho de parto ou ruptura prematura de membrana (TENCY, 2014), nossos resultados sugerem que os níveis aumentados de MMP-9 no meio do trimestre gestacional das gestantes com PPTe devem ser atribuídos a algum fator não mensurado ou outra infecção não investigada neste trabalho, uma vez que a CT não teve associação com o PPTe e, portanto, não poderia estar causando os níveis aumentados de MMP-9.

Quanto aos outros marcadores inflamatórios analisados por TENCY (2014), muitos dos quais também foram quantificados em nosso estudo como IL-1α, IL-1β, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, TNF-α, não tiveram níveis detectáveis em mais de 50% de suas amostras. A não-detecção dos mediadores inflamatórios em TENCY (2014) e MANNING et al. (2019) podem ser um indicativo de que os baixos níveis de TGF-α, IFN-γ, IL-10, IL-13, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α, TNF-β encontrados em nosso trabalho não sejam atribuídos a sua degradação durante o armazenamento das amostras. Porém, não é possível saber o que de fato aconteceu.

Em outro estudo cuja finalidade também era a procura de biomarcadores inflamatórios para o PPT, LEE et al. (2016) encontraram níveis aumentados de MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-9, IL-6, IL-8, MIP-1α e MIP-1β no líquido amniótico de gestantes de alto risco com PPT anterior a 34 semanas. SUNDRANI et al. (2017) notaram maior expressão gênica de MMP-2 e MMP-9 na placenta de gestantes em trabalho de parto e PPT em relação às de trabalho de parto a termo. Além disso, foi evidenciado que o grau de metilação (silenciamento) do gene promotor da MMP-9 é significativamente menor nas placentas de PPT.

Os resultados acerca da avaliação da resposta inflamatória de mulheres com desfecho de prematuridade são bastante variáveis. Desta forma, existe uma inconsistência na literatura acerca dos mediadores imunológicos envolvidos na resposta de trabalho de parto e qual o melhor tipo de material para realizar sua dosagem (líquido amniótico, conteúdo cervicovaginal, placenta, soro ou plasma). Os níveis diminuídos e quase indetectáveis de TGF-α, IFN-γ, IL-10, IL-13, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α e TNF-β provavelmente não estão refletindo a realidade e isso pode ser comprovado não só pelos resultados dos trabalhos anteriormente citados mas também pelos níveis das MMP-2 e 9, visto que estas enzimas podem sofrer influência desses mediadores.

A resposta imunológica de cada hospedeira é muito particular e pode sofrer influência de fatores genéticos e ambientais. Assim, considerando também que o parto, seja ele a termo ou pré-termo, é o resultado de uma resposta inflamatória de causa multifatorial, não se pode excluir a influência genética para predizer a prematuridade.

Segundo STRAUSS et al. (2018), fatores genéticos maternos e fetais combinados podem aumentar até mais de 30% o risco de PPT. Como exemplo, o grupo cita que já foi comprovado que variantes maternas do gene codificante do receptor de complemento 1 (CR1) estiveram associadas à condição patofisiológica de PPT. Da mesma forma, polimorfismos no gene do *Toll like receptor* 10 (TLR-10), o qual tem o papel de regular negativamente a resposta inflamatória, têm sido associados ao desfecho de PPT. Existem vários tipos de mutações e regulações epigenéticas em genes que regulam o sistema imune inato ou que codificam proteínas antimicrobianas importantes que já mostraram relação com o aumento no risco de RPMPT (MODI et al., 2017).

Além do fator genético, com o aumento do interesse e das descobertas acerca do papel e influência da microbiota vaginal na saúde reprodutiva, alguns pesquisadores acreditam que a composição da comunidade bacteriana na vagina pode alterar a suscetibilidade da gestante a um PPT. Em revisão sistemática, CHU et al. (2018) afirma que a microbiota vaginal de gestantes sofre menos alterações ao longo do tempo comparado a mulheres não gestantes (RAVEL et al., 2011) e é predominada por bactérias do gênero *Lactobacillus* spp, o qual está associado a um melhor prognóstico gestacional com destaque para a espécie *Lactobacillus crispatus*.

A carga e a diversidade bacteriana nas gestantes também é menor. Apesar desses conhecimentos, a literatura ainda não foi capaz de atribuir relação de causalidade entre alguma espécie de microrganismo e desfechos gestacionais adversos visto que os estudos são controversos.

A composição do microbioma vaginal também difere entre as mulheres de acordo com sua etnia. Por isso, como negras e hispânicas apresentam naturalmente maior variedade de bactérias, incluindo bactérias anaeróbicas e patogênicas no ambiente vaginal (RAVEL et al., 2011), a afro descendência tende a estar associada a desfechos gestacionais adversos mesmo que, como destaca a revisão de Chu et al. (2018), não possa ser considerada um fator de risco independente. Apesar de nosso estudo não ter caracterizado a microbiota vaginal das mulheres incluídas, pudemos constatar que a presença da *Chlamydia trachomatis* na região vaginal não influenciou o desfecho gestacional, assim como a etnia negra.

Quanto ao hábito tabagista, encontramos maior percentual de fumantes entre as gestantes com PPTe em relação ao grupo Controle, no entanto isto não foi um fator de risco para prematuridade em nosso estudo (aOR 1,836; IC 95% 0,661 – 5,101). Apesar disso, tabagismo, assim como outras condições materno-fetais, estão entre os fatores de risco clássicos para prematuridade, de acordo com o estudo “Nascer no Brasil” (LEAL et al., 2016).

Os dados do estudo de Moore et al. (2016) mostram que parar de fumar no final da gestação (depois do segundo trimestre) aumentou em 70% o odds ratio de nascimento antes de 37 semanas (aOR 1,70; IC 95% 1,6 – 1,80), sendo 65% de aumento no odds de PPTe. Desta forma, em contraposição aos nossos achados, Moore et al. (2016) expõe uma relação entre tabagismo no curso gestacional e PPTe e PPT iatrogênico, a qual é confirmada nos trabalhos de Soneji e Beltrán-Sánchez (2019) e de Daskalakis et al. (2019).

Por fim, ressaltamos os pontos fortes de nosso trabalho como a inclusão de gestantes de duas localidades diferentes, permitindo um maior tamanho amostral além de maior variabilidade entre as gestantes incluídas. Para a identificação de *C. trachomatis* na amostra, utilizamos a metodologia mais sensível que havia disponível, a PCR, com base em biologia molecular. Ainda, destacamos a exclusão dos casos de

PPT que ocorreram por indicação médica (iatrogênicos), o que diminui possíveis fatores confundidores sob o desencadeamento do PPT.

Apesar disso, podemos pontuar algumas importantes limitações, como a significativa diminuição do valor amostral devido à perda de amostras no transporte para Ribeirão Preto ou por inconsistência em sua identificação além da presença de amostras com material insuficiente para a dosagem dos mediadores imunológicos ou para o diagnóstico de infecção por CT. Também consideramos a existência de possíveis outros fatores que estejam influenciando o desfecho gestacional mas que não analisamos neste estudo como, por exemplo, a presença de infecções por outros agentes patogênicos. Como nosso objeto de estudo era a presença da CT e prematuridade, não incluímos em nossa análise as variáveis relacionadas aos RNs prematuros ou de mães infectadas por CT, por isso não avaliamos as consequências da infecção por CT para o RN. Embora existam algumas limitações, o delineamento do estudo foi adequado para responder nossa hipótese primária.

No Brasil, a rotina pré-natal do sistema público de saúde não inclui teste para rastreio de CT, uma vez que, como mostramos aqui, não há um consenso na literatura sobre a relação desta bactéria com desfechos gestacionais adversos. Por isso, um estudo com delineamento e tamanho amostral adequados como este se fazem importantes para contribuir com evidências que garantam um pré natal de qualidade às gestantes.

Desta forma, nossos resultados sugerem que o rastreio para infecção de CT no período pré-natal não é essencial para avaliar o risco de PPTe. No entanto, como trata-se de uma infecção assintomática, comprovadamente mais frequente em mulheres jovens e com possibilidade de TV, seria interessante a triagem de CT em gestantes de até 20 anos, que constituem população de risco para esta infecção. Entretanto, a inexistência de testes diagnósticos rápidos e de baixo custo para a identificação da *Chlamydia trachomatis* no trato genital de mulheres dificulta e impossibilita que seu rastreio seja financiado pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

Portanto, reforçamos a importância de um pré-natal adequado, principalmente para esta população jovem com maior risco de infecção, para minimizar e numa tentativa de controlar as consequências geradas por uma infecção como a infecção por *Chlamydia trachomatis* durante o período gestacional.

Conclusão

Não houve associação entre infecção por *Chlamydia trachomatis* no segundo trimestre gestacional e Parto Pré-Termo espontâneo na amostra de gestantes provenientes do projeto BRISA. Apesar disso, como encontramos relação entre *C. trachomatis* e idade materna, talvez ainda não seja seguro descartar o rastreio de CT para esta população de risco, principalmente por se tratar de uma infecção frequentemente assintomática. Também destacamos a importância de mais estudos acerca das MMP-2 e -9 para melhor entender seu envolvimento e sua importância na gestação e parto. Por fim, apenas o histórico de PPT em gestação anterior se mostrou fator de risco para o desfecho de um PPTe, o que está de acordo com a literatura atual e com a prática clínica.

Sugestões para trabalhos futuros

As limitações de nosso estudo e nossa revisão de literatura nos mostrou que ainda existe uma grande variabilidade entre os estudos que investigam o envolvimento da *Chlamydia trachomatis* ao longo da gestação. Por conta disso, na prática clínica ainda não existe um consenso sobre o rastreio desta bactéria em gestantes. No entanto, acreditamos que a resposta para este problema não está em pesquisar um patógeno específico como causador de desfechos obstétricos adversos. Logo, o investimento em mais estudos que procurem relacionar a CT com prematuridade não faz sentido.

Atualmente já se sabe que o espaço intra-útero não é estéril e que a microbiota do trato genital feminino têm fundamental importância na saúde da mulher, principalmente no período gestacional. Desta forma, acreditamos que o ideal seria realizar um estudo longitudinal que acompanhasse mulheres desde o período prévio à gestação até o momento do parto para investigar as alterações na microbiota vaginal e uterina e seu papel na regulação de mediadores imunológicos que pudessem influenciar o curso e o desfecho gestacional. A utilização de métodos de biologia molecular, como NGS (Next-Generation Sequencing) e Proteômica, para análise do microbioma e dos mediadores imunológicos seria ideal também. Apesar de ser uma

sugestão que requer tempo e recurso, acreditamos que seria a melhor forma de esclarecer a relação entre infecção e PPT ou outros desfechos adversos.

Bibliografia

ADACHI, K.; NIELSEN-SAINES, K.; KLAUSNER, J. D. Chlamydia trachomatis Infection in Pregnancy : The Global Challenge of Preventing Adverse Pregnancy and Infant Outcomes in Sub-Saharan Africa and Asia. **Biomed Research International**, v. 2016, 2016.

AMMERDORFFER, ANNE STOJANOV, M.; GREUB, G.; BAUD, D. Chlamydia trachomatis and chlamydia-like bacteria : new enemies of human pregnancies. **Current Opinion in Infectious Disease**, v. 30, n. 3, p. 289–296, 2017.

AULT, K. A. et al. Antibodies to the Chlamydial 60 Kilodalton Heat Shock Protein in Women With Tubal Factor Infertility. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 167, p. 163–167, 1998.

BAKKEN, I. J. Chlamydia trachomatis and ectopic pregnancy : recent epidemiological findings. **Sexually transmitted diseases and urinary tract infections**, 2008.

BAUD, D.; GREUB, G. Intracellular bacteria and adverse pregnancy outcomes. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 9, p. 1312–1322, 2011.

BERGHELLA, V.; BAXTER, J. K.; HENDRIX, N. W. Europe PMC Funders Group Cervical assessment by ultrasound for preventing preterm delivery. n. January 2012, 2014.

BLENCOWE, H. et al. Born Too Soon : The global epidemiology of 15 million preterm births. **Reproductive Health**, v. 10, n. Suppl 1, p. 1–14, 2013.

BORBOREMA-ALFAIA, A. P. B. DE et al. Chlamydia trachomatis infection in a sample of northern Brazilian pregnant women : prevalence and prenatal importance. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 545–550, 2013.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos Não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Saúde Brasil 2015/2016 : uma análise da situação de saúde e da epidemia pelo vírus Zika e por outras doenças transmitidas pelo Aedes aegypti [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos Não Transmissíveis e Promoção da Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 386 p. : il.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Gestação de alto risco: manual técnico / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. – 5. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2012. 302 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

BROEK, N. R. VAN DEN et al. The APPLe Study : A Randomized , Community-Based , Placebo-Controlled Trial of Azithromycin for the Prevention of Preterm Birth , with Meta-Analysis. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 12, p. 1–8, 2009.

CHAWANPAIBOON, S. et al. Articles Global , regional , and national estimates of levels of preterm birth in 2014 : a systematic review and modelling analysis. p. 37–46, 2019.

CHEN, J.; KHALIL, R. A. Matrix Metalloproteinases in Normal Pregnancy and Preeclampsia. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 148, p. 1–71, 2017.

CHILDREN'S FUND, U. N. **UN Inter-Agency Group for Child Mortality Estimation. Levels and trends in child mortality: Report 2017**. [s.l: s.n.].

CHU, D. M. et al. The microbiome in preterm birth. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 52, p. 103–113, 2018.

COSTA, M. C. et al. Doenças sexualmente transmissíveis na gestação : uma síntese de particularidades. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 6, p. 767–785, 2010.

DA SILVEIRA, M. F. et al. Chlamydia trachomatis infection in young pregnant women in Southern Brazil : a cross-sectional study Infecção por Chlamydia trachomatis em gestantes jovens no Sul do Brasil : um estudo transversal Infección por Chlamydia trachomatis en gestantes jóvenes e. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 1, p. 1–9, 2017.

DARVILLE, T. Chlamydia trachomatis Infections in Neonates and Young Children. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 16, p. 235–244, 2005.

DASKALAKIS, G. et al. Prevention of spontaneous preterm birth. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, p. 1–13, 2019.

DE AZEVEDO, M. J. et al. High prevalence of Chlamydia trachomatis in pregnant women attended at Primary Health Care services in Amazon, Brazil. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, v. 61, p. 1–8, 2019.

ELOVITZ, M. A. et al. Cervicovaginal microbiota and local immune response modulate the risk of spontaneous preterm delivery. **Nature Communications**, p. 1–8, 2019.

GARCÊS, A. X. et al. Prevalência de Chlamydia trachomatis e fatores de risco associados à infecção detectada em amostra endocervical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 35, n. 8, p. 379–383, 2013.

GOLDENBERG, R. L. et al. Stillbirths 6 Stillbirths : the vision for 2020. **The Lancet**, v. 377, p. 1798–1805, 2011.

GOLDENBERG, R. L.; HAUTH, J. C.; ANDREWS, W. W. Intrauterine infection and preterm delivery. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 20, p. 1500–1507, 2000.

GOMEZ-LOPEZ, N. et al. Immune cells in term and preterm labor. **Cellular and molecular Immunology**, v. 11, n. 6, p. 571–581, 2014.

GÓMEZ, L. M. et al. Evidence of a gene-environment interaction that predisposes to spontaneous preterm birth : a role for asymptomatic bacterial vaginosis and DNA variants in genes that control the inflammatory response. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 202, n. 4, p. 386.e1-386.e6, 2010.

HAMMERSCHLAG, M. R. Chlamydial and Gonococcal Infections in Infants and

Children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 3, p. 99–102, 2011.

HAQUE, M. M. et al. First-trimester vaginal microbiome diversity : A potential indicator of preterm delivery risk. **Scientific Reports**, n. June, p. 1–10, 2017.

HONKILA, M. et al. Probability of vertical transmission of Chlamydia trachomatis estimated from national registry data. **Sexually transmitted infections**, v. 0, p. 1–5, 2017.

HOWSON, C.; KINNEY, M.; LAWN, J. **Born Too Soon**. [s.l: s.n.].

HYMAN, R. W. et al. Diversity of the Vaginal Microbiome Correlates With Preterm Birth. v. 21, n. 1, p. 32–40, 2014.

JALIL, E. M. et al. Prevalência da infecção por clamídia e gonococo em gestantes de seis cidades brasileiras. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 12, p. 614–619, dez. 2008.

JOHNSON, H. L. et al. Sexually Transmitted Infections and Adverse Pregnancy Outcomes Among Women Attending Inner City Public Sexually Transmitted Diseases Clinics. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 38, n. 3, p. 167–171, 2011.

KAZEMIER, B. M. et al. Impact of obstetric history on the risk of spontaneous preterm birth in singleton and multiple pregnancies : a systematic review. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 121, p. 1197–1208, 2014.

LEAL, C. et al. Prevalence and risk factors related to preterm birth in Brazil. **Reproductive Health**, v. 13, n. Suppl 3, 2016.

LEE, S. M. et al. Prediction of spontaneous preterm birth in women with cervical insuf fi ciency : Comprehensive analysis of multiple proteins in amniotic fl uid. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, p. 1–8, 2016.

LIU, B. et al. Chlamydia and gonorrhoea infections and the risk of adverse obstetric outcomes : a retrospective cohort study. **Sexually transmitted infections**, v. 89, n. 8, p. 1–7, 2013.

LOOMANS, E. M. et al. Psychosocial Stress During Pregnancy Is Related to Adverse Birth Outcomes: Results From a Large Multi-Ethnic Community-Based Birth Cohort. **European Journal of Public Health**, v. 23, n. 3, p. 485–491, 2013.

MANIA-PRAMANIK, J. et al. Current Chlamydia trachomatis infection, a major cause of infertility. **Journal of Reproductive Infertility**, v. 13, n. 4, p. 204–210, 2012.

MANNING, R. et al. Predictive value of cervical cytokine , antimicrobial and microflora levels for pre-term birth in high-risk women. **Scientific Reports**, p. 1–11, 2019.

MARDH, P.-A. Influence of infection with Chlamydia trachomatis on pregnancy outcome , infant health and life-long sequelae in infected o € spring. **Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 16, n. 6, p. 847–864, 2002.

MARQUES, C. A. S. et al. Infecção genital por Chlamydia trachomatis em casais atendidos em ambulatório de esterilidade conjugal. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 19, n. 1, p. 5–10, 2007.

MAYMON, E. et al. Evidence of in vivo differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases 9 and 2 in parturition , spontaneous rupture of membranes

, and intra-amniotic infection. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 183, p. 887–894, 2000.

MODI, B. P. et al. Mutations in fetal genes involved in innate immunity and host defense against microbes increase risk of preterm premature rupture of membranes (PPROM). **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 5, n. 6, p. 720–729, 2017.

MOORE, E. et al. Relationship of trimester-specific smoking patterns and risk of preterm birth. **The American Journal of Obstetrics & Gynecology**, p. 3–8, 2016.

NADEAU, H. C. G.; SUBRAMANIAM, A.; ANDREWS, W. W. Infection and preterm birth. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 1, p. 8–13, 2015.

OLSON-CHEN, C.; BALARAM, K.; HACKNEY, D. N. Chlamydia trachomatis and Adverse Pregnancy Outcomes : Meta- analysis of Patients With and Without Infection. **Maternal and Child Health Journal**, v. 22, n. 6, p. 812–821, 2018.

PARK, H. et al. Plasma inflammatory and immune proteins as predictors of intra-amniotic infection and spontaneous preterm delivery in women with preterm labor : a retrospective study. **BMC Pregnancy and Childbirth**, p. 1–9, 2018.

PEREIRA, T. B. DE B. et al. Regulatory Cytokine Expression and Preterm Birth : Case-Control Study Nested in a Cohort. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–12, 2016.

PHILLIPS, C. et al. Risk of recurrent spontaneous preterm birth : a systematic review and meta- analysis. **BMJ Open**, v. 7, n. 6, p. 1–6, 2017.

PINTO, V. M. et al. Chlamydia trachomatis Prevalence and Risk Behaviors in Parturient Women Aged 15 to 24 in Brazil METHODOLOGY. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 38, n. 10, p. 957–961, 2011.

PRICE, M. J. et al. Risk of Pelvic Inflammatory Disease Following Chlamydia trachomatis Infection : Analysis of Prospective Studies With a Multistate Model. **American journal of epidemiology**, v. 178, n. 1, p. 484–492, 2013.

RAVEL, J. et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2011.

REEKIE, J. et al. Chlamydia trachomatis and the risk of spontaneous preterm birth , babies who are born small for gestational age , and stillbirth : a population-based cohort study. **Lancet Infection Disease**, v. 3099, n. 18, p. 1–9, 2018.

REY-LADINO, J.; ROSS, A. G. P.; CRIPPS, A. W. Immunity, immunopathology, and human vaccine development against sexually transmitted Chlamydia trachomatis. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 10, n. 9, p. 2664–2673, 2014.

SCHMIDT, R. et al. Maternal Chlamydia trachomatis Infections and Preterm Births in a University Hospital in. **PLoS ONE**, p. 4–11, 2015.

SHAPIRO, G. D. et al. Psychosocial stress in pregnancy and preterm birth : associations and mechanisms. **Journal of Perinatal medicine**, v. 41, n. 6, p. 631–645, 2013.

SILVA, MARIA JOSÉ PENNA MAISONNETTE DE ATTAYDE; FLORÊNCIO, GILZANDRA LIRA DANTAS; GABIATTI, JOSÉ ROBERTO ERBOLATO; DO AMARAL, ROSE LUCE; ELEUTÉRIO JÚNIOR, JOSÉ; GONÇALVES, A. K. DA S. Perinatal morbidity and mortality associated with chlamydial infection : a meta-analysis

study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 533–539, 2011.

SISTI, G.; KANNINEN, T. T.; WITKIN, S. S. Maternal immunity and pregnancy outcome : focus on preconception and autophagy. **Nature Publishing Group**, n. November, p. 1–7, 2015.

SONEJI, S.; BELTRÁN-SÁNCHEZ, H. Association of Maternal Cigarette Smoking and Smoking Cessation With Preterm Birth. **JAMA Network Open**, v. 2, n. 4, p. 1–14, 2019.

STEPHENS, A. J.; AUBUCHON, M.; SCHUST, D. J. Antichlamydial Antibodies , Human Fertility , and Pregnancy Wastage. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

STRAUSS, J. F. et al. Spontaneous preterm birth : advances toward the discovery of genetic predisposition. **The American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 218, n. 3, p. 294–314, 2018.

SUNDRANI, D. et al. Investigating the Expression of MMPs and TIMPs in Preterm Placenta and Role of CpG Methylation in Regulating MMP-9 Expression. **IUBMB Life**, v. 69, n. 12, p. 985–993, 2017.

SYKES, L. et al. The Th1 : Th2 Dichotomy of Pregnancy and Preterm Labour. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, p. 1–12, 2012.

TENCY, I. **Inflammatory response in maternal serum during preterm labour**. [s.l: s.n.].

TONG, V. T. et al. Trends in Smoking Before, During, and After Pregnancy --- Pregnancy Risk Assessment Monitoring System (PRAMS), United States, 31 Sites, 2000--2005. **Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, D.C. : 2002**, v. 58, n. 4, p. 1–29, 2002.

VASILEVSKY, S.; GREUB, G.; NARDELLI-HAEFLIGER, D. Genital Chlamydia trachomatis : Understanding the Roles of Innate and Adaptive Immunity in Vaccine Research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 346–370, 2014.

WITKIN, S. S. et al. Individual immunity and susceptibility to female genital tract infection. p. 252–256, 2000.

WITKIN, S. S. et al. Chlamydia trachomatis: the Persistent Pathogen. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 24, n. 10, p. 1–9, 2017.

WITKIN, S. S. et al. Vaginal Biomarkers That Predict Cervical Length and Dominant Bacteria in the Vaginal Microbiomes of Pregnant. **mBio**, v. 10, n. 5, p. 1–13, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. **Acta Obstetricia et Gynecologica**, v. 56, p. 247–253, 1977.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008. **Who**, p. 1–28, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Preterm Birth**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>.

YONEMOTO, H. et al. Changes in Matrix Metalloproteinase (MMP) -2 and MMP-9 in the Fetal Amnion and Chorion During Gestation and at Term and Preterm Labor. **Placenta**, v. 27, n. 6–7, p. 669–677, 2006.

ANEXOS

Tabela 1. Características sociodemográficas, comportamentais e histórico médico das gestantes (n=561) de acordo com o desfecho gestacional. BRISA, 2010 – 2011

Variáveis	PPTe (n=121)	Controle (n=440)	p*
Presença de *C. trachomatis*			
CT +	8 (6,6%)	26 (5,9%)	0,7743
CT -	113 (93,4%)	414 (94,1%	
Idade	26,1 (6,3)	25,9 (5,7)	
≤ 19	20 (16,5%)	52 (11,8%)	0,2209
20 - 25	40 (33,1%)	177 (40,2%)	
≥ 26	61 (50,4%)	211 (47,9%)	
Etnia			
Branca	39 (32,2%)	149 (34,2%)	
Negra/Parda	81 (66,9%)	284 (65,1%)	0,9147
Oriental	1 (0,8%)	3 (0,7%)	
IMC gestacional			
Baixo peso	24 (20%)	66 (15,2%)	
Adequado	53 (44,2%)	176 (40,5%)	0,2794
Sobrepeso	29 (24,2%)	116 (26,7%)	
Obesidade	14 (11,7%)	76 (17,5%)	
Escolaridade			
9 anos	26 (21,5%)	91 (20,8%)	0,9798
9-12 anos	82 (67,8%)	301 (68,7%)	
>12 anos	13 (10,7%)	46 (10,5%)	
Estado civil			
Casada/União estável	92 (76%)	361 (82,1%)	0,1374
Solteira/Divorciada	29 (24%)	79 (17,9%)	
Parceiros sexuais			
1-4	93 (76,8%)	352 (80%)	0,4500
≥ 5	28 (23,1%)	88 (20%)	
Tabagismo			
Sim	19 (15,7%)	30 (6,8%)	0,0022
Não	102 (84,3%)	410 (93,2%)	
Hipertensão crônica			
Sim	3 (2,5%)	15 (3,4%)	0,6047
Não	118 (97,5%)	424 (96,6%)	
Hipertensão gestacional			
Sim	17 (14,1%)	40 (9,1%)	0,1136
Não	104 (85,9%)	398 (90,9%)	
Diabetes			
Sim	1 (0,8%)	3 (0,7%)	0,8670
Não	120 (99,2%)	437 (99,3%)	
Diabetes gestacional			
Sim	6 (5%)	22 (5%)	0,9853
Não	115 (95%)	418 (95%)	

Gestações			
Primigesta	49 (40,5%)	187 (42,5%)	0,4621
Secundigesta	28 (23,1%)	118 (26,8%)	
3 ou mais gestações	44 (36,4%)	135 (30,7%)	
Paridade			
Nulípara	55 (45,4%)	213 (48,4%)	
Primípara	39 (32,3%)	140 (31,8%)	0,7866
2 ou mais partos	27 (22,3%)	87 (19,7%)	
Histórico de aborto			
Sim	30 (24,8%)	99 (22,5%)	0,5955
Não	91 (75,2%)	341 (77,5%)	
Idade do PPT			
<28 semanas	5 (4,1%)		
28-32 semanas	9 (7,4%)		
32-37 semanas	107 (88,5%)		
PPT anterior			
Sim	42 (66,7%)	22 (9,9%)	<0,0001
Não	21 (33,3%)	199 (90,1%)	

***Teste de Chi quadrado**

Tabela 2. Valores de Odds Ratio bruto de acordo com desfecho gestacional (n=561). BRISA, 2010 – 2011

	OR*	IC 95% LI	IC 95% LS
Infecção por *C. trachomatis*			
CT +	1,127	0,497	2,558
CT -	Ref	-	-
Idade			
≤ 19	1,331	0,738	2,398
20 - 25	0,782	0,500	1,221
≥ 26	Ref	-	-
Etnia			
Branca	0,785	0,079	7,757
Negra/Parda	0,856	0,088	8,337
Oriental	Ref	-	-
IMC gestacional			
Baixo peso	1,974	0,945	4,125
Adequado	1,635	0,856	3,124
Sobrepeso	1,357	0,674	2,734
Obesidade	Ref	-	-
Escolaridade			
9 anos	1,011	0,476	2,150
9-12 anos	0,964	0,497	1,869
>12 anos	Ref	-	-
Estado civil			
Casada/União estável	0,694	0,428	1,125
Solteira/Divorciada	Ref	-	-
Parceiros sexuais			
1-4	0,830	0,512	1,346
≥ 5	Ref	-	-
Tabagismo			
Sim	2,546	1,377	4,705
Não	Ref	-	-
Gestações			
Primigesta	0,804	0,506	1,278
Secondigesta	0,728	0,427	1,242
3 ou mais gestações	Ref	-	-
Paridade			
Nulípara	0,832	0,493	1,405
Primípara	0,898	0,513	1,570
2 ou mais partos	Ref	-	-
Abortos			
Sim	1,136	0,710	1,816
Não	Ref	-	-
Hipertensão crônica			
Sim	0,719	0,205	2,524
Não	Ref	-	-
Hipertensão gestacional			
Sim	1,626	0,886	2,985

	Não	Ref	-	-
Diabetes				
	Sim	1,214	0,125	11,775
	Não	Ref	-	-
Diabetes gestacional				
	Sim	0,991	0,393	2,502
	Não	Ref	-	-
PPT anterior				
	Sim	18,091	9,126	35,864
	Não	Ref	-	-

***Modelo de Regressão Logística**

Tabela 3. Valores de Odds Ratio ajustada para as variáveis de Tabagismo e PPT anterior (n=561). BRISA, 2010 – 2011

		aOR*	IC 95%	
			LI	LS
Tabagismo				
	Sim	1,836	0,661	5,101
	Não	Ref	-	-
PPT anterior				
	Sim	17,442	8,773	34,677
	Não	Ref	-	-

***Modelo de Regressão Logística**

Tabela 4. Distribuição das gestantes em relação a presença da infecção por CT em cada categoria de idade (n=636). BRISA, 2010 – 2011

	CT +	**CT -**	**p***
Idade			
≤ 19	11 (14,7%)	64 (85,3%)	0,0032
20 - 25	17 (7%)	225 (93%)	
≥ 26	13 (4,1%)	306 (95,9%)	

***Teste de Chi-Quadrado**

Tabela 5. Valores de Odds Ratio bruto para a variável de idade de acordo com o desfecho de presença de infecção por C. trachomatis (n=636). BRISA, 2010 – 2011

		IC 95%	
	OR	**LI**	**LS**
Idade			
≤ 19	4,046	1,734	9,436
20 - 25	1,778	0,847	3,736
≥ 26	Ref	-	-

***Modelo de Regressão Logística**

Tabela 6. Níveis dos mediadores inflamatórios no plasma das gestantes (n=561). BRISA, 2010 – 2011

	PPTe	Controle	p*
MMP-2**	228,84 (40,3 – 536,05)	250,7 (8,78 – 495,83)	0,0184
MMP-9	73,51 (5,69 – 211,93)	50,43 (0,86 – 302)	<0,0001
TGF-α	16,2 (1,72 – 179,87)	13,88 (0,17 – 233,27)	0,1862
IFN-γ	22,99 (1,35 – 405,26)	22,41 (0,77 – 1519)	0,4736
IL-10	6,74 (0,26 – 76,45)	7,08 (0,10 – 846,41)	0,9195
IL-13	7,26 (0,03 – 125,82)	7,23 (0,05 – 274,42)	0,8224
IL-1α	19,77 (0,6 – 352,74)	30,94 (0,26 – 883,88)	0,1993
IL-1β	3,45 (0,32 – 30,26)	3,62 (0,12 – 191,95)	0,6148
IL-2	4,18 (0,31 – 209,32)	4,09 (0,17 – 299,25)	0,3404
IL-4	8,15 (0,05 – 317,62)	11,56 (0,05 – 711,74)	0,7460
IL-6	6,47 (0,03 – 142,65)	8,23 (0,01 – 727,33)	0,9227
IL-8	21,86 (1,75 – 628,99)	24,23 (0,32 – 501,59)	0,6500
TNF-α	11,71 (1,44 – 68,6)	10,68 (0,97 – 251,64)	0,8266
TNF-β	10,3 (0,42 – 177,94)	13,04 (0,08 – 1040)	0,1284

***Teste não-paramétrico de Wilcoxon para amostras independentes**
Valores apresentados em medianas, mínimos e máximos
Unidade de Medida: pg/mL
**** Unidade de Medida: ng/mL**

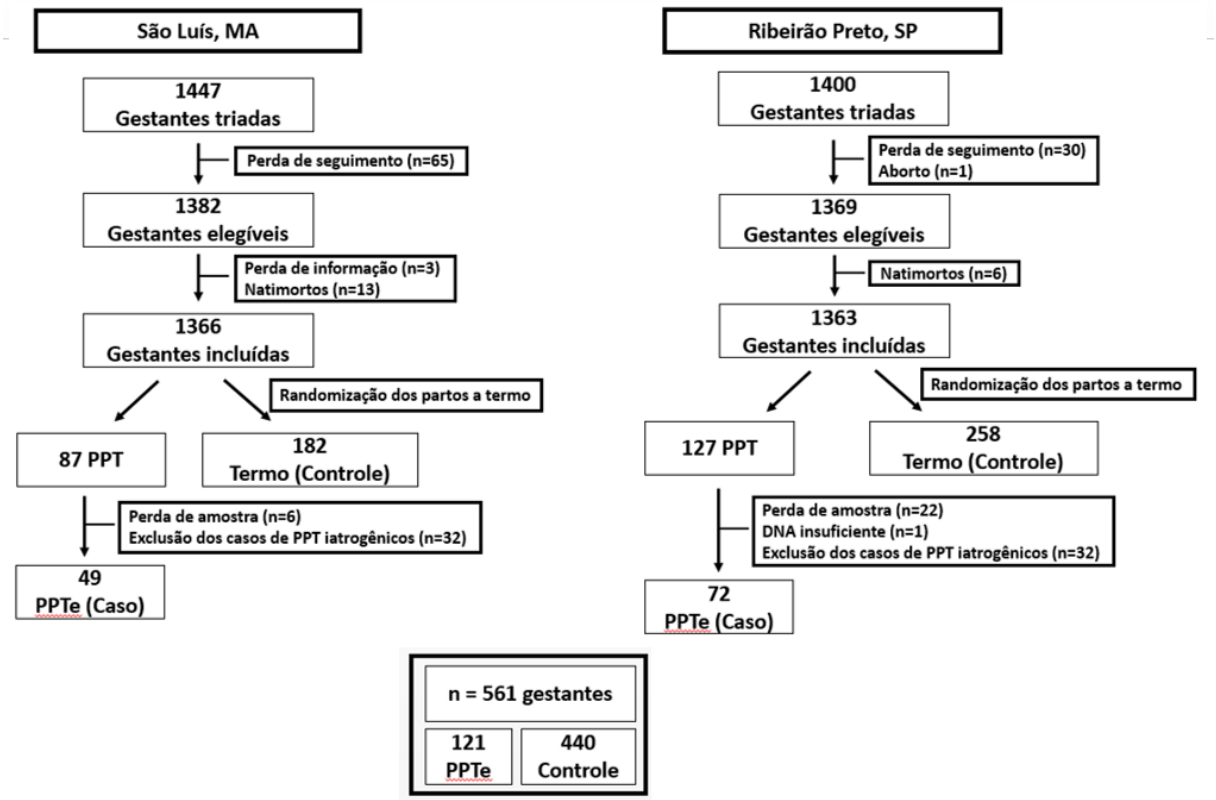
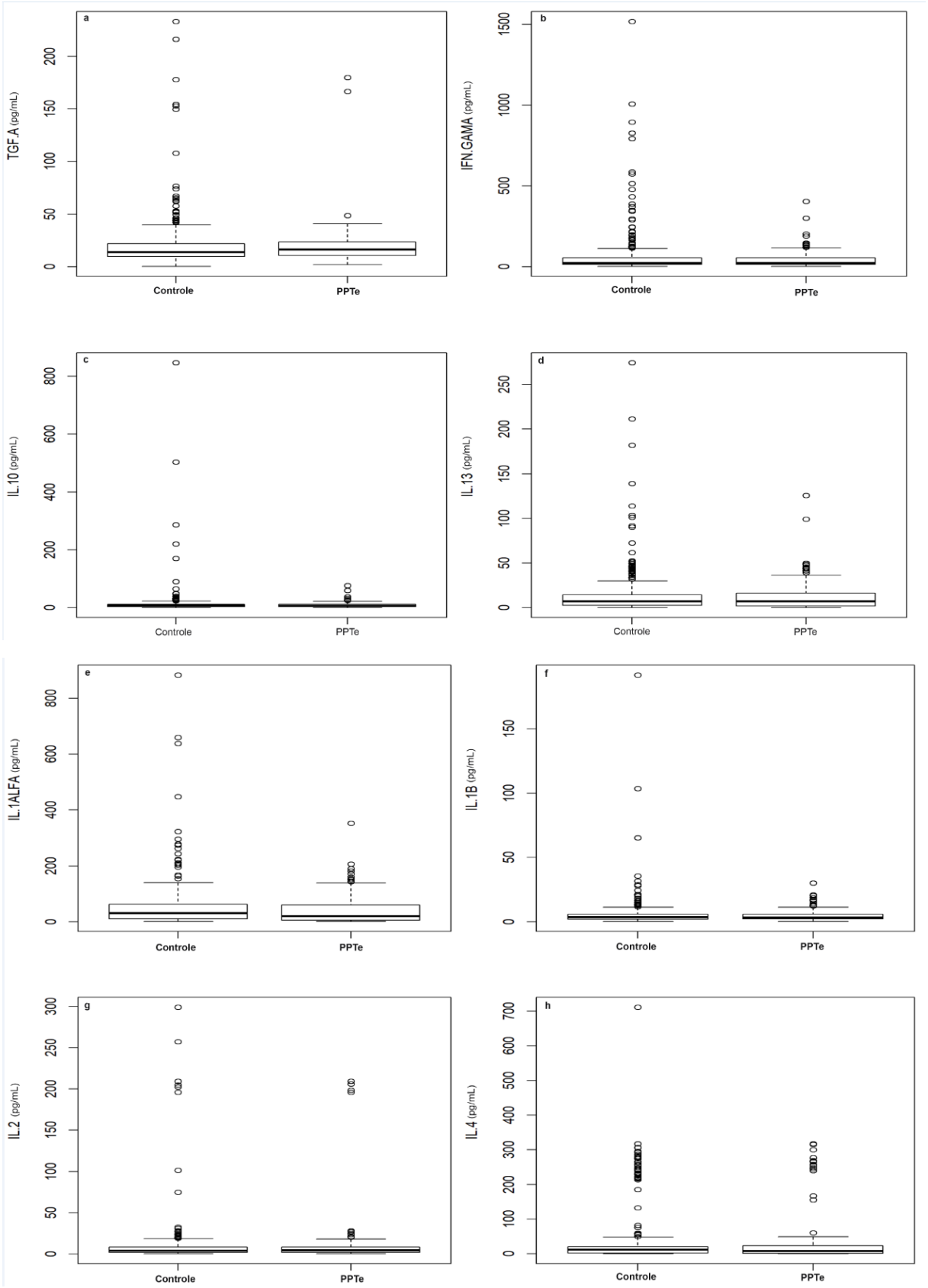


Figura 1. Fluxograma para triagem e inclusão das gestantes no Projeto BRISA e recorte da amostra para análise no presente estudo


a
TGF.A (pg/mL)
0
50
100
150
200
Controle
PPTe
b
IFN.GAMA (pg/mL)
0
500
1000
1500
Controle
PPTe
c
IL.10 (pg/mL)
0
200
400
600
800
Controle
PPTe
d
IL.13 (pg/mL)
0
50
100
150
200
250
Controle
PPTe
e
IL.1ALFA (pg/mL)
0
200
400
600
800
Controle
PPTe
f
IL.1B (pg/mL)
0
50
100
150
Controle
PPTe
g
IL.2 (pg/mL)
0
50
100
150
200
250
300
Controle
PPTe
h
IL.4 (pg/mL)
0
100
200
300
400
500
600
700
Controle
PPTe

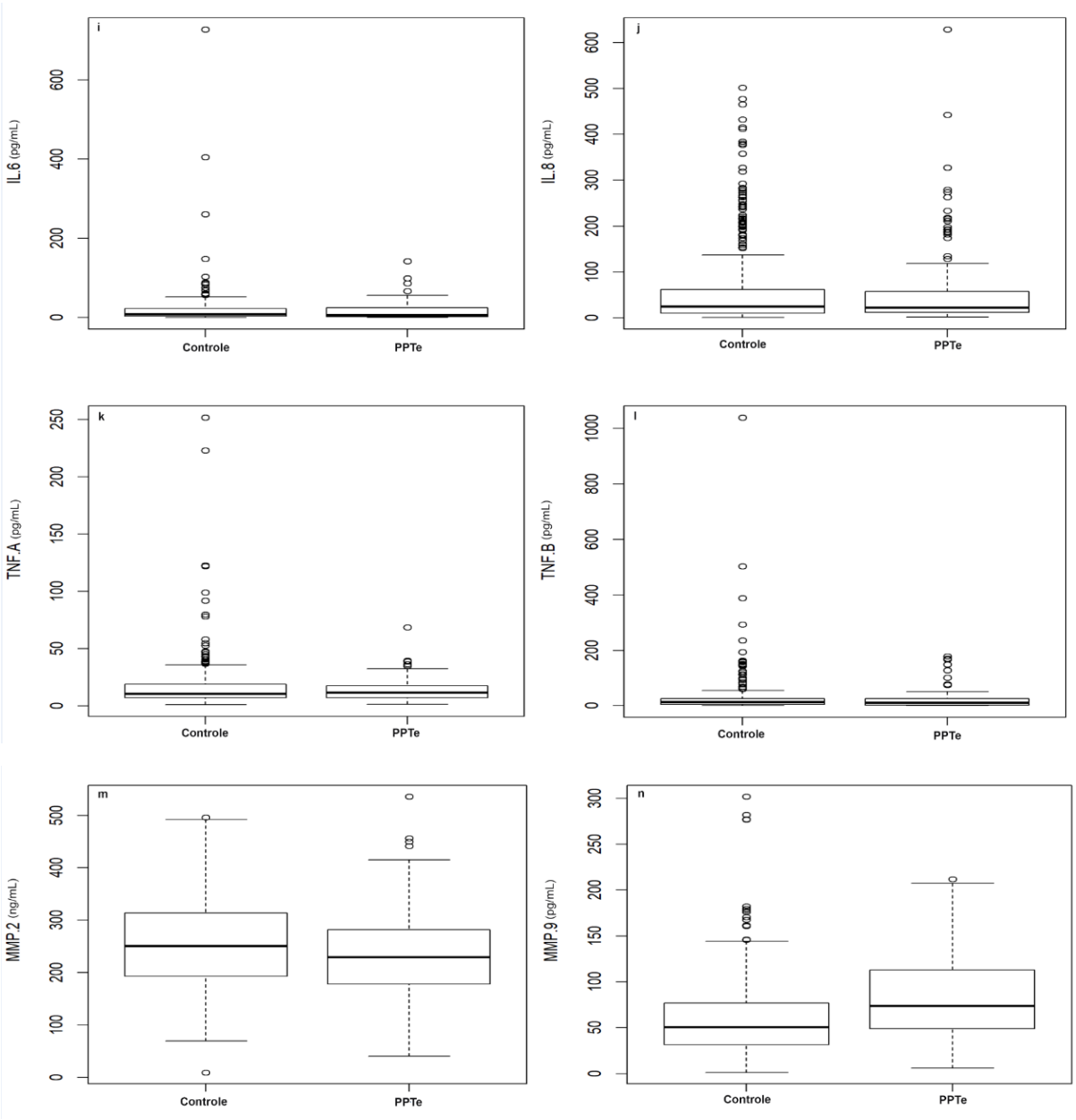


Figura 2. Gráficos box-plot dos níveis de TGF-α (a), IFN-γ (b), IL-10 (c), IL-13 (d), IL-1α (e), IL-1β (f), IL-2 (g), IL-4 (h), IL-6 (i), IL-8 (j), TNF-α (k), TNF-β (l), MMP-2 (m) e MMP-9(n) no plasma das gestantes (n=561). BRISA, 2010 – 2011.

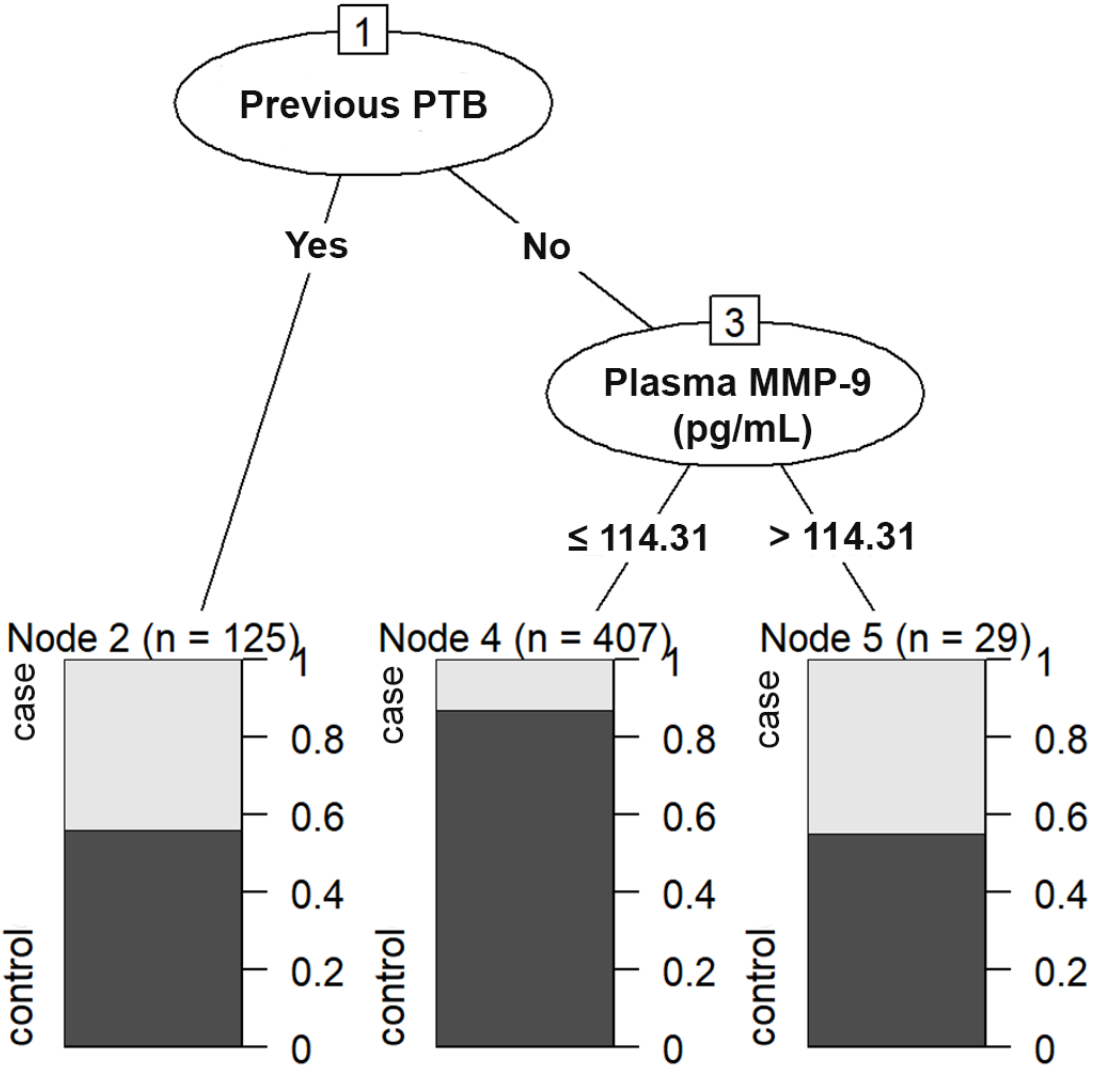


Figura 3. Árvore de inferência condicional com as variáveis: PPT em gestação anterior (Previous PTB) e níveis de MMP-9 no plasma. BRISA, 2010 – 2011

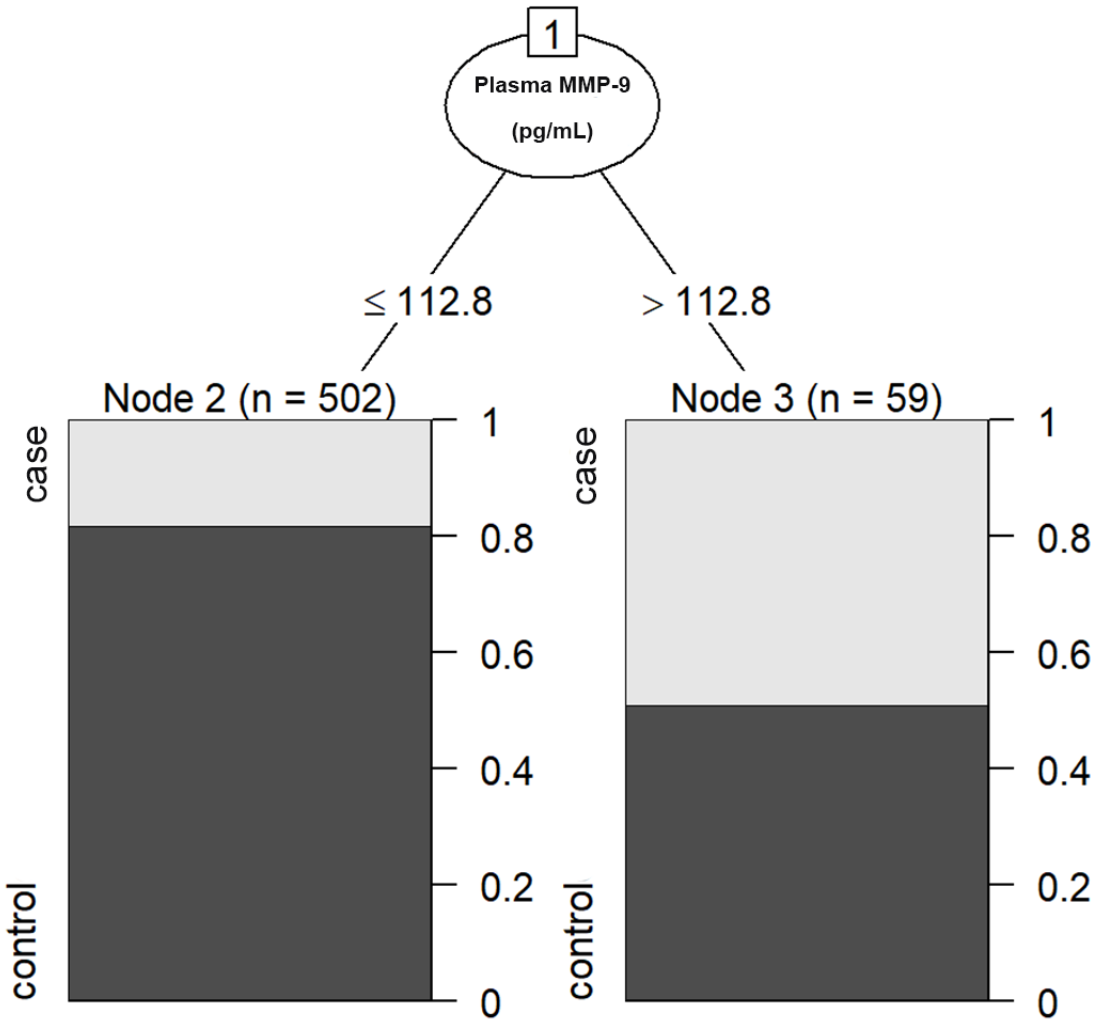


Figura 4. Árvore de inferência condicional considerando apenas os níveis de MMP-9. BRISA, 2010 – 2011

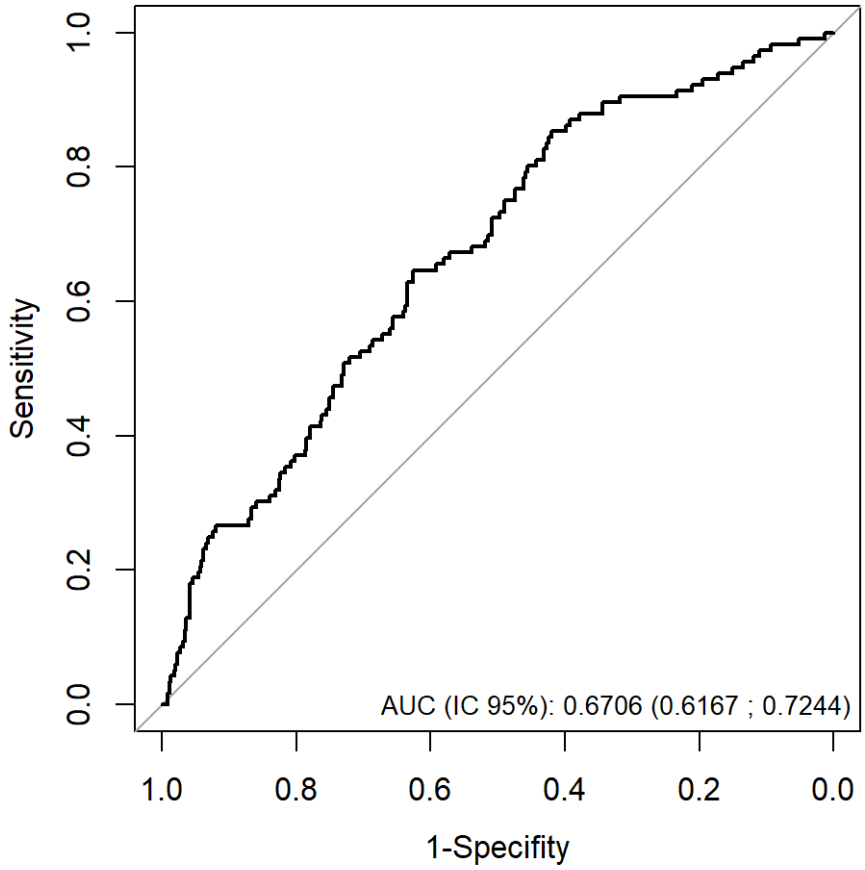


Figura 5. Curva ROC e área sob a curva para mensurar o valor preditivo da MMP-9 no desencadeamento do PPTe. BRISA, 2010 – 2011

APÊNDICE

APÊNDICE A: Manuscrito – Artigo Original submetido à Sexually Transmitted Diseases (ISSN 0148-5717)

Original Article – Manuscript

Chlamydia trachomatis lower genital tract infection in pregnant women from a study nested in the BRISA cohort

Larissa Brito Bastos MSc[1], Giulia Karnauchovas Porto Cunha MSc[1], Stella Felippe de Freitas MSc[1], Ricardo de Carvalho Cavalli PhD[1], Silvana Maria Quintana PhD[1]

[1] Department of Gynecology and Obstetrics of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo – São Paulo, Brazil

Corresponding author: Silvana Maria Quintana, MD

Department of Gynecology and Obstetrics, Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo (FMRP – USP), SP 14049-900, Brazil.

Phone: +55(16) 3602-2583 – Fax: 3602-2415

E-mail: quintana@fmrp.usp.br

Summary: 28 words **Abstract:** 247 words **Text:** 3252 words

References: 38 **Figures:** 5 **Tables:** 5

Conflict of Interest and Source of Funding: The authors declare no conflict of interest for the research reported. The BRISA cohort, which this study is nested, had the financial support of *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP), *Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Técnológico do Maranhão* (FAPEMA), *Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP – USP* (FAEPA), *Programa Nacional de Centros de Excelência* (PRONEX), *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e*

Tecnológico (CNPq) and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES).

Summary

A study nested in the BRISA cohort that found no significant association between mid-trimester *Chlamydia trachomatis* infection and spontaneous preterm birth in pregnant from two different Brazilian cities.

Abstract

Background: Bacterial infections have been responsible for up to 50% of preterm birth (PTB) cases, which is associated with a high degree of maternal and neonatal morbidity. Therefore, we sought to evaluate the association between *Chlamydia trachomatis* (CT) infection and spontaneous PTB (sPTB). **Methods:** This study analyzed part of the pregnant women with 20-25 gestational weeks and 6 days from BRISA prenatal cohort of 2010-2011. Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed for CT's diagnosis in cervicovaginal fluid samples. TGF-α, IFN-γ, IL-10, IL-13, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α, and TNF-β were measured using Multiplex Assay, MMP-2 and -9 were quantified by Immunoenzymatic Assay (ELISA) in plasma samples. **Results:** 561 pregnant were evaluated, 121 of them had sPTB and 440 had term delivery (Control). CT infection was not associated with sPTB (OR 1.127; 95% CI 0.497 – 2.558), but it was more frequent among younger (19 years old or less) pregnant (p=0.0032; OR 4.046; 95% CI 1.734 – 9.436). Previous PTB history was important in triggering sPTB (aOR 17.42; 95% CI 8.773 – 34.677). The immune mediators did not differ between the groups, however, MMP-2 level was increased in the Control group (p=0.0184), whereas MMP-9 was significantly increased in sPTB group (p<0.0001). **Conclusions:** CT infection was not associated with sPTB, however, its correlation with younger pregnant suggests that these patients require more

attention in the clinical management. The immunological profile of pregnant should be further investigated to achieve concrete knowledge about the relationship of any immune mediator and pregnancy outcome.

Key words: Chlamydial infections, Preterm Birth, Spontaneous Preterm Birth, *Chlamydia trachomatis*

Introduction

Preterm Birth (PTB) and its complications are among the leading causes of neonatal death according to “Born Too Soon – The Global Action Report on Preterm Birth” World’s Health Organization report (1). In 2014, the rate of PTB in the world was 10.6% of live births (2). Brazil had 11.2% of PTB in the same year (3).

Despite being a multifactorial syndrome, bacterial infections are associated with 25 – 40% of PTB cases (4). Among the possible bacterial infections of the female lower genital tract, we highlight *Chlamydia trachomatis* (CT). It is a mandatory intra-cellular pathogen that usually presents as an asymptomatic infection and has the potential to trigger a PTB by activating a Th1 inflammatory response (5–8). However, there is no consensus in the literature about this causal association (9–13). Therefore, the Brazilian Public Health System (SUS) has no CT “screening plan” and its prevalence in pregnants reached 9.8% in 2011 (14).

In this scenario, we aimed to evaluate the association between *Chlamydia trachomatis* infection and PTB in a group of mid-trimester pregnant who comprised the study “Etiological factors of preterm birth and consequences of perinatal factors for infant health: birth cohorts from two Brazilian cities” (BRISA – Brazilian Ribeirão Preto and São Luís birth cohort study).

Materials and Methods

This is a case-control study nested in the BRISA cohort of 2010 and 2011. We analyzed part of the pregnant women from Ribeirão Preto, SP – Brazil and São Luís, MA – Brazil that were included in BRISA Projetc. The study had the approval of the Institutional Review Board of Ribeirão Preto Medical School (Process: 11157/2008)

and Federal University of Maranhão (Process: 4771/2008-30). All subjects gave written informed consent to participate.

In the base cohort, pregnant women were recruited during prenatal visits to public or private care units. Only women with gestational age between 20 and 25 weeks, confirmed by obstetric ultrasound, and single fetus were included. As it was a convenience cohort, women with comorbidities like diabetes, pre-eclampsia or short cervix were not excluded.

At the time of inclusion, all women underwent an interview to collect socio-demographic, behavioral and clinical history data. They also underwent a gynecological examination in which 1mL of cervicovaginal lavage (CVL) was collected using 0.9% saline. Also, 20mL of blood was collected by venipuncture and then centrifuged at 3500 rpm for 30 seconds at 4ºC for plasma samples. CVL and plasma samples remained stored in cryotubes in a -80ºC freezer until processing at the Multi-User Laboratory of Ribeirão Preto Medical School (FMRP – USP).

For our study, we selected all the samples from women who had spontaneous PTB (sPTB), which constituted the Case group. We randomized the samples of term delivery women to form the Control group, as shown in Figure 1.

CT diagnosis in CVL was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR) using DNeasy Blood & Tissue (Cat. Number: 69506, QIAGEN®) extraction kit according to the manufacturer's instructions. The integrity of DNA was observed on a 1.5% agarose gel, stained with GelRed® (Biotium). All DNA samples were quantified on NanoDrop® 2000 equipment (Thermo Scientific®), according to the manufacturer's instructions. For CT identification, we used two pairs of plasmid DNA specific primers: CtP1: 5'-TAGTAACTGCCACTTCATCA-3', CtP2: 5´-TTCCCCTTGTAATTCGTTGC-3' and

PL6.1: 5´-AGAGTACATCGGTCAACGA-3', PL6.2: 5'-TCACAGCGGTTGCTCGAAGCA-3', (manufactured by IDT –Integrated DNA Technologies) (15).

PCR reactions were performed in the Veriti thermal cycler (Applied Biosystems) as follows: initial denaturation at 95ºC for 5 minutes; 40 cycles: denaturation at 95ºC for 1 minute, annealing at 54ºC for 1 minute, extension at 72ºC for 1 minute and 30 seconds, followed by final extension at 72ºC for 5 minutes. The fragments generated by 201bp CtP and 130bp PL6 primer pairs were observed on 2.5% agarose gel stained with GelRed® (Biotium), compared to the 100bp DNA Ladder molecular weight marker (Promega, Part. No. G210A), after electrophoresis in 1x TBE buffer, to separate the bands. Samples that presented the two bands for 201bp and 130bp were considered positive.

Also, we have measured some immune mediators on plasma samples. The immunological mediators were chosen according to their role on labor and during the inflammatory response of the Female Genital Tract (FGT). Therefore, we quantified the levels of TGF-α, IFN-γ, IL-10, IL-13, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α, and TNF-β by MILLIPLEX Multiplex® Assay kits using Luminex LX 200® (Cat #:HCYTOMAG-60K – Merck). A standard curve was performed with the following concentrations of a standard solution: 2000, 400, 80, 16, and 3.2 pg/mL. Finally, Luminex LX 200® equipment read the plates with a detection limit of 50 beads per set and the results were calculated in MilliPlex Analyst using the Curve Fit 4-parameter.

Matrix Metalloproteinases (MMP) 2 and 9 (MMP-9) were also measured in plasma samples using Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). MMP-2 was quantified using R&D Systems® (SMP2F0) kit according to manufacturer's instructions but with previous samples dilution in diluent calibrator RD5-32 in proportions of 1:10 or 1:20.

The standard curve was made with the following concentrations of a standard solution: 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, and 0.78 ng/mL, with the diluent calibrator RD5-32 as zero standard (0 ng/mL).

For MMP-9, we used the Invitrogen® kit (Catalog #KHC3061) according to its original protocol. The samples were first diluted in a 1:10 ration using a standard diluent buffer for further dilution in the same buffer in a 1:80 ratio. All sPTB samples were diluted in 1:160. The standard curve was made with the following concentrations of Hu MMP-9: 750, 375, 187.5, 93.8, 46.9, and 23.5 pg/mL, with the standard diluent alone as zero (0 pg/mL).

The reading of MMP-2 and -9 plates was performed in Spectra Max M3 Molecular Devices with a detection limit of 450nm. Their levels were quantified using SoftMax Pro 6.2.1 software with the curve fit 4-parameter.

Our data was evaluated with an initial exploratory analysis using measures of central position and dispersion. We performed Chi-square and Wilcoxon non-parametric test for independent samples using SAS software version 9.4 to investigate which variables were different between Case (sPTB) and Control groups.

Besides, univariate and multivariate Logistic Regression models were constructed, which made it possible to find which variables were associated with prematurity and to quantify this association by measuring the odds ratio (OR) effect size.

A conditional inference tree was built to identify the factors associated with sPTB, using the software R version 3.3.3. The ROC (Receiver Operating Characteristic) curve was calculated, also using R software version 3.3.3, to verify the discriminating power of cytokines under sPTB outcome.

Results

The flowchart represented in Figure 1 shows the inclusion of all pregnant from BRISA Project as well as the samples we selected for our analysis. In this study, we included 561 women from the two participating centers. Among them, 121constituted the Case group and 440 were Control group.

We found no significant difference between sPTB (Case) and Control groups regarding the presence of CT in CVL (Table 1). Table 2 shows the absence of association between pregnancy outcome and a positive diagnosis for CT (CT+) by calculating OR effect size (OR 1.127, 95% CI: 0.497 – 2.558).

Socio-demographic, behavioral and medical history data are also described in Table 1. Among its data, we highlight that the mean age of our participants was 26 years old in both groups. In addition, near 70% of them self-declared as “Black/brown”, with no difference between the groups (p=0.9147). Also, 70% of them had 9-12 years of schooling (p=0.9798). Marital status (p=0.1373) and number of sexual partners (p=0.4500) did not differ between sPTB and Control groups (Table 1).

Regarding smoking, we found a significantly higher percentage of pregnant smokers in the sPTB group compared to the Control group (15.7% vs 6.8%; p = 0.0022), but it was not a risk factor for sPTB, according to the OR presented in Table 2 (OR 2.546, 95% CI 1.377 - 4.705).

According to their clinical history, hypertension and diabetes had no association with sPTB outcome, as well as gestational history (p=0.4621), parity (p=0.7866) and abortions (p=0.5955) (Table 1). However, the history of previous PTB was an important risk factor in triggering an sPTB, as shown in Table 3 (aOR 17.442, 95% CI 8.773 – 34.677).

The levels of TGF-α, IFN-γ, IL-10, IL-13, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-α, and TNF-β did not differ between women with sPTB or term birth (Data not shown). However, MMP-2 was significantly increased in the Control group ($p=0.0184$). On the other hand, MMP-9 had higher levels in the sPTB group ($p<0.0001$), as shown in Figure 2.

The conditional inference tree (Figure 3) shows that pregnant women with no history of previous PTB and MMP-9 levels above 114.31 pg/mL were more likely to have PTB in the current pregnancy. Nevertheless, when we had removed “previous PTB” from the conditional inference tree model, we noted that MMP-9 was a predictor for sPTB only when its levels were above 112.8 pg/mL (Figure 4).

The ROC curve was performed to determine the cutoff value that predicted sPTB in our sample. We found an Area Under the Curve (AUC) of 0.6706 (Figure 5) with a cutoff point of 43.557 pg/mL, 0.855345 of sensitivity and 0.41972 of specificity in predicting sPTB.

When we consider the presence of CT infection as the main outcome, we note a higher percentage of pregnant under 19 years old presenting CT+ ($p=0.0032$), as shown in Table 4. Furthermore, the OR value indicates that age equal or under 19 was a risk factor for CT infection (OR 4.046, 95% CI 1.734 – 9.436), as shown in Table 5.

Discussion

Among our main findings, we highlight the absence of association between CT infection and sPTB. The percentage of women with CT in the sPTB group (6.6%) was close to the Control group (5.9%). We also noted a strong association between previous sPTB and sPTB in the current pregnancy, as women who had PTB in a previous pregnancy were about 17 times more likely to have a new PTB compared to

those without previous PTB (aOR 17.442, 95% CI 8.773 – 34.677). Finally, we highlight the moderate predictive value of MMP-9 under the sPTB outcome, suggesting that pregnant with MMP-9 levels above 43.557 pg/mL are at greater risk of having a new sPTB, with an approximate sensitivity and specificity of 85% and 42%, respectively.

The vaginal microbiota during the gestational period has a different composition from other moments of a women's life. Changes in vaginal microbial composition have become an important research issue due to a possible association with adverse obstetric outcomes like PTB, Preterm Premature Rupture of Membranes (PPROM), low birth weight and stillbirth (4,16,17). Thus, the presence of pathogenic bacteria, like CT, would have the potential to generate an inflammatory response capable of inducing an sPTB, since the maternal immune system is suppressed during pregnancy to allow and promote fetal development (4,18).

However, the role of CT during the gestational period is unclear and there is no consensus in the literature about the effects of CT on gestational outcomes. This inconsistency in the literature is associated with several factors like study design, sample size, population studied, CT's diagnostic methods, the gestational period of pregnancy, and sample source used to investigate CT (11).

In our study, we did not find a link between CT infection and sPTB (p=0.7743), which corroborates with previous studies (12,13). Other Brazilian authors show that the prevalence of CT in pregnant women varies from 12 to 18% (19,20), depending on the city and region. Schmidt et al. found CT in 13.9% among women who had PTB in Vitória, ES – Brazil (21). However, we can state that our study is the most recent Brazilian study that measured the OR effect size of CT infection and sPTB.

Also, we highlight that even though we did not find any association between CT and prematurity, previous studies show that CT can be vertically transmitted (22). Besides, CT may cause a series of comorbidities to the newborn, like Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) (23), low birth weight (12), conjunctivitis, and pneumonia (24).

In contrast with our findings, Liu et al. noted a causative association among women with a prior CT diagnosis and sPTB (aOR 1.17, 95% CI 1.01 – 1.37) (10). Also, in a recent meta-analysis of Olson-Chen et al., CT during pregnancy was associated with PTB (OR 1.27, 95%CI 1.05 – 1.54) (25). Nevertheless, we noticed that the lower limit of the Confidence Interval in these studies is close to 1, which means that it is close to the lack of significance, so this result may be attributed to the sample size. The same situation is observed in the studies analyzed in Adachi et al. systematic Review (26).

The obstetric history of previous PTB was the only factor that remained associated with sPTB even after adjustments (aOR 17.42, 95% CI 8.773 – 34.677). Therefore, it must continue to be considered an important risk factor for PTB. Data from the “Born in Brazil” study confirmed our findings by showing that previous PTB predicted a PTB in current pregnancy (OR 3.74, 95% CI 2.92 – 4.79) in a representative sample of the Brazilian population (27). However, obstetric history is one of the most known risk factors for PTB. In clinical practice, according to the Brazilian Ministry of Health, pregnant with previous PTB are classified as in a high-risk pregnancy (14).

The psychosocial stress caused by a PTB may explain why women who experienced a previous PTB are prone to have another PTB in the subsequent pregnancy (28,29). However, we did not assess psychosocial factors for our study. Thus, our results add evidence to the literature about the risk of obstetric history on triggering an sPTB.

Finally, the immune mediators that we dose in the plasma have an important role during labor and in an infectious process on the FGT. During pregnancy, the type of immune response profile in the FGT is predominantly Th2. It means that Th2 response mediators are the main responsible for local defense. However, considering that Th2 mediators are related to humoral defense, we may infer that pregnant are more vulnerable to intracellular pathogens. Also, in the case of infection, the activation of a Th1 response would lead to the onset of labor (4,30–32).

Considering the cytokines of the Th1 and Th2 response (31), we expected to find increased levels of TNF-α, IL-1β, IL-8, IFN-γ and decreased levels of IL-4, IL-13, IL-10, IL-6, and TGF -β. However, their levels were not different between the groups. Manning et al. found a similar scenario when they measured IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, among others, in the vaginal content of high risk pregnant between 22 and 24 gestational weeks.

In combination with our data, Manning et al. findings may indicate that systemic alterations in immune mediators do not change until 25ª gestational week (33). Therefore, we could not find any expected alteration in these mediators. This may suggest the absence of an association between these mediators and the sPTB. Nonetheless, it is more likely that the samples have degraded in the period they remained stored in the freezer and our data are probably not reflecting the reality.

There is no much data in the current literature about plasma levels of MMP-2 and 9 in mid-trimester pregnancy. Despite the statistical significance of our results, the predictive value of MMP-9 was low and, therefore we cannot state that MMP-9 levels may be an sPTB biomarker, given its low specificity (42%). However, MMP-2 and 9 are a class of proteolytic enzymes called gelatinase and they have an important role during pregnancy and labor (34).

MMP-2 is constitutively expressed during pregnancy and MMP-9 production is stimulated in a pro-inflammatory environment, as during an infection or in the physiological process of labor. Nevertheless, both have their production and activity increased in labor; also, they are controlled by mechanical and hormonal action. So, estrogen, progesterone, and oxytocin are important in their regulation (34).

In this study, we found increased plasmatic MMP-2 in the Control group. It suggests that MMP-2 is probably important during the mid-trimester to ensure a full-term pregnancy. Also, its levels must be mantained by progesterone, which is responsible for a full-term gestation. However, we cannot explain why MMP-2 was lower in the Control group and it needs to be further investigated.

The increased MMP-9 in sPTB group explains why the pregnant in this group had the sPTB outcome. In contrast, MMP-9 systematic levels are evident only about 24 hours before labor or PRM and our results refer to the mid-trimester period (35). Therefore, our results suggest that the increased MMP-9 in women with sPTB cannot be attributed to labor. Also, we cannot assign it to any inflammatory stimuli, since immune mediators were low in both groups and CT (which could trigger an inflammatory response) had no association with sPTB. Then, with our data, we are not capable to justify exactly the cause of higher MMP-9 in sPTB cases.

Yonemoto et al. found an increase in MMP-2 in the amniotic membrane of women with term labor compared with preterm labor (PTL). Although we did not use membrane samples, Yonemoto et al. agree with our results (36). Maymon et al. evaluated MMP-2 and 9 in amniotic fluid and found a similar scenario, with increased MMP-9 and decreased MMP-2 in women with PPROM, PRM, PTL and microbial invasion of the amniotic cavity (37). In sum, there is an inconsistency in the literature about the

immunological mediators involved in labor and in which biological material we should evaluate them (amniotic fluid, CVL, placenta, serum or plasma).

The immune response of the host is very particular and may be influenced by genetic and environmental factors. Thus, considering that term and preterm labor is the result of an inflammatory response with multifactorial causes, we must consider the genetic influence and the local microbiota. According to Strauss et al., maternal and fetal genetic factors combined can increase the risk of PTB by more than 30% (38).

The vaginal microbiota has also significant importance in reproductive health and the composition of the vaginal bacterial community is capable to modulate the susceptibility to a PTB. Despite this knowledge, there is no specific microorganism related to adverse pregnancy outcomes in the literature yet. In our study, we did not characterize the vaginal microbiota, but CT infection was not involved as the causative agent of sPTB cases.

Finally, we highlight the strengths of our study such as the inclusion of women from two different cities, which allowed a larger sample size and greater variability of subjects. Besides, we used molecular biology for CT diagnosis, which is the most sensitive methodology we had available. We highlight the exclusion of medical indicated PTB to reduce possible confounding factors on triggering PTB.

Among our limitations, we consider the existence of other factors that may also have influenced the pregnancy outcome but which we did not include in our analysis, like the presence of other infections and the vaginal microbiota composition. Also, we did not study the newborns of women we included. Therefore, we did not assess CT vertical transmission or premature morbidities in preterm babies. Despite our limitations, our study design was adequate to answer our primary hypothesis.

In conclusion, based on our study, we noticed that screening for CT in the prenatal period is not essential to assess the risk of sPTB. However, CT is frequently asymptomatic, also, it is frequent in the young population and it can be vertically transmitted. Thus, it would be interesting a screening program for CT infection among pregnant up to 20 years old, which are high-risk populations. As the reality of the Brazilian Public Health System probably would not support financing diagnostic tests for CT, we also believe that an efficient prenatal program is enough to minimize the risks of pregnancy adverse outcomes, even in the young population.

References:

1. Howson C, Kinney M, Lawn J. Born Too Soon. 2012.

2. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller A, Lumbiganon P, Petzold M, Hogan D, et al. Articles Global , regional , and national estimates of levels of preterm birth in 2014 : a systematic review and modelling analysis. 2019;37–46.

3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos Não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Saúde Brasil 2015/2016 : uma análise da situação de saúde e da epidemia pelo vírus Zika e por outras doenças transmitidas pelo Aedes aegypti [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos Não Transmissíveis e Promoção da Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 386 p. : il.

4. Nadeau HCG, Subramaniam A, Andrews WW. Infection and preterm birth. Semin Fetal Neonatal Med [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;1:8–13. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.siny.2015.12.008

5. Pinto VM, Szwarcwald CL, Baroni C, Stringari LL, Inocêncio LA, Miranda AE.

Chlamydia trachomatis Prevalence and Risk Behaviors in Parturient Women Aged 15 to 24 in Brazil METHODOLOGY. Sex Transm Dis. 2011;38(10):957–61.

6. Garcês AX, Martinez AMB, Gonçalves CV, Germano FN, Barral MFM, Vieira VC. Prevalência de Chlamydia trachomatis e fatores de risco associados à infecção detectada em amostra endocervical. Rev Bras Ginecol e Obs. 2013;35(8):379–83.

7. Witkin SS, Minis E, Athanasiou A, Leizer J, Linhares IM. Chlamydia trachomatis: the Persistent Pathogen. Clin Vaccine Immunol. 2017;24(10):1–9.

8. Witkin SS, Linhares I, Giraldo P, Jeremias J, Ledger WJ. Individual immunity and susceptibility to female genital tract infection. 2000;252–6.

9. Silva, Maria José Penna Maisonnette de Attayde; Florêncio, Gilzandra Lira Dantas; Gabiatti, José Roberto Erbolato; do Amaral, Rose Luce; Eleutério Júnior, José; Gonçalves AK da S. Perinatal morbidity and mortality associated with chlamydial infection : a meta-analysis study. Brazilian J Infect Dis [Internet]. Elsevier; 2011;15(6):533–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S1413-8670(11)70247-1

10. Liu B, Roberts CL, Clarke M, Jorm L, Hunt J, Ward J. Chlamydia and gonorrhoea infections and the risk of adverse obstetric outcomes : a retrospective cohort study. 2013;1–7.

11. Ammerdorffer, Anne Stojanov M, Greub G, Baud D. Chlamydia trachomatis and chlamydia-like bacteria : new enemies of human pregnancies. Curr Opin Infect Dis. 2017;30(3):289–96.

12. Johnson HL, Ghanem KG, Zenilman JM, Erbelding EJ. Sexually Transmitted Infections and Adverse Pregnancy Outcomes Among Women Attending Inner City Public Sexually Transmitted Diseases Clinics. Sex Transm Dis. 2011;38(3):167–71.

13. Reekie J, Roberts C, Preen D, Hocking JS, Donovan B, Ward J, et al. Chlamydia trachomatis and the risk of spontaneous preterm birth , babies who are born small for gestational age , and stillbirth : a population-based cohort study. Lancet Infect Dis. 2018;3099(18):1–9.

14. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Gestação de alto risco: manual técnico / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. – 5. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2012. 302 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

15. Morré SA, Sillekens P, Jacobs M V, van Aarle P, de Blok S, van Gemen B, et al. RNA Amplification by Nucleic Acid Sequence-Based Amplification with an Internal Standard Enables Reliable Detection of Chlamydia trachomatis in Cervical Scrapings and Urine Samples. J Clin Microbiol. 1996;34(12):3108–14.

16. Hyman RW, Fukushima M, Jiang H, Fung E, Rand L, Johnson B, et al. Diversity of the Vaginal Microbiome Correlates With Preterm Birth. 2014;21(1):32–40.

17. Liu B, Roberts CL, Clarke M, Jorm L, Hunt J, Ward J. Chlamydia and gonorrhoea infections and the risk of adverse obstetric outcomes : a retrospective cohort study. Sex Transm Infect. 2013;89(8):1–7.

18. Sisti G, Kanninen TT, Witkin SS. Maternal immunity and pregnancy outcome : focus on preconception and autophagy. Nat Publ Gr [Internet]. Nature Publishing

Group; 2015;(November):1–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/gene.2015.57

19. da Silveira MF, Sclowitz IKT, Entiauspe LG, Mesenburg MA, Stauffert D, Bicca GL de O, et al. Chlamydia trachomatis infection in young pregnant women in Southern Brazil : a cross-sectional study Infecção por Chlamydia trachomatis em gestantes jovens no Sul do Brasil : um estudo transversal Infección por Chlamydia trachomatis en gestantes jóvenes e. Cad Saude Publica. 2017;33(1):1–9.

20. de Azevedo MJ, Nunes S dos S, de Oliveira FG, Rocha DAP. High prevalence of Chlamydia trachomatis in pregnant women attended at Primary Health Care services in Amazon, Brazil. J São Paulo Inst Trop Med. 2019;61:1–8.

21. Schmidt R, Muniz RR, Cola E, Stauffert D, Silveira MF, Miranda AE. Maternal Chlamydia trachomatis Infections and Preterm Births in a University Hospital in. 2015;4–11.

22. Honkila M, Wikström E, Renko M, Surcel H, Pokka T, Ikäheimo I, et al. Probability of vertical transmission of Chlamydia trachomatis estimated from national registry data. Sex Transm Infect. 2017;0:1–5.

23. Mardh P-A. Influence of infection with Chlamydia trachomatis on pregnancy outcome , infant health and life-long sequelae in infected o € spring. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2002;16(6):847–64.

24. Hammerschlag MR. Chlamydial and Gonococcal Infections in Infants and Children. Clin Infect Dis. 2011;53(3):99–102.

25. Olson-Chen C, Balaram K, Hackney DN. Chlamydia trachomatis and Adverse

Pregnancy Outcomes : Meta- analysis of Patients With and Without Infection. Matern Child Health J [Internet]. Springer US; 2018;22(6):812–21. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s10995-018-2451-z

26. Adachi K, Nielsen-saines K, Klausner JD. Chlamydia trachomatis Infection in Pregnancy : The Global Challenge of Preventing Adverse Pregnancy and Infant Outcomes in Sub-Saharan Africa and Asia. Biomed Res Int. Hindawi Publishing Corporation; 2016;2016.

27. Leal C, Esteves-Pereira AP, Nakamura-Pereira M, Torres JA, Theme-Filha M, Domingues RMSM, et al. Prevalence and risk factors related to preterm birth in Brazil. Reprod Health [Internet]. Reproductive Health; 2016;13(Suppl 3):164–265. Available from: http://dx.doi.org/10.1186/s12978-016-0230-0

28. Loomans EM, van Dijk AE, Vrijkotte TGM, van Eijsden M, Stronks K, Gemke RJBJ, et al. Psychosocial Stress During Pregnancy Is Related to Adverse Birth Outcomes: Results From a Large Multi-Ethnic Community-Based Birth Cohort. Eur J Public Health. 2013;23(3):485–91.

29. Shapiro GD, Fraser WD, Frash MG, Séguin JR. Psychosocial stress in pregnancy and preterm birth : associations and mechanisms. J Perinat Med. 2013;41(6):631–45.

30. Gomez-Lopez N, StLouis D, Lehr MA, Sanchez-Rodriguez EN, Arenas-Hernandez M. Immune cells in term and preterm labor. Cell Mol Immunol. 2014;11(6):571–81.

Table 1. Maternal socio-demographic, behavioral and medical history data of sPTB compared to term births (Control).

	sPTB (n=121)	Control (n=440)	p*
C. trachomatis **diagnosis**			
CT +	8 (6.6%)	26 (5.9%)	0.7743
CT -	113 (93.4%)	414 (94.1%	
Age	26.1 (6.3)	25.9 (5.7)	
≤ 19	20 (16.5%)	52 (11.8%)	0.2209
20 - 25	40 (33.1%)	177 (40.2%)	
≥ 26	61 (50.4%)	211 (47.9%)	
Skin color			
White	39 (32.2%)	149 (34.2%)	
Black/Brown	81 (66.9%)	284 (65.1%)	0.9147
Yellow	1 (0.8%)	3 (0.7%)	
Gestational BMI			
Underweight	24 (20%)	66 (15.2%)	
Normal weight	53 (44.2%)	176 (40.5%)	0.2794
Overweight	29 (24.2%)	116 (26.7%)	
Obesity	14 (11.7%)	76 (17.5%)	
Years of schooling			
9 years	26 (21.5%)	91 (20.8%)	0.9798
9-12 years	82 (67.8%)	301 (68.7%)	
>12 years	13 (10.7%)	46 (10.5%)	
Marital status			
Married/Live with a partner	92 (76%)	361 (82.1%)	0.1374
Single/Divorced	29 (24%)	79 (17.9%)	
Lifetime sexual partners			
1-4	93 (76.8%)	352 (80%)	0.4500
≥ 5	28 (23.1%)	88 (20%)	
Smoking			
Yes	19 (15.7%)	30 (6.8%)	0.0022
No	102 (84.3%)	410 (93.2%)	
Chronic Hypertension			
Yes	3 (2.5%)	15 (3.4%)	0.6047
No	118 (97.5%)	424 (96.6%)	
Gestational Hypertension			
Yes	17 (14.1%)	40 (9.1%)	0.1136
No	104 (85.9%)	398 (90.9%)	
Diabetes			
Yes	1 (0.8%)	3 (0.7%)	0.8670
No	120 (99.2%)	437 (99.3%)	
Gestational Diabetes			
Yes	6 (5%)	22 (5%)	0.9853
No	115 (95%)	418 (95%)	

Pregnancies			
1	49 (40.5%)	187 (42.5%)	0.4621
2	28 (23.1%)	118 (26.8%)	
≥ 3 pregnancies	44 (36.4%)	135 (30.7%)	
Previous births			
0	55 (45.4%)	213 (48.4%)	
1	39 (32.3%)	140 (31.8%)	0.7866
≥ 2 births	27 (22.3%)	87 (19.7%)	
Previous abortion			
Yes	30 (24.8%)	99 (22.5%)	0.5955
No	91 (75.2%)	341 (77.5%)	
Previous PTB			
Yes	42 (66.7%)	22 (9.9%)	<0.0001
No	21 (33.3%)	199 (90.1%)	

***Chi-square test**

sPTB: Spontaneous Preterm Birth

Table 2. Maternal characteristics associated with sPTB according to crude OR

		OR*	95% CI	
C. trachomatis **diagnosis**				
	CT +	1.127	0.497	2.558
	CT -	Ref	-	-
Smoking				
	Yes	2.546	1.377	4.705
	No	Ref	-	-
Previous PTB				
	Yes	18.091	9.126	35.864
	No	Ref	-	-

***Logistic Regression Model**

OR: odds ratio

sPTB: Spontaneous Preterm Birth

Table 3. Maternal characteristics associated with sPTB according to adjusted OR (aOR)

		aOR*	95% IC	
Smoking				
	Yes	1.836	0.661	5.101
	No	Ref	-	-
Previous PTB				
	Yes	17.442	8.773	34.677
	No	Ref	-	-

***Logistic Regression Model**

aOR: Adjusted odds ratio

sPTB: Spontaneous Preterm Birth

Table 4. Pregnant women's age distribution according to CT infection

	CT +	CT -	p*
Age			
≤ 19	11 (14.7%)	64 (85.3%)	0.0032
20 - 25	17 (7%)	225 (93%)	
≥ 26	13 (4.1%)	306 (95.9%)	

***Chi-square test**

CT: *Chlamydia trachomatis*

CT+: positive diagnosis for *Chlamydia trachomatis*

CT-: negative diagnosis for *Chlamydia trachomatis*

Table 5. Association between age and CT infection according to crude OR

		OR*	95% CI	
Age				
	≤ 19	4,046	1,734	9,436
	20 - 25	1,778	0,847	3,736
	≥ 26	Ref	-	-

***Logistic Regression Model**

OR: odds ratio

CI: Confidence Interval

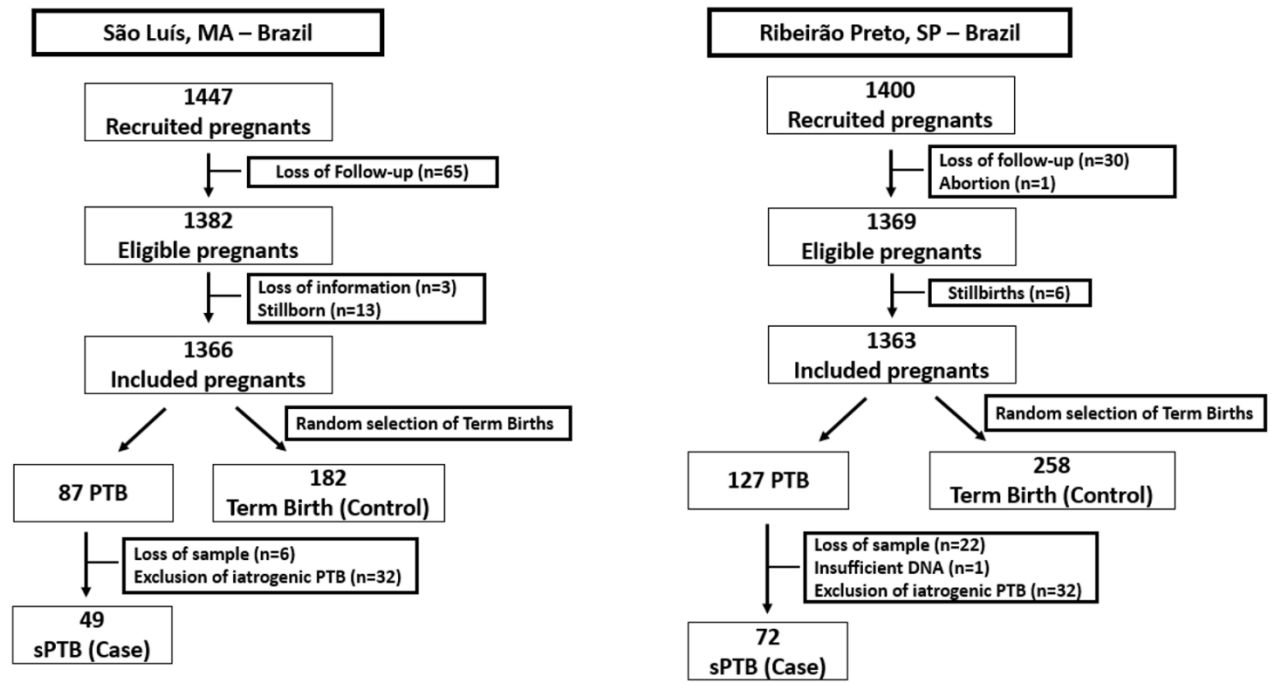


Figure 6.Flowchart – Screening and inclusion of pregnants in BRISA cohort 2010 – 2011 and selection of samples for this study (n=561)
sPTB: Spontaneous Preterm Birth

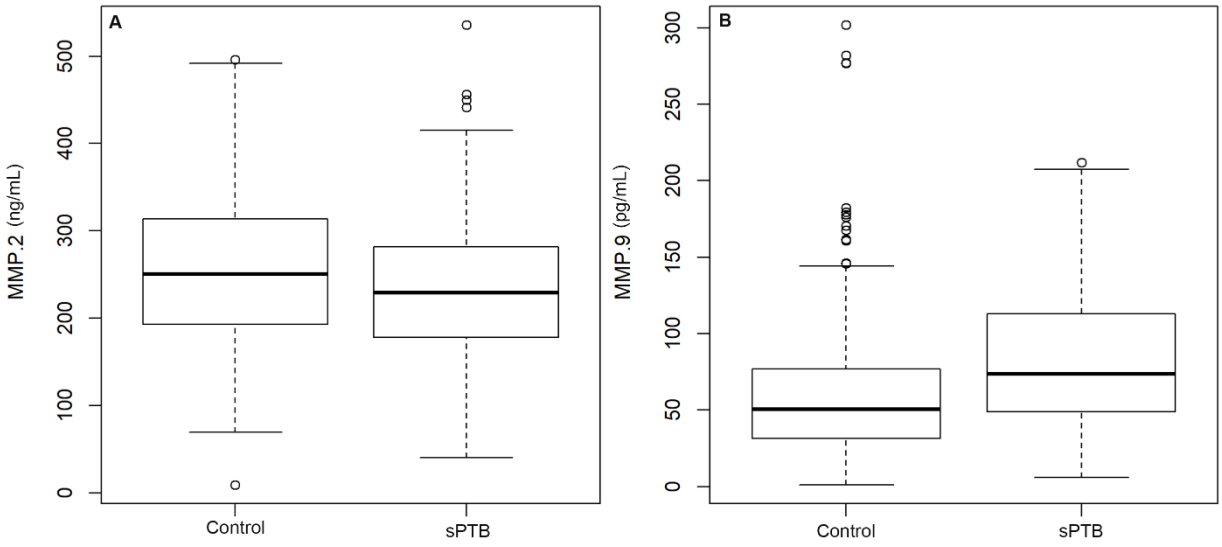


Figure 7. Box-plot with distribution of MMP-2 (A) and MMP-9 (B) levels in plasmatic sample of pregnants analyzed
MMP: Matrix Metalloproteinase
sPTB: Spontaneous Preterm Birth

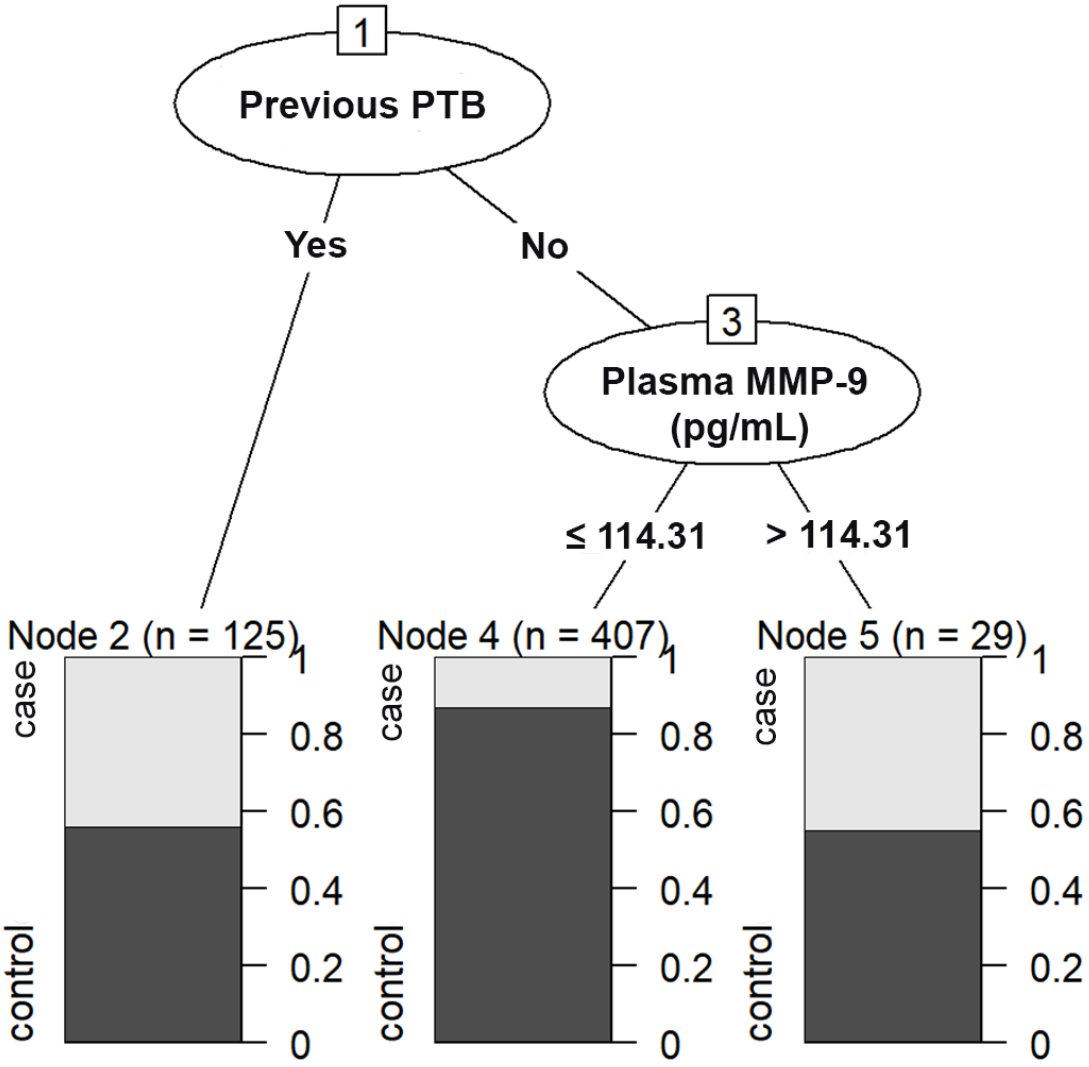


Figure 8. Conditional inference tree with “Previous PTB” and “Plasmatic MMP-9 levels” correlation
PTB: Preterm Birth
MMP-9: Matrix Metalloproteinase 9

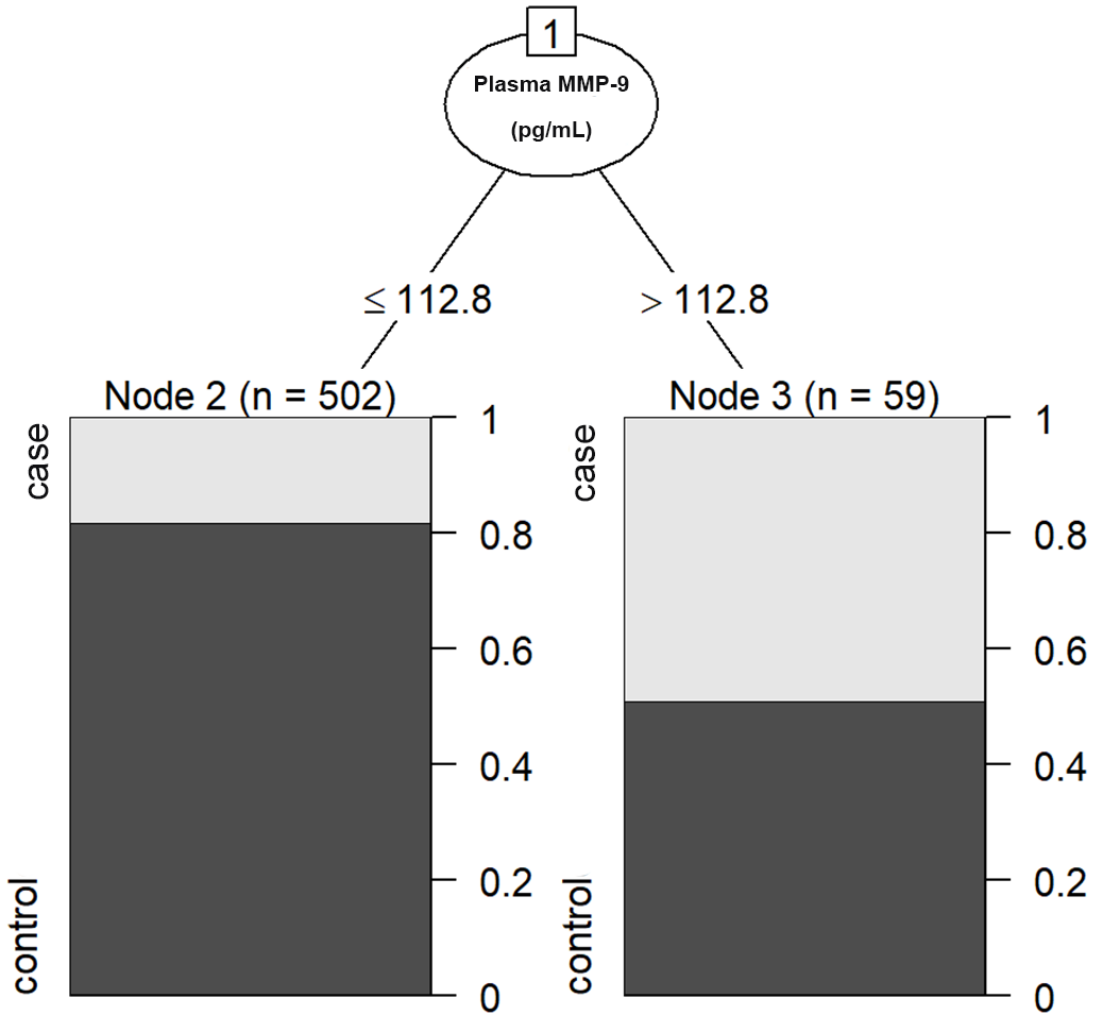


Figure 9. Conditional inference tree with positive association between "Plasmatic MMP-9 levels" and sPTB
MMP-9: Matrix Metalloproteinase 9

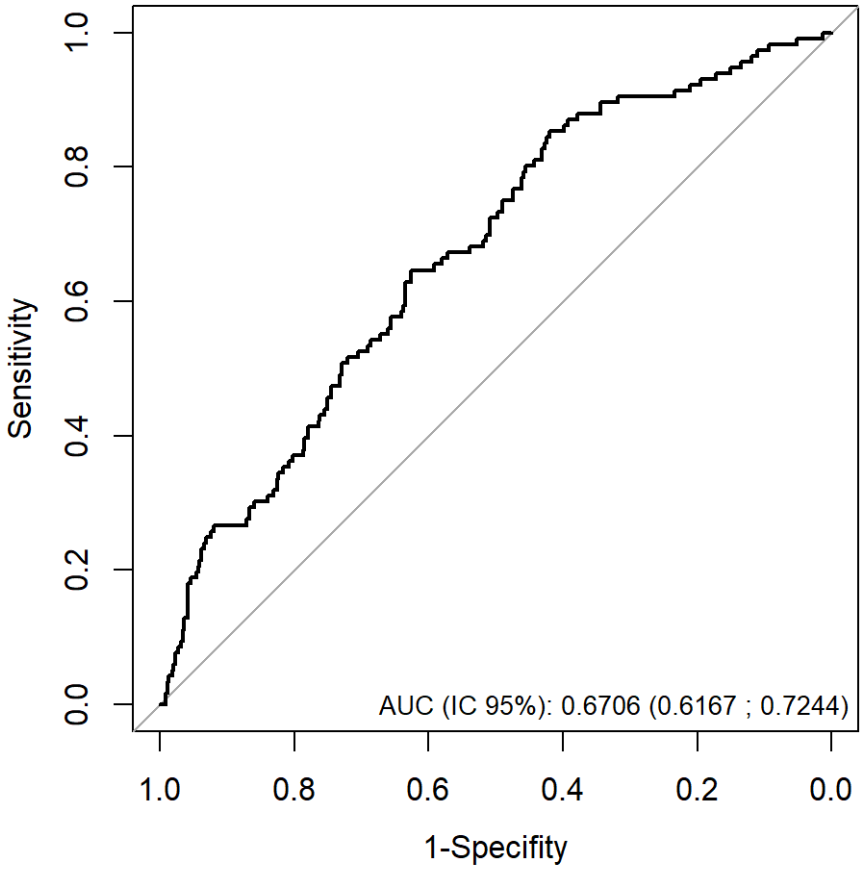


Figure 10. ROC Curve for MMP-9 prediction value for sPTB
AUC: Area Under the Curve