

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ORLANDO TOBIAS JUNIOR

**ESTUDO COMPARATIVO DE INDICADORES DE ESTRESSE
OXIDATIVO ENTRE GESTAÇÃO HUMANA A TERMO E
PROLONGADA**

CRICIÚMA, MARÇO DE 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ORLANDO TOBIAS JUNIOR

**ESTUDO COMPARATIVO DE INDICADORES DE ESTRESSE
OXIDATIVO ENTRE GESTAÇÃO HUMANA A TERMO E
PROLONGADA.**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade do Extremo Sul Catarinense
como requisito para obtenção do título de
mestre em Ciências da Saúde.**

Orientador: Dr. Pedro Roosevelt T. Romão

CRICIÚMA, MARÇO DE 2009

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela plenitude vida, despertada a cada encontro do tempo com o espaço.

Agradeço aos meus pais por me facultarem a vida, condições para o estudo e formação do caráter.

Aos meus irmãos pela presteza nos momentos necessários.

A Lígia, pela paciência nas minhas ausências e estresses, pela força e compreensão; por se fazer presente de maneira singular em minha vida.

Ao Mateus, que mesmo sem compreender exatamente o mundo exterior, já aprende paciência e ensina o infinito.

À equipe de enfermagem, em especial à enfermeira Renata, que colaborou de forma atuante na coleta das amostras para análise.

A toda a equipe do Laboratório de Bioquímica do Hospital Regional de Araranguá –SC (HRA), pela preparação das amostras utilizadas neste trabalho.

Aos colegas da UNESC - Luis Gustavo, que várias fez o traslado das amostras e materiais de pesquisa; Larissa, que se empenhou na dosagem das amostras; e Fabrícia, que sempre se mostrou prestativa e dedicada às dúvidas e análises das amostras.

Aos colegas de classe, pela espontaneidade e alegria na troca de informações, numa rara demonstração de amizade e solidariedade.

Ao meu orientador, Professor Dr. Pedro Roosevelt T. Romão, pelos momentos de dedicação e orientação junto a este trabalho que, não bastara a dificuldade da função, tratou de um tema não pertinente a sua prática cotidiana.

Enfim, agradeço àqueles que, direta ou indiretamente, estiveram junto e de alguma forma contribuíram para a concretização desta dissertação.

RESUMO

Introdução: A gravidez prolongada aumenta a morbi-mortalidade materna e fetal. Na tentativa de diminuir estas complicações, este estudo objetivou um melhor entendimento de sua fisiopatologia, observando as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e sua relação com as gestações que alcançaram 41 semanas ou mais.

Objetivo: Comparar os marcadores de estresse oxidativo entre mulheres com gestação a termo e gestação prolongada que tiveram seu parto por cesariana eletiva.

Materiais e Métodos: Este estudo avaliou 19 mulheres no termo da gestação (idade gestacional \leq 39 semanas) e 18 mulheres com gestação prolongada (idade gestacional \geq 41 semanas); ambos os grupos tiveram o parto por cesariana eletiva. Para comparar os marcadores de estresse oxidativo entre estes dois grupos foram medidas as espécies reativas do ácido tiobarbitúrico e carbonilação de proteínas em líquido amniótico, placenta e plasma de cordão umbilical e também foram dosadas as concentrações de nitrito em líquido amniótico e plasma de cordão umbilical.

Resultados: Os níveis de carbonilação proteica mostraram-se significativamente menores em placenta e plasma de veia umbilical de mulheres que se submeteram a cesárea eletiva. Ao contrário, estes níveis foram mais elevados em líquido amniótico. De maneira peculiar, os níveis de nitrito mostraram-se significativamente reduzidos em líquido amniótico e também em artéria e veia umbilicais no grupo das gestações prolongadas.

Conclusões: Os resultados deste estudo indicaram que a cesariana eletiva nas gestações prolongadas expõe o feto a um menor estresse oxidativo materno placentário, observado pela medida da carbonilação proteica em placenta e veia umbilical e do óxido nítrico na veia umbilical. Além disso, o parto pós-termo poderia estar associado com uma redução significativa da produção de óxido nítrico nos compartimentos materno e fetal.

Palavras-chave: Gestação prolongada; Cesariana eletiva; Peroxidação lipídica; Carbonilação proteica; Óxido nítrico.

Abstract

Introduction: The postterm pregnancy increases morbi-mortality in mothers and fetus. In the attempt to diminish these complications, this study objectified a better agreement of its fisiopatology, observing the reactive species of oxygen and nitrogen and its relation with the pregnancies that went beyond 41 weeks.

Objective: To compare the oxidative stress biomarkers between groups of pregnant women with fullterm and postterm elective cesarean delivery.

Design and methods: This study included 19 women who went elective cesarean at term (gestational age ≤ 39 weeks) and 18 who went elective cesarean beyond term (gestational age ≥ 41 weeks). In order to compare the oxidative stress biomarkers between these groups, we measured the thiobarbituric acid-reactive species and protein carbonyls in amniotic fluid, placenta and umbilical cord plasma, and also nitrite concentrations in amniotic fluid and plasma from umbilical cord.

Results: The protein carbonyls levels were significantly decreased in placenta and plasma from umbilical vein of women who had postterm cesarean delivery. On contrary, these levels were found significantly increased in fluid amniotic. Interestingly, nitrite levels were significantly reduced in amniotic fluid and also in umbilical artery and umbilical vein cord of postterm compared to fullterm elective cesarean group. No differences in lipid peroxidation were achieved in mother or child compartment between the groups of fullterm and postterm elective cesarean delivery.

Conclusions: Our results indicate that postterm cesarean delivery exposes the fetus to a lower maternal oxidative stress than fullterm cesarean delivery. Moreover, the postterm parturition could be associated with a significant reduction in nitric oxide production in both fetal and maternal compartments.

Keywords: Oxidative Stress; Postterm Caesarean Section; Lipid Peroxidation; Protein Carbonyls; Nitric oxide

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT – Catalase

COX – Ciclooxygenase

DUM – Data da última menstruação

ERNS – Espécies reativas de nitrogênio

eNOS- Óxido nítrico sintase endotelial

EROs – Espécies reativas de oxigênio

GPx – Glutathione peroxidase

LPS – Lipopolissacarídeo

iNOS- Óxido nítrico sintase induzida

nNOS- Óxido nítrico sintase neuronal

MDA – Malondialdeído

MMPs – Metaloproteinases de matriz

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

OR – Odds ratio

RUPREMA – Rotura prematura de membranas

PAF – Fator de ativação plaquetária

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
1 INTRODUÇÃO.....	7
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 ARTIGO: <i>Decreased oxidative stress biomarkers in postterm caesarean delivery</i>	20
4 DISCUSSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXOS.....	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gestação Prolongada

Tradicionalmente gravidez prolongada tem sido definida como aquela que ultrapassa 42 semanas ou 294 dias calculados a partir do primeiro dia da última menstruação (DUM) (WHO, 1977; FIGO, 1980). No entanto, contemporaneamente alguns autores têm conceituado a gestação prolongada como aquela cuja idade gestacional encontra-se entre 40 e 42 semanas (Ministério da Saúde, 2000). As expressões gestação prolongada, pós-data e pós-termo são muitas vezes usadas como sinônimos; contudo, não devem ser confundidas com a gestação pós-madura, que se refere às alterações encontradas nos recém-nascidos decorrentes do parto pós-termo (FIGO, 1980). Problemas semânticos contribuem para a confusão na compreensão da simples constatação cronológica da gravidez. Este trabalho utilizou a idade gestacional de 41 semanas ou mais como gestação prolongada, considerando o fato de que os riscos perinatais aumentam a partir deste período (Crowlei, 2000; Sanchez-Ramos et al., 2003). Embora a etiologia da gestação prolongada não esteja completamente entendida, identificam-se algumas condições clínicas associadas às gestações que se prolongam por mais de 42 semanas, como a anencefalia, as trissomias do 16 e do 18, a hipoplasia adrenal fetal, a ausência de pituitária fetal, a deficiência da sulfatase placentária e a gestação extra-uterina. Fator comum nas gestações prolongadas é a diminuição do alto nível de estrogênio, característica habitual da gestação normal (Cunninghan et al., 2001). Estudos recentes sustentam que a redução da liberação do óxido nítrico (NO) pela cérvix pode contribuir para prolongar a gestação (Vaisanen-Tommiska et al., 2004).

Aproximadamente 5 a 10% de todas as gestações continuam além das 42 semanas de gestação (Olesen et al., 2003; Sanchez et al., 2003). Nos centros onde as mulheres procuram assistência pré-natal no primeiro trimestre e/ou onde é feita a datação precoce na primeira metade da gravidez, a incidência da gestação prolongada é menor do que 5% (Sabaratinam., 1994).

A capacidade da placenta em manter o suporte de nutrientes adequado ao desenvolvimento fetal após o período esperado para o término da gestação foi questionada já no ano de 1902 (Ballantyne., 1902). Até a metade do século XX a gravidez prolongada não era considerada um problema, exceto porque estava associada a fetos macrossômicos com conseqüente dificuldade ao nascimento. A indução do parto só era indicada para evitar o crescimento exagerado do feto e sua distócia durante o parto. A possibilidade do aumento da mortalidade perinatal em gestação após 42 semanas era considerada insuficiente para indicar intervenção. A indução, principalmente com colo desfavorável, era considerada um erro grave. Na década de 50 foi reconhecido que alguns fetos nascidos pós-termo exibiam alterações que aumentavam de forma significativa a morbidade e a mortalidade. Após 1970 passou-se a preconizar intervenções ou monitoração da vitalidade fetal, na tentativa de minorar este problema. (Sa et al., 2000).

Vários autores observaram que em gestações pós-termo ocorre aumento de complicações maternas, como o aumento nas taxas de cesariana, associadas a um maior risco de morbidade e mortalidade fetal (Hannah et al.,1992; Olesen et al., 2003). Pesquisa realizada em Dublin, comparando 56.503 gestações com parto entre 37 e 42 semanas e 6.301 gestações com parto após 42 semanas relatou quatro vezes mais mortes intrauterinas, três vezes mais mortes neonatais e dez vezes mais convulsões neonatais precoces nas gestações pós-data (Grant, 1994).

Estudo transversal utilizando dados registrados em um período de 15 anos na Dinamarca e envolvendo 77.956 gestações pós-termo e 34.140 gestações a termo demonstrou um risco perinatal e complicações maternas maiores nas gestações prolongadas, quando comparadas com partos de gestação a termo (OR ajustado de 1,2 a 3,1), assim como risco de morte perinatal (OR de 1,05 a 1,68) (Olesen et al., 2003).

Em torno de 3% de todos os fetos com mais de 42 semanas continuam a crescer e podem exceder a 4.500 g ao nascimento (Cunningham et al., 2001). A macrosomia fetal aumenta o risco para distócia de ombro, lesões de plexo braquial e o risco para a mãe de laceração do canal de parto, assim como eleva a taxa de cesárea. O principal risco, porém, é a compressão do cordão umbilical associada com oligodrânmino. O pico de tamanho e superfície placentária ocorre na 37^a semana, reduzindo-se posteriormente sua superfície e função; como o feto continua crescendo, há diminuição do índice feto/placenta, levando a uma redução na taxa de crescimento da placenta, com perda de gordura e glicogênio. Assim, depois do nascimento o neonato está sujeito a maior instabilidade térmica, hipoglicemia, policitemia e acidose (Freitas, 2006).

A tentativa de diminuir estes riscos motivou a realização de vários estudos randomizados (Hanaah et al., 1992; Nacional Institute of Child Health and Human Development, 1994) para a escolha do melhor manejo nessas situações. Estudos de metanálise que compararam indução do parto em gestações que excederam 41 semanas com casos de seguimento de gestação, avaliando o bem-estar fetal duas vezes por semana até o nascimento, demonstraram que a indução do trabalho de parto com 41 semanas de gestação parece reduzir a mortalidade perinatal. No entanto, os autores sugerem que tanto a gestante quanto o obstetra que optarem

pelo manejo conservador após este período devem estar cientes da falta de evidências que apoiem a efetividade de qualquer método de avaliação da vitalidade fetal (Crowlei, 2000; Sanchez-Ramos et al., 2003).

1.2 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio – radicais livres

Pouco se sabe sobre a influência das espécies reativas de oxigênio na gestação prolongada. Há evidências de que as EROs tenham um papel fundamental em condições obstétricas tais como aborto, pré-eclâmpsia, mola hidatiforme, malformações fetais, trabalho de parto prematuro e diabetes gestacional, que são importantes causas de elevada morbidade e mortalidade tanto materno quanto fetal (Agarwal et al., 2005).

As espécies reativas derivadas de oxigênio, juntamente com as espécies reativas derivadas de nitrogênio, formam os dois tipos principais de radicais livres. Radicais livres são espécies instáveis e altamente reativas que se tornam estáveis adquirindo elétrons de ácidos nucleicos, lipídeos, proteínas, carboidratos ou alguma molécula próxima, causando uma cascata de reações em cadeia e resultando em dano celular (Attaran et al., 2000; Pierce et al., 2004). Os três principais representantes das espécies reativas de oxigênio são o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\bullet). O O_2^- é formado quando elétrons extravasam da cadeia transportadora de elétrons (Halliwell et al., 1992). A dismutação do superóxido resulta na formação do H_2O_2 . O OH^\bullet é altamente reativo e pode modificar purinas e pirimidinas causando dano ao DNA (Mello Filho et al., 1984). Descoberto na década de 80 (Furchgott & Zawadzki, 1980), o NO é o principal representante das espécies reativas de nitrogênio, atualmente reconhecido como molécula ubíqua, exercendo uma gama de ações cruciais no organismo (Jane

et al., 1996). É sintetizado por um grupo de enzimas conhecidas como óxido nítrico sintases (NOs), classificadas em NOs endotelial (eNOs), NOs induzível (iNOs) e NOs neuronal (nNOs). A produção do NO se dá através da reação entre a L-argina e o oxigênio molecular, gerando como coproduto a citrulina (Diejomaoh et al., 2003). Todas estas isoformas da NO sintase foram encontradas no trato reprodutor feminino, sugerindo que o NO pode estar envolvido nas atividades fisiológicas da reprodução (Diejomaoh et al., 2003) tendo como principais funções no útero humano as ações de antiagregação plaquetária na circulação materno-fetal, regulação do fluxo placentário e supressão das contrações miométriais (Jane et al., 1996).

O estresse oxidativo influencia a vida da mulher desde a fase reprodutiva até a menopausa (Agarwal et al., 2005). Pode ser definido como um desequilíbrio entre a quantidade de espécies reativas e a concentração de antioxidantes intra e extracelulares. Suas concentrações e estados são determinados pela taxa de produção e remoção por vários antioxidantes (Schafer & Buettner, 2001). No homem são encontrados dois tipos principais de antioxidantes: enzimáticos e não enzimáticos (Van et al., 2002; Pierce et al., 2004). Os enzimáticos, também conhecidos como antioxidantes naturais, neutralizam o excesso de radicais livres e previnem que os mesmos causem dano a estruturas celulares. Os antioxidantes enzimáticos são compostos por superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx), os quais também causam a redução do peróxido de hidrogênio em água e álcool. Antioxidantes não enzimáticos são também conhecidos como antioxidantes sintéticos ou suplementados na dieta. O complexo sistema antioxidante do corpo é influenciado pela ingestão de vitaminas e minerais

antioxidantes da dieta, tais como Vit C, Vit E, Zn, Se, taurina, hipotaurina, beta caroteno e caroteno (Van et al., 2002; Pierce et al., 2004).

1.3 Gravidez e estresse oxidativo

Como a gravidez é um estado fisiológico associado com a alta demanda energética e o aumento da necessidade de oxigênio, espera-se um aumento nos níveis de estresse oxidativo neste período (Patil, 2007). Numerosos estudos (Little & Gladen, 1999; Mocatta et al., 2004; Agarwal et al., 2005) têm avaliado se a gravidez por si aumentaria os níveis de estresse oxidativo.

Comparando dados publicados na literatura em relação à peroxidação lipídica em diversas estruturas, os autores Little & Gladen (1999) observaram que as mulheres grávidas apresentaram níveis de peroxidação lipídica mais elevados em relação àqueles determinados para o grupo de não gestantes; este aumento iniciou no primeiro trimestre, atingindo seu pico no segundo trimestre e decrescendo no último trimestre. Em consonância com o estudo anterior, marcadores de peroxidação lipídica, como o hidroxiperóxido lipídeo e o malondialdeído (MDA), dosados no plasma de mulheres grávidas, foram mais altos do que nas não grávidas (Morris et al., 1998; Mihailovi , 2000).

Além disso, foi demonstrado que os níveis plasmáticos de MDA aumentam com a progressão da gravidez normal (Wickens, 1981). Ishihara e colaboradores (1978), estudando os níveis de peroxidação lipídica em não gestantes e gestantes, observaram um notável aumento dos níveis de lipoperóxidos no 2º e 3º trimestres da gravidez. Resultados similares também foram descritos por Kodliwadmth e colaboradores (1992). Recentemente, verificou-se que no decorrer da gestação

ocorre um aumento gradual de MDA plasmático das gestantes, sendo menor no 1º e maior no 3º trimestre. (Patil et al., 2007).

Com relação ao NO, altos níveis de seus metabólitos no fluido cervical foram evidenciados em estudos comparativos entre gestações tardias e gestações precoces (Maul et al., 2003; Vaisanen-Tommiska et al., 2003). Quanto à defesa antioxidante, representada pela SOD, GPx, e CAT, demonstrou-se haver uma diminuição no último trimestre da gestação (Patil et al., 2007).

Embora a relação do estresse oxidativo com o parto e a via de parto tenha sido alvo de diversos estudos (Yaacobi et al., 1999; Georgeson et al., 2002; Inanc et al., 2005; Fogel et al., 2005), o exato papel do estresse oxidativo no desencadeamento do trabalho de parto ainda é desconhecido (Agarwal et al., 2005; Buonocore et al., 2006), assim como ainda há controvérsias na discussão a respeito de o parto vaginal não complicado expor o feto a condições de estresse oxidativo (Raijmakers et al., 2003; Buhimschi et al., 2003).

Estudos tem evidenciado que o trabalho de parto induz um aumento da peroxidação lipídica. Em um estudo de caso-controle realizado por Fainaru et al. (2002), os níveis séricos de H₂O₂ foram mais altos nas pacientes que estavam em trabalho de parto, quando comparados aos níveis apresentados pelos controles, que não estavam em trabalho de parto. Amostras de plasma do cordão umbilical que foram obtidas de mulheres que tiveram seus bebês por parto vaginal não complicado mostraram uma taxa de peroxidação lipídica maior do que aquelas obtidas de mulheres que deram à luz por cesariana eletiva (Rogers et al., 1998). Resultados similares foram obtidos por Mocata et al. (2004) e Inanc et al. (2005).

Apesar de os vários autores acima citados demonstrarem que o parto vaginal induz um estresse oxidativo superior àquele verificado na cesariana eletiva, alguns outros estudos encontraram resultados discordantes, principalmente quando avaliaram os níveis de peroxidação lipídica do sangue do cordão umbilical. Os autores deste último grupo sugerem que o parto por cesárea não oferece vantagem sobre o parto vaginal no que se refere ao estresse oxidativo (Foggel, 2005; Hiromichi, 2007; Hracsko et al., 2007). Quando comparado estresse oxidativo entre sangue de artéria e veia umbilical notou-se que o trabalho de parto espontâneo, independentemente da via de parto, apresentava níveis do ácido tiobarbitúrico (TBARS) mais elevados na artéria umbilical que na veia umbilical (Yaacobi et al., 1999). Estes resultados suportam o entendimento de que as EROs atuam no desencadeamento do trabalho de parto, possivelmente através de seus efeitos sobre o metabolismo das prostaglandinas, ou alternativamente funcionariam como um marcador de estresse oxidativo fetal, secundário ao processo de trabalho de parto (Yaacobi et al., 1999). Resultado similar foi encontrado ao verificar-se que lipídeos de soro da artéria umbilical foram mais susceptíveis a peroxidação do que lipídeos da veia umbilical (Fogel et al., 2005).

Dosando níveis de F2-isprostano, que é um marcador bioquímico que identifica lesão oxidativa proveniente da peroxidação do ácido araquidônico (Morrow et al., 1990), Buonocore et al. (2006) observaram que nenhum aumento nos níveis de F2-isprostano foi encontrado no plasma de mães durante o parto ou a gravidez e que além disso, nenhuma correlação foi encontrada entre F2-isprostano do plasma materno com o dos recém-nascidos. Por outro lado, Comporti et al. (2004) encontraram F2-isprostanos significativamente elevados no plasma de neonatos quando comparados aos adultos.

Quando estudado o sistema antioxidante, foi observado que a atividade das enzimas SOD e CAT mostrou-se significativamente maior no plasma do cordão umbilical obtido de gestantes que se submeteram a cesariana eletiva do que no plasma obtido do cordão umbilical de mulheres que tiveram parto vaginal (Inanc et al., 2005). Também foi observado por Buhimschi et al. (2003) que o trabalho de parto aumenta a glutatona em hemáceas de fetos a termo, sugerindo que o trabalho de parto por si tem um papel importante na proteção dos fetos contra danos oxidativos nos momentos iniciais da vida extra uterina. Esta proteção adicional é perdida com nascimentos por cesárea eletiva. Neonatos pré-termos não respondem ao trabalho de parto com um aumento da glutatona como encontrado nos neonatos a termo.

As consequências do estresse oxidativo na estrutura fetal envolvem a ativação de um número complexo de genes envolvidos na inflamação, coagulação, fibrinólise, ciclo e sinalização celular (Wagenaar et al., 2004). É atualmente reconhecido que EROs são importantes desde a fertilização e desenvolvimento dos embriões (Dennerly, 2004), até a geração de algumas doenças com reflexo no período neonatal, como displasia broncopulmonar, retinopatia da prematuridade, persistência do ducto arterioso, hemorragia intracraniana, sepse e encefalopatia hipóxico-isquêmica (Drury et al., 1998; Sullivan, 1988, Cancelier, 2009). Em moderada quantidade e com boa capacidade de antioxidantes, os radicais livres, que são continuamente gerados dentro do organismo, são essenciais para o metabolismo das células aeróbicas e crescimento fetal, mas são tóxicos quando produzidos em excesso, resultando no ataque de todas as classes de macromoléculas biológicas, polissacarídeos, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (Halliwell, 1994).

Recentes estudos sugerem que um delicado balanço redox deve existir para que haja um adequado crescimento e desenvolvimento (Dennergy, 2004). Foi demonstrado estresse oxidativo em gestações com retardo de crescimento intrauterino; crescimento fetal restrito é freqüentemente complicado pela hipóxia intrauterina acompanhada do mau fluxo sanguíneo para o feto (Thaete et al., 2004). Restrições crônicas no fluxo sanguíneo uterino alavancam respostas adaptativas à hipóxia tanto pela placenta, quanto pelo feto. A hipóxia intrauterina pode induzir a geração de radicais livres e estresse oxidativo fetal. Assim foi sugerida a concentração de isoprostano no líquido amniótico como um fiel marcador de crescimento fetal retardado devido ao estresse oxidativo (Longini et al., 2005). Também foi demonstrada uma correlação inversa entre idade gestacional e níveis plasmáticos de isoprostano, ao observar-se que F2-isoprostanos eram significativamente mais altos em recém-nascidos pré-termos do que em recém-nascidos a termo (Comporti et al., 2004). Utilizando-se o 8-isoprostano como marcador de estresse oxidativo, tentou-se verificar a fonte de EROs em partos prematuros. Os níveis deste marcador no soro da artéria umbilical foram menores do que no soro proveniente da veia umbilical; assim, concluiu-se que o feto prematuro metaboliza esses radicais mais do que produz, ou seja, a maior fonte das EROs não seria de mas estaria relacionada a dano oxidativo em tecidos materno- placentários (Barry et al., 2006).

A placenta tem sido identificada como uma importante fonte de peróxido lipídeos devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (Mutlu, 1998; Klingler, 2003). A placenta também é fonte de enzimas antioxidantes, incluindo SOD, CAT, GPx, glutathiona, vit C e vit E, que controlam a peroxidação lipídica durante as gestações não complicadas e são suficientes para o controle da

lipoperoxidação em gestações não complicadas. (Gitto, 2002; Mueller, 2005). O ânion superóxido é sabidamente gerado na placenta e tem um importante papel na peroxidação lipídica NADPH-dependente (Kulkarni et al., 1987; Klimek et al., 1990). Foi demonstrado que a secreção do isoprostano pela placenta é oito vezes maior no sítio materno da placenta do que no sítio fetal *in vitro*. Porém, sabe-se que na ausência de inervação autônoma o fluxo sanguíneo nos vasos da parte fetal da placenta pode ser controlado pelo gradiente pressórico fetal, pelos fatores humorais ou pelos agentes autócrinos e/ou parácrinos produzidos no próprio sistema vascular fetal (Myatt, 1998). Muitos estudos têm demonstrado um aumento da peroxidação lipídica em placenta de gestações complicadas, como no caso de placentas de mulheres com pré-eclâmpsia (Poranem, 1998).

Para que a placenta não seja danificada pelo feto existe o líquido amniótico, que desempenha, além desta, um grande número de funções que são essenciais para o adequado crescimento e desenvolvimento fetal. Líquido amniótico é o fluido que envolve o feto logo após poucas semanas de gestação. Durante grande parte da gestação o líquido amniótico é derivado quase que exclusivamente do feto. Os rins do feto são a maior fonte de líquido que entra no saco amniótico. O débito urinário na 20ª semana é de 5 ml/h (120 ml/dia), chegando a 51 ml/h (1.224 ml/dia) no termo (Brace, 1997). Foi recentemente constatado um aumento da produção de oxidantes e da atividade dos antioxidantes no líquido amniótico de gestantes que foram submetidas à cesariana por sofrimento fetal (Lurie et al., 2007). A importância dos danos induzidos por EROs para o epitélio amniótico e o colágeno corioamniótico tornaram-se mais claros com também recentes dados demonstrando que o F2-isoprostano está significativamente aumentado em gestações com ruptura prematura de membrana em relação às normais (Longini et al., 2007).

A maioria dos estudos relacionando estresse oxidativo e complicações na gravidez têm sido focados em parâmetros maternos; poucos estudos foram realizados com placenta, feto e/ou sangue do cordão umbilical (Hilmi et al., 2003). Uma atenção limitada também tem sido dada às gestações prolongadas, sendo que a grande maioria dos trabalhos relacionados a idade gestacional dá preferência ao estudo da prematuridade (Buhimschi et al., 2003; Comporti et al., 2004). Considerando a influência dos radicais livres sobre os processos obstétricos, e considerando a tendência mundial da interrupção das gestações prolongadas a partir da 41^a semana (Crowlei, 2000; Sanchez-Ramos et al., 2003), este estudo buscou avaliar a participação das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de origem fetal, materna e placentária nas gestações que perduraram por 41 semanas ou mais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Comparar parâmetros de estresse oxidativo entre gestação humana a termo (39 semanas) e prolongada (41 semanas) em plasma do cordão umbilical, líquido amniótico e placenta.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar os níveis de dano oxidativo em proteínas e lipídeos em placenta e plasma obtido da veia umbilical como fonte de contribuição materno-placentária;

2. Determinar os níveis de dano oxidativo em proteínas e lipídeos no líquido amniótico e no plasma obtido de sangue da artéria umbilical como fonte de contribuição fetal;

3. Determinar os níveis de nitrito no líquido amniótico e no plasma de artéria umbilical como fonte de contribuição fetal;

4. Determinar os níveis de nitrito na veia umbilical como fonte de contribuição materno-placentária.

3 ARTIGO

Decreased oxidative stress biomarkers in postterm caesarean delivery

Orlando T. Júnior^a, Fabricia Petronilho^b, Larissa Cosntantino^b, Felipe Dal-Pizzol^b and Pedro R. T. Romão^{a*}

^aLaboratório de Imunologia e Mutagênese, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil;

^bLaboratório de Fisiopatologia Experimental, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil;

***Corresponding author:**

Laboratório de Imunologia e Mutagênese, PPGCS, UNASAU, Universidade do Extremo Sul Catarinense

Av. Universitária, 1105 - Bairro Universitário - C.P. 3167

CEP: 88806-000, SC, Brazil.

Phone: 55 48 3431 2758

Fax: 55 48 3431 2736

E-mail: prtorres@usp.br

Introduction

Pregnancy represents a complex state in which the mother and the fetus may contribute to the production of free radicals reducing the antioxidants defense with production of oxidative stress, which may cause damages to biological macromolecules such polysaccharides, nucleic acid, proteins and lipids (Halliwell, 1994; Raijmakers et al., 2004). Oxidative stress are implicated in several neonatal conditions such as retinopathy of prematurity, cerebral palsy, necrotizing enterocolitis, intracranial hemorrhage and hypoxic ischemic encephalopathy (Drury et al., 1998; Buhimschi et al., 2003; Saugstad, 2005). Furthermore, it has been also involved in many problems associated to pregnancy including embryopathy from diabetes, preterm premature rupture of membranes and preeclâmpsia (Sakamaki et al., 1999; Buhimschi et al., 2000; Longini et al., 2007, Bernardi et al., 2008).

Parturition is associated with an influx of inflammatory cells into to uterus and increased secretion of inflammatory mediators, which might induce an increase in the production of oxygen and nitrogen-derived oxidants (Fainaru et al., 2002; Young et al., 2002). Furthermore, free radicals produced by those cells increase the expression of metalloproteinases in human fetus, which could be associated with preterm labour and preterm prelabour rupture of the membranes (Buhimschi et al., 2000). In addition, during vaginal delivery, the oxygenation of mother and child tissues oscillates during labor which also contributes to free radicals generation (Stipek et al., 1995).

Newborns are very susceptible to oxidative stress mainly due to increased production of free radicals at birth, and also because the immaturity and lower activity of antioxidant defence systems (Buonocore & Perrone, 2006). The association of

oxidative stress in newborn with the mode of delivery remains controversial. Some studies have found increased oxidative stress in vaginal delivery compared to caesarean section (Mehmetoglu et al., 2002; Raijmakers et al., 2003). On the contrary, oxidative stress in foetal circulation has not been found to be dependent on the mode of delivery (Fogel et al., 2005).

Postterm pregnancy is associated with increased risks to both mother (cesarean delivery, severe perineal injury, postpartum hemorrhage, labor abnormalities, shoulder dystocia, and brachial plexus injuries) and fetus (stillbirth, macrosomia, birth injury, meconium and meconium aspiration syndrome, oligohydramnios) (Norwitz et al., 2007). The failure of the cervix to ripen on time is not well understood (Kelly, 2002; Stygar et al., 2002). Normal cervical ripening is thought to be controlled by a variety of hormonal changes, while abnormal premature ripening is thought to be associated with infection and inflammatory events (Maul et al., 2006). Väisänen-Tommiska and colleagues (2004) have demonstrated that nitric oxide levels in cervical fluid of women delivering at term were 4.5 times higher than that in women going beyond term, suggesting that the reduction of cervical nitric oxide may contribute to prolonged pregnancy. In addition, Sahlin and colleagues (2008) have proposed that the impaired leukocyte influx, decreased production of IL-8 and matrix metalloproteinase-9 in postterm women prostaglandins non-responders, could be one explanation of the failed ripening of the cervix.

Although several studies have investigated the influence of labor and mode of delivery on oxidative stress, there are not studies comparing the degree of oxidative stress between fullterm and postterm elective caesarean section. In this study we evaluated lipid peroxidation and protein carbonilation levels in placenta, amniotic fluid and plasma from umbilical artery and vein, and also nitrite levels in amniotic fluid and

plasma from umbilical artery and vein to better understand the contribution of both mother and child compartments on oxidative stress generated at the end of later pregnancy.

Material and methods

Population

To this study we invited every woman in the third trimester of their pregnancy that had addmitted to the Araranguá Hospital (HRA) in Araranguá, South of Santa Catarina, Brazil (n=37), between February and September 2008. The invitation included a discussion on the informed consent and details about the research, and voluntary written consent was obtained from the subjects enrolled. The study was approved by Ethics Committees from the University of Southern Santa Catarina and from the HRA. The inclusion criteria were pregnant women in good general health, admitted at term and postterm for an elective cesarean delivery, non-smokers, without labor, rupture of membranes, intrauterine growth retarded, diabetes mellitus, preeclâmpsia, eclâmpsia, HIV infection and hypertension. This study included 19 women who went elective cesarean at term (gestational age \leq 39 weeks; fullterm delivery) and 18 who went elective cesarean beyond term (gestational age \geq 41 weeks; postterm delivery). The gestational age was assessed based on the earliest ultrasonographic examination (before 22 weeks of pregnancy).

Medical history and obstetrical information was obtained from hospital records as well interviewing the patients before cesarean delivery. The neonatal

characteristics recorded were sex, birth weight, gestational age at birth and Apgar score at 1 and 5 min.

Venous and arterial umbilical blood collection

During the delivery of the infant, the umbilical cord was double clamped close to the infant and close to the placenta. Immediately after placenta delivery, four mL of heparinized blood from umbilical arteries (transporting blood from the fetus to the placenta) and blood from umbilical vein (transporting blood from the placenta to the fetus) were collected and centrifuged for 10 min at 3000 rpm and plasma were removed, frozen at liquid nitrogen, and stored at – 80°C until assayed.

Amniotic fluid and Placental tissue preparation

The amniotic fluid was collected by puncture of lower uterine segment immediately before incision and exposure of the uterine cavity, and centrifuged at 1000g for 10 minutes at 4°C to remove cellular and particulate matter. Amniotic fluid was centrifuged for 10 minutes at 4°C to remove cellular and particulate matter and then aliquots were stored at - 80°C until biochemical analysis. Placental villous tissue was collected immediately after delivery from the central region of the placenta and then immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at - 80°C until assayed.

Thiobarbituric acid-reactive species determination

The formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) was measured as an index of lipid peroxidation as previously described (Draper and Hadley, 1990). Briefly, samples of amniotic fluid and homogenate placental tissue, as well umbilical artery plasma and umbilical vein plasma obtained from elective cesarean at term and postterm delivery were mixed with 1 ml of trichloroacetic acid 10% and 1 ml of thiobarbituric acid 0.67% and then heated in a boiling water bath for 15 min. TBARS were determined by the absorbance at 535 nm. Results are expressed as malondialdehyde (MDA) equivalents (nmol/mg of protein).

Protein Carbonyls

The oxidative damage to proteins was assessed in the same samples described above by the determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine as previously described (Levine et al., 1990). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in dinitrophenylhydrazine and the absorbance read at 370 nm

Protein estimation

Protein was estimated in all samples assayed according to the method of Lowry et al. (1951). Bovine serum albumin was used as standard.

Nitrite plus nitrate determination

The stable end products of nitric oxide were measured in amniotic fluid, and plasma from umbilical cord obtained from elective cesarean at term and postterm delivery using a colorimetric method based on the reduction of nitrate by vanadium (III) combined with detection by the acidic Griess reaction (Miranda et al., 2001). Nitrite levels were determined colorimetrically at 550 nm with a Universal microplate reader and a sodium nitrite standard curve.

Statistical analysis

Data are reported as means \pm S.E.M. Differences among experimental groups were determined by student's t-test. P-values <0.05 were considered to indicate statistical significance. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Science software (SPSS, Chicado, IL).

Results

There were no significant differences between the groups studied in terms of birth weight, parity and Apgar score at 1 min and 5 min. All infants in both groups were appropriate for gestational age. Male to female ratio was 3.75 in the fullterm cesarean delivery group and 1.0 in the elective postterm cesarean delivery group (Table 1).

No differences in lipid peroxidation were achieved in mother or child compartment between fullterm and postterm elective cesarean delivery (Figure 1). However, in both groups malondialdehyde concentration was higher in amniotic fluid compared to those values found in placenta, umbilical artery and umbilical vein cord plasma.

The carbonylated protein was significantly decreased in placenta and plasma from umbilical vein of women who had postterm cesarean delivery (Figure 2). Inversely, in fluid amniotic carbonylated proteins were found significantly increased in postterm compared to fullterm cesarean group (Figure 2). In both groups protein carbonyls was higher in placenta compared to those values found in amniotic fluid, umbilical artery and umbilical vein cord plasma. These results suggest that in the absence of distressed conditions, the maternal contribution to oxidant stress during postterm cesarean delivery could be minimal.

Interestingly, nitrite levels, a nitric oxide metabolite, were significantly reduced in amniotic fluid and also in umbilical artery and umbilical vein cord of postterm elective cesarean group compared to fullterm delivery control group (Figure 3). Thus suggesting that postterm parturition could be associated with a significant reduction in nitric oxide production in both fetal and maternal compartments.

Discussion

Oxidative stress arises when there is an excessive nitrogen (RNI) or oxygen reactive species (ROS) generation in the presence of low antioxidant levels. ROS have both physiological and pathological roles in the female reproductive tract. They are involved in various physiological reproductive functions such as oocyte maturation, ovarian steroidogenesis, corpus luteal function and luteolysis. It plays a role during pregnancy and normal parturition and in initiation of preterm labour, intrauterine growth retardation, preeclâmpsia and gestational diabetes mellitus (Myatt & Cui, 2004).

Pregnancy is a state of high-energy demand and an increased oxygen requirement, which the oxidative stress arising mainly from the increased metabolic activity in placenta and the reduced antioxidant buffer capacity. Moreover, spontaneous vaginal delivery requires strong and coordinated contractions of the uterus, which in some cases may cause reperfusion-ischaemia events, resulting in the generation of ROS (Gitto et al., 2002; Myatt & Cui, 2004; Raijmakers et al., 2004). In excess, free-radicals can attack the polyunsaturated fatty acids of membrane lipids, causing the disorganization of cell structure and function. Lipid peroxidation results in generation of malondialdehyde (MDA), which is used as a biological marker of oxidative stress (Winterbourn et al., 2000). ROS can react directly or indirectly with the proteins, thus protein carbonylation is widely used biomarker for oxidative damage to proteins (Dalle-Donne et al., 2006).

In our study comparing the oxidative stress markers between groups of fullterm and postterm elective cesarean delivery, we found that the Apgar values at 1 and 5 min were similar between the groups of newborns, reflecting a good predictor

of neonatal outcome between the groups (Casey et al., 2001). We did not observe significant difference in relation to lipid peroxidation, but we found that in both groups of deliveries, malondialdehyde concentration was higher in amniotic fluid compared to those values found in placenta, umbilical artery and umbilical vein plasma. This difference could be related to differential ratios of polyunsaturated fatty acid peroxidation and arachidonic acid metabolism between the tissues. Similar MDA concentration in maternal and fetal compartments between the groups of fullterm and postterm cesarean delivery may indicate the absence of pre-existing oxidative status. In this context, Lurie and colleagues (2007) have demonstrated that higher levels of MDA were found in amniotic fluid (about 3.6 order of magnitude) and in umbilical artery cord plasma (order of magnitude about 1.7) collected from mothers who had delivered by emergency cesarean compared with those submitted to elective cesarean section.

In relation to protein oxidation, we found that the protein carbonyl levels in maternal and placental tissues were lower in postterm delivery compared with fullterm cesarean delivery group. However, in fluid amniotic (fetal compartment) carbonylated proteins were found significantly increased in postterm cesarean group. This data suggested that in the absence of distressed conditions, the maternal contribution to protein oxidation could be minimal during postterm cesarean delivery in contrast to preterm vaginal delivery. Previous study has suggested that elective cesarean section is advantageous with respect to oxidative stress to newborn (Inanc et al., 2005), besides the lower concentration of antioxidants (Rogers et al., 2000; Baydas et al., 2002). The fetal concentration of lipid soluble antioxidants is probably limited by placental transport proteins, and these antioxidants are found in lower

concentrations in fetal than maternal circulation (Baydas et al., 2002; Sanchez-Vera, 2004).

NO is a potent vasodilator in the placental vasculature that maintains the basal vascular tone, attenuates the action of vasoconstrictors (Myatt et al., 1991) and seems to be involved in ripening of the cervix (Väisänen-Tommiska et al., 2004). Our results showed for the first time that nitric oxide metabolites were significantly reduced in amniotic fluid and also in umbilical artery and umbilical vein cord of postterm elective cesarean group compared to fullterm delivery control group. Thus suggesting that postterm parturition could be associated with a significant reduction in nitric oxide production in both fetal and maternal compartments. It has been demonstrated that higher levels of NO were found in amniotic fluid of women in labor than in non-laboring at term patients (Marinoni et al., 2000).

Conflicting results have been found in relation with the way of delivery and the oxidative stress induction (Raijmakers et al., 2003; Hracsko et al., 2007; Paamoni-Keren et al., 2007). In our work we observed that lower oxidative stress from mother was found in postterm compared to fullterm cesarean section delivery group. To explain this, we suppose that the lower levels of oxidant reactive species, maybe associated with efficient antioxidant defense may contribute to prolonged pregnancy even in the presence of decreased nitric oxide production and consequently the inhibition of quiescence that limits the active labor.

Acknowledgements

This research was supported by grants from Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

Baydas G, Karatas F, Gursu MF, Bozkurt HA, Ilhan N, Yasar A, Canatan H. Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Arch Med Res* 33:276-280, 2002.

Bernardi F, Guolo F, Bortolin T, Petronilho F, Dal-Pizzol F. Oxidative stress and inflammatory markers in normal pregnancy and preeclâmpsia. *J Obstet Gynaecol Res.* 34:948-51, 2008

Buhimschi IA, Kramer WB, Buhimschi CS, Thompson LP, Weiner CP. Reduction-oxidation (redox) state regulation of matrix metalloproteinase activity in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 182:458-464, 2000.

Buhimschi IA, Buhimschi CS, Pupkin M, Weiner CP. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 189:181-8, 2003.

Buhimschi IA, Buhimschi CS, Weiner CP. Protective effect of N-acetylcysteine against fetal death and preterm labor induced by maternal inflammation. *Am J Obstet Gynecol.* 188:203-8, 2003

Casey BM, McIntire DD, Leveno KJ. The continuing value of the Apgar score for the assessment of newborn infants. *N Engl J Med* 344:467-71, 2001.

Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med.* 10:389-406, 2006.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186, 421–431, 1990.

Drury JA, Nycyk JA, Baines M, Cooke RW. Does total antioxidant status relate to outcome in v\ery preterm infants? *Med Sci Monit* 94:197-201, 1998.

Fainaru O, Almog B, Pinchuk I, Kupfermanc MJ, Lichtenberg D, Many A. Active labour is associated with increased oxidisibility of serum lipids ex vivo. BJOG. 109:938-41, 2002.

Fogel I, Pinchuk I, Kupfermanc MJ, Lichtenberg D, Fainaru O. Oxidative stress in the fetal circulation does not depend on mode of delivery. Am J Obstet Gynecol 193:241-6, 2005.

Gitto E, Reiter RJ, Karbownik M, Tan DX, Gitto P, Barberi S, Barberi I. Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal period. Biol Neonate. 81:146-57, 2002.

Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? J. Lab. Clin. Med. 119, 598-620, 1992.

Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet 344:721-24, 1994.

Hracsko Z, Safar Z, Orvos H, Novak Z, Pal A, Varga IS. Evaluation of oxidative stress markers after vaginal delivery or Caesarean section. In Vivo. 21:703-6, 2007

Inanc F, Kilinc M, Kiran G, Guven A, Kurutas EB, Cikim IG, Akyol O. Relationship between oxidative stress in cord blood and route of delivery. Fetal Diagn Ther. 20:450-3, 2005.

Kelly RW. Inflammatory mediators and cervical ripening. J Reprod Immunol. 57:217-24, 2002.

Levine RL, Garland D, Oliver CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 186, 464-478, 1990.

Longini M, Perrone S, Vezzosi P, Marzocchi B, Kenanidis A, Centini G, Rosignoli L, Buonocore G. Association between oxidative stress in pregnancy and preterm premature rupture of membranes. Clin Biochem. 40:793-7, 2007.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.

Lurie S, Matas Z, Boaz M, Fux A, Golan A, Sadan O. Different degrees of fetal oxidative stress in elective and emergent cesarean section. *Neonatology* 92:111-5, 2007.

Maul H, Mackay L, Garfield RE. Cervical ripening: biochemical, molecular, and clinical considerations. *Clin Obstet Gynecol.* 49:551-63, 2006.

Marinoni E, Di Iorio R, Villaccio B, Alberini A, Rota F, Cosmi EV. Amniotic fluid nitric oxide metabolite levels and nitric oxide synthase localization in feto-placental tissues are modified in association with human labor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 89:47-54, 2000.

Mehmetoglu I, Kart A, Caglayan O, Capar M, Gokce R. Oxidative stress in mothers and their newborns in different types of labour. *Turk J Med Sci* 32:427-9, 2002.

Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.* 5:62-71, 2001.

Myatt L, Brewer AS, Langdon G, Brockman DE Attenuation of the vasoconstrictor effects of thromboxane and endothelin by nitric oxide in the human fetal-placental circulation. *Am J Obstet Gynecol.* 166:224-30, 1992.

Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 122:369-82, 2004

Norwitz ER, Snegovskikh VV, Caughey AB. Prolonged pregnancy: when should we intervene? *Clin Obstet Gynecol.* 50:547-57, 2007.

Novak Z, Varga SI, Kovács L, Pál A, Pataki L, Matkovics B. The effects of Oradexone and Ambroxol pretreatment of the oxidative sensitivity of the red blood cells in preterm infants. *Clin Chim Acta* 182:241-5, 1989.

Paamoni-Keren O, Silberstein T, Burg A, Raz I, Mazor M, Saphier O, Weintraub AY. Oxidative stress as determined by glutathione (GSH) concentrations in venous cord blood in elective cesarean delivery versus uncomplicated vaginal delivery. *Arch Gynecol Obstet.* 276:43-6, 2007

Raijmakers MT, Roes EM, Steegers EA, van der Wildt B, Peters WH. Umbilical glutathione levels are higher after vaginal birth than after cesarean section. *J Perinat Med* 31:520-2, 2003

Raijmakers MTM, Dechend R, Poston L. Oxidative stress and preeclampsia: rationale for antioxidant clinical trials. *Hypertension* 44:374-380, 2004

Rogers S, Witz G, Anwar M, Hiatt M, Hegyi T. Antioxidant capacity and oxygen radical diseases in the preterm newborn. *Arch Pediatr Adolesc Med* 154:544-548, 2000.

Sahlin L, Stjernholm-Vladic Y, Roos N, Masironi B, Ekman-Ordeberg G. Impaired leukocyte influx in cervix of postterm women not responding to prostaglandin priming. *Reprod Biol Endocrinol.* 2:6:36, 2008.

Sakamaki H, Akazawa S, Ishibashi M, Izumino K, Takino H, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Goto S, Urata Y, Kondo T, Nagataki S. Significance of glutathione-dependent antioxidant system in diabetes-induced embryonic malformations. *Diabetes.* 48:1138-44, 1999.

Sánchez-Vera I, Bonet B, Viana M, Sanz C. Relationship between alpha-tocopherol content in the different lipoprotein fractions in term pregnant women and in umbilical cord blood. *Ann Nutr Metab.* 48:146-50, 2004

Saugstad OD. Oxidative stress in the newborn – a 30-year perspective. *Biol Neonate* 88:228-236, 2005.

Stipek S, Mechurova A, Crkovska J, Zima T, Platenik J. Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in umbilical and maternal blood. *Biochem Mol Biol Int.* 35:705-11, 1995.

Stygar D, Wang H, Vladic YS, Ekman G, Eriksson H, Sahlin L. Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix. *Biol Reprod.* 67:889-94, 2002.

Väisänen-Tommiska M, Nuutila M, Ylikorkala O. Cervical nitric oxide release in women postterm. *Obstet Gynecol.* 103:657-62, 2004

Winterbourn CC, Chan T, Buss H, Inder TE, Mogridge N, Darlow BA. Protein carbonyls and lipid peroxidation products as oxidation markers in preterm infant plasma: associations with chronic lung disease and retinopathy and effects of selenium supplementation. *Pediatr Res* 48:84-90, 2000.

Young A, Thomson AJ, Ledingham M, Jordan F, Greer IA, Norman JE. Immunolocalization of proinflammatory cytokines in myometrium, cervix, and fetal membranes during human parturition at term. *Biol Reprod.* 66:445-9, 2002

Conflict of interest Statements

None disclosures

Table 1 – Maternal and fetal characteristics of the study population. Data are shown as means \pm S.E.M. Differences between groups were determined by student's t-test. $P < 0.05$ were considered to indicate statistical significance.

Figure 1 – Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels, expressed as malondialdehyde (MDA) equivalents (nmol/mg protein) in amniotic fluid, placental tissue, umbilical artery plasma and umbilical vein plasma obtained from elective cesarean at term ($n=18$) and postterm delivery ($n=18$). Data are shown as means \pm S.E.M. Differences between groups were determined by student's t-test. $P < 0.05$ were considered to indicate statistical significance.

Figure 2 – Protein carbonyl content in amniotic fluid, placental tissue, umbilical artery plasma and umbilical vein plasma obtained from elective cesarean at term ($n=18$) and postterm delivery ($n=18$). Data are shown as means \pm S.E.M. Differences between groups were determined by student's t-test. P-values < 0.05 were considered to indicate statistical significance.

Figure 3 – Nitrite plus nitrate levels in amniotic fluid, umbilical artery plasma and umbilical vein plasma obtained from elective cesarean at term ($n=18$) and postterm delivery ($n=18$) using a colorimetric method based on the reduction of nitrate by vanadium (III) combined with detection by the acidic Griess reaction. Data are shown as means \pm S.E.M. Differences between groups were determined by student's t-test. P-values < 0.05 were considered to indicate statistical significance.

Variable	Full-term n= 19	Posttten n=18	P value
Maternal age (years)	27.7 ± 6.1	21.9 ± 4.2	< 0.05 ^a
Gestational age (ws)	38.5 ± 0.37	41.5 ± 0.43	< 0.05 ^a
Birth weight (g)	3,405 ± 412	3,632 ± 358	0.08
Apgar 1 min	8.1 ± 0.6	8.9 ± 0.47	0.97
Apgar 5 min	8.1 ± 0.7	8.9 ± 0.23	0.98
Parity	1.55 ± 1.1	2.15 ± 0.7	0.06

^a Student's t-test

Table 1

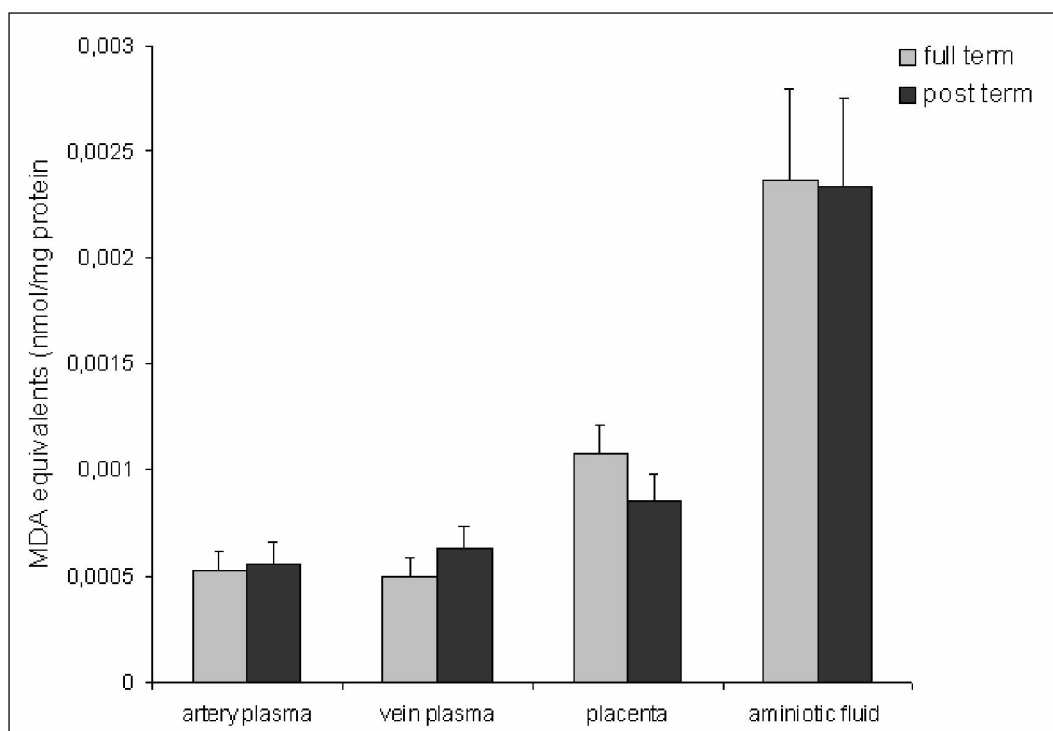
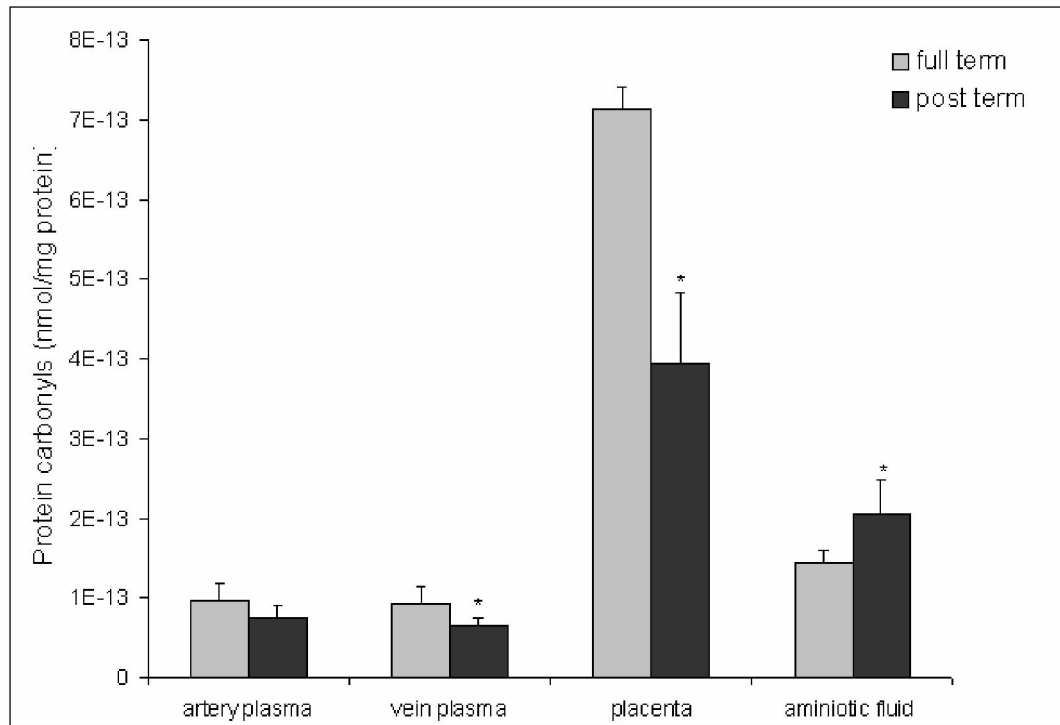
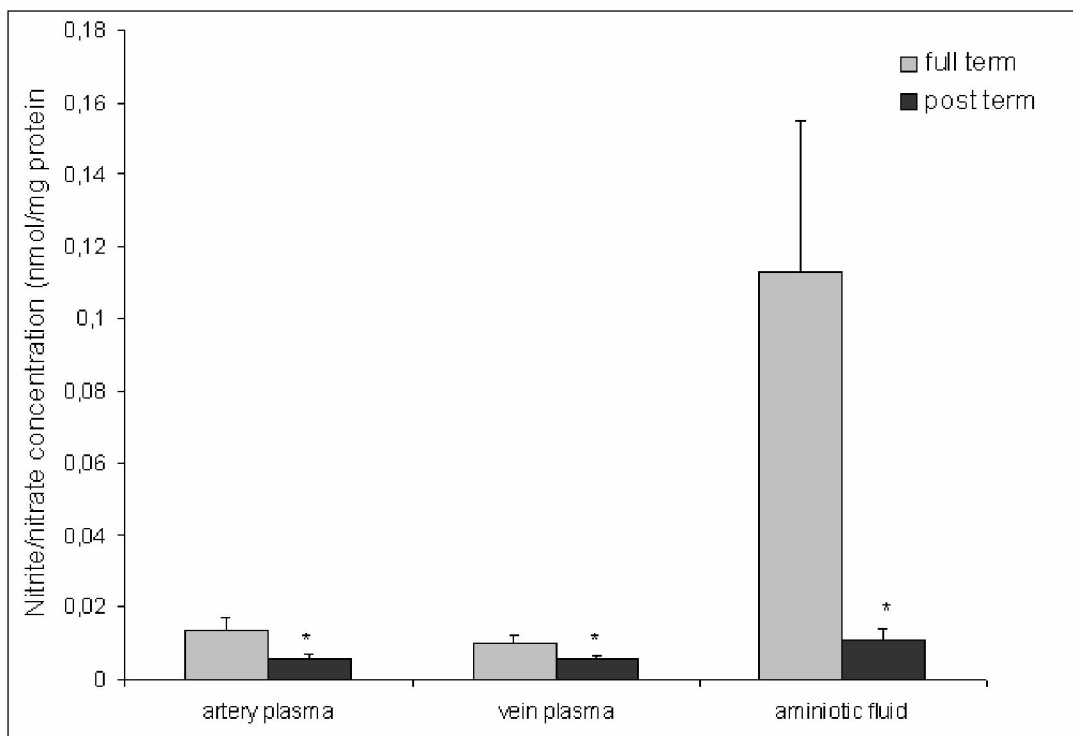


Figure 1

**Figure 2****Figure 3**

4 DISCUSSÃO

O presente estudo realizou pela primeira vez uma comparação de parâmetros de estresse oxidativo entre gestações humanas a termo (39 semanas) e prolongadas (41 semanas). Para isto, avaliou-se a oxidação de proteínas e lipídeos, bem como a produção de óxido nítrico em diferentes compartimentos fetais e maternos.

Foram avaliados dano oxidativo e níveis de nitrito em veia umbilical, demonstrando-se indiretamente o compartimento materno-placentário, pois as trocas transplacentárias oriundas da mãe são drenadas diretamente para a veia umbilical. A placenta é um anexo fetal de relação direta com a parte materna e sua formação e função decorrem da profunda invasão do trofoblasto na parede uterina, que modifica a estrutura de seus vasos tornando-os mais complacentes e menos resistentes, possibilitando assim um maior aporte de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto.

Em contrapartida, a aferição do estresse oxidativo na artéria umbilical refletiu a condição dos tecidos fetais intraútero, já que o sangue que flui por esta via retorna diretamente do feto para placenta. É sabido que a maior parte do líquido amniótico no terceiro trimestre provém primariamente da urina fetal e secundariamente das secreções do pulmão fetal; assim, tanto o líquido amniótico, como a artéria umbilical, foram considerados como uma potencial fonte de radicais livres de origem fetal.

Quando comparadas as fontes oxidativas materna e fetal através da dosagem dos danos proteico e lipídico e dos níveis de nitrito em plasma arterial e venoso do cordão umbilical, não se observou diferença significativa entre as gestações a termo

e as gestações prolongadas. Desta forma, pode-se concluir que não houve predomínio da contribuição da mãe ou do feto em relação à geração de estresse oxidativo nos grupos analisados.

Nos marcadores de estresse oxidativo entre mulheres que tiveram cesariana eletiva a termo e pós-termo, não foi observada diferença significativamente estatística em relação à lipoperoxidação, mas foi encontrado que em ambos os grupos as concentrações de MDA foram mais altas no líquido amniótico, quando comparadas aos valores encontrados em placenta, veia e artéria umbilicais.

, Este estudo verificou que as gestações prolongadas apresentaram dosagens de carbonilação proteica menores no compartimento materno, representado por tecidos placentários e plasma da veia umbilical; já no líquido amniótico houve um aumento e na artéria umbilical o dano proteico permaneceu inalterado, em relação às gestações a termo. Sabe-se que o dano proteico está aumentado devido ao próprio estado gravídico e se intensifica em condições adversas da gestação, entre elas a pré-eclâmpsia (Zusterzee et al., 2001), o trabalho de parto prematuro e a rotura prematura de membranas (Woods., 2001). Estudos associando gravidez prolongada com carbonilação proteica não foram encontrados.

Um estudo comparativo dosando plasma de veia umbilical em parto vaginal pré-termo e a termo relacionou o aumento da idade gestacional com o aumento da carbonilação proteica e a paradoxal diminuição da peroxidação lipídica (Mocatta et al., 2004). É importante ressaltar que o estudo em questão se refere ao outro extremo da gestação, que é a prematuridade, enquanto que o presente trabalho teve seu foco nas gestações prolongadas. A literatura é controversa quanto ao estresse oxidativo materno estar aumentado no último trimestre de gravidez. Alguns autores observaram um aumento maior no segundo trimestre (Little & Gladen, 1999),

outros no terceiro (Ishihara et al., 1978) e outros verificaram aumento do estresse oxidativo com o decorrer da gestação (Wickens, 1981). Embora muitos estudos tenham investigado a influência do parto e do modo de parto no estresse oxidativo, não se encontraram estudos comparando o grau de estresse oxidativo entre cesariana eletiva de gestação a termo e de gestação prolongada.

Fisiologicamente toda a gestação é preparada para o parto. Além disso, sabe-se que a rotura prematura de membranas (RUPREMA) é um prenúncio do parto e trabalhos a têm associado com um aumento do estresse oxidativo na cavidade amniótica, sendo causada pelo dano da bolsa corioamniótica, em consequência do enfraquecimento do colágeno, que pode ser causado pelas EROs (Longini et al., 2007). Alguns estudos têm suportado essa hipótese, associando condições clínicas conhecidas por produzir EROs ou reduzir a proteção antioxidante. Estudos clínicos e *in vitro* que utilizaram amostras de membrana expostas a EROs demonstraram alterações teciduais semelhantes àquelas encontradas na RUPREMA do pré-termo (Woods, 2001). Os dados deste trabalho apontam um dano proteico aumentado em gestações prolongadas e uma concentração de MDA, ainda que sem diferença estatística em relação à idade gestacional, maior no líquido amniótico que em qualquer outra estrutura analisada.

Um importante achado deste estudo foi a diminuição dos níveis de nitrito nas gestações prolongadas, em todas as estruturas analisadas. O NO é gerado no útero e tem como uma das suas principais funções a inibição da contratilidade uterina. Sua redução e/ou menor resposta na gestação a termo poderia levar a um aumento da contratilidade uterina e ao início do trabalho de parto (Yallampalli, 1993). Fatores como gestação, parto, hormônios esteróides e prostaglandinas modulam a geração e o efeito do NO no útero (Yallampalli, 1998). O NO também desempenha um papel

nas mudanças fisiológicas do avanço da gravidez, além de poder estar relacionado com a fisiopatologia da pré-eclâmpsia e do retardo de crescimento intrauterino (Sooranna et al., 1995).

Considerações referentes à gestação prolongada estão na maioria das vezes ligadas a maturação do canal cervical e sua dilatação para o momento do parto. Em análise de fluido cervical foi detectado Nox em 46% de mulheres não grávidas, 68% de mulheres com gestação do primeiro trimestre e em 82% de gestantes com gestação do último trimestre (Vaisanen-Tommiska et al., 2003). Em nova pesquisa, os mesmos autores ainda concluíram que, apesar dos altos níveis dos metabólitos de óxido nítrico em gestações tardias versus gestações do primeiro trimestre, e da abundante evidência da possibilidade do envolvimento do óxido nítrico na dilatação cervical, as maiores idades gestacionais das amostras do grupo das gestações pós-termo deveriam apresentar níveis mais altos de metabólitos de óxido nítrico, quando comparado ao grupo das gestações a termo. Em contrapartida, o trabalho encontrou uma redução dos metabólitos do óxido nítrico nas gestações pós-termo (Vaisanen-Tommiska et al., 2004). Essas mulheres tiveram mais dificuldade na progressão e na duração do parto do que as mulheres com alta liberação de NO. As que tinham maior liberação de NO cervical também tinham o colo uterino mais maduro. A liberação de NO no colo foi induzida por contrações uterinas (3,5 vezes) (Vaisanen-Tommiska et al., 2003).

Este estudo observou uma expressiva diminuição dos níveis de nitrito no líquido amniótico. Era de se esperar que o feto da gestação prolongada estivesse excretando e/ou secretando menos NO, pois o feto é o maior responsável pela produção do líquido amniótico, como já discutido anteriormente. Na análise de plasma em artéria umbilical de mulheres com gestação prolongada realmente foi

observada uma diminuição do nitrito em relação à gestação a termo. Contudo, a grande diferença dos níveis de nitrito no líquido amniótico (mais de 100 vezes superior em relação ao plasma da artéria umbilical) sugere a possibilidade de outro fator estar colaborando para o aumento de NO no líquido amniótico. Alguns estudos têm demonstrado que membranas fetais de humanos estão envolvidas na regulação da contratilidade miométrial pela ação de várias substâncias produzidas pelas membranas amniótica e decídua-coriônica, atuando de forma autócrina e/ou parácrina (Challis et al., 1991). Estudo *in vitro* evidenciou que o lipopolissacarídeo (LPS) foi capaz de induzir iNOS, assim como fator de ativação plaquetária (PAF) foi capaz de estimular a produção de NO independentemente da indução de iNOS em membranas fetais humanas intactas (GUNTER et al., 2004).

Marinoni (2000) refere um aumento significativo dos níveis de NO no líquido amniótico tanto em gestantes a termo quanto pré-termo que estavam em trabalho de parto, em comparação com as que não estavam em trabalho de parto. O mesmo aumento não foi encontrado em plasma e urina materna ou plasma do cordão umbilical. O autor reconhece que o aumento dos níveis de NO no líquido amniótico foi um achado paradoxal e pontua que o aumento se justifica em virtude da expressão da iNOS pelas membranas fetais durante o trabalho de parto; ainda conclui que diferentes isoformas de NOS podem ter diferentes funções no decorrer da gravidez: a isoforma nNOS mantém o útero quiescente; a eNOS regula a circulação útero-placentária e a circulação fetal; e a iNOS contribui para a maturação cervical e/ou dilatação. Foi observado que a ocitocina, importante uterotônico liberado no trabalho de parto, proporciona um aumento na liberação de nitrato pelas membranas fetais de gestações a termo, assim como aumenta a expressão uterina de iNOS (Ticconi et al., 2004).

Concentrações de nitrito diminuídas na veia umbilical de gestações prolongadas, também observadas neste estudo, constituem um achado que está em concordância com outros encontrados na literatura, que têm descrito um decréscimo na liberação do NO no final da gestação, indiretamente demonstrado pela redução dos níveis da citrulina sérica em mulheres do termo da gestação até o início do trabalho de parto (Facchinetti et al., 1998), sendo também observado em animais um significativo decréscimo na atividade de NOS de decídua no último dia de gravidez (Sladek et al., 1993). Como já comentado anteriormente, achados da veia umbilical expressariam indiretamente a função do compartimento materno-placentário.

Poder-se-ia imaginar que na gestação prolongada os níveis de NO estivessem aumentados, já que este mediador está envolvido na dilatação cervical e no desencadeamento do trabalho de parto. No entanto, foi observado que sua produção nos compartimentos materno e fetal diminui com o avanço da gestação. Ressalta-se a expressiva diminuição do NO no líquido amniótico das gestações prolongadas, em relação às gestações a termo, que teria a finalidade de tornar o útero cada vez mais responsivo às contrações à medida que a gestação avança. Recentes trabalhos têm demonstrado que ocorre uma significativa queda ($P < 0.001$) dos níveis de nitrito em líquido amniótico a partir da 37ª semana de gestação, suportando a hipótese de que esta redução da produção de NO contribuiria para o aumento da atividade uterina em gestações tardias (Morris et al., 2008). O papel diferencial do NO no trabalho de parto poderia estar relacionado com a região do útero. Sob ação do NO a musculatura da cérvix, no final da gestação, deve relaxar para dilatar. O NO exerce sua função através da estimulação das MMPs (metaloproteinases da matriz), capazes de degradar o colágeno e outros tecidos conectivos da matriz extracelular como proteoglicanos, fibronectina e laminina. O

efeito do NO também parece ser mediado via ciclooxigenase (COX), através de um aumento da prostaglandina sintase, a qual estimularia outros mediadores envolvidos no processo de amadurecimento do colo uterino. (Biondi et al., 2005). Opostamente, a musculatura do corpo uterino precisa contrair-se para o parto, e esse processo está associado com a diminuição do NO. Estudando-se ratas com gestação a termo foram encontradas as três isoformas de NOS em amostras da cérvix, mas somente iNOs e eNOs foram detectadas no corpo uterino. Um aumento de iNOs na cérvix ocorreu durante o trabalho de parto, porém no corpo uterino seu efeito foi justamente o oposto. Também ocorreu um aumento da nNOs na cérvix durante o trabalho de parto, sendo que esta isoforma parece estar ausente no útero em outras fases da gestação (Facchinetti et al., 1998).

Segundo Biondi et al. (2005), o processo oxidativo é dinamicamente balanceado na gravidez e a influência de determinados mediadores na promoção do parto ou no prolongamento da gestação pode variar conforme o tipo de radical livre e/ou outros mediadores presentes, seu local de ação, a disponibilidade de receptores, etc. A investigação destas questões poderia ajudar a encontrar uma resposta para o prolongamento de algumas gestações além das 41 semanas.

Os dados deste estudo demonstraram uma contribuição tanto fetal, quanto materna, para uma diminuição de NO na gestação prolongada. Esta queda foi marcadamente verificada no líquido amniótico, sugerindo que o extremo final da gestação é acompanhado pela queda dos níveis de NO; além disso, o líquido amniótico parece ter papel fundamental no desencadeamento do trabalho de parto.

A presença no líquido amniótico de altos níveis de MDA e a carbonilação proteica aumentada, nas gestações prolongadas, sugerem um aumento do estresse oxidativo do líquido amniótico no final da gravidez. A cesariana eletiva nas

gestações prolongadas expõe o feto a um menor estresse oxidativo de origem materno-placentária, se comparada às realizadas nas gestações a termo. Acredita-se, em vista desses achados, que este estudo dos radicais livres e sua relação com importantes estruturas maternas e fetais no extremo final da idade gestacional tenha contribuído para um melhor entendimento da fisiopatologia da gestação prolongada.

REFERÊNCIAS

AGARWAL A; GUPTA S; SHARMA RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology* 14: 3-28. 2005.

ATTARAN M; PASQUALOTTO E; FALCONE T; GOLDBERG JM; MILLER KF; AGARWAL A; SHARMA RK. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *International journal of fertility and women's medicine* 45: 314-320. 2000.

BALLANTYNE JW. The problem of the postmature infant. *The Journal of obstetrics and gynaecology of the British Empire* 2: 512-554. 1902.

BARRY W; SALMAN N; MUJAHID A; OSTFELD B; THOMAS H. Lipid peroxidation in cord blood and neonatal outcome. *Pediatrics international* 48: 479–483. 2006.

BAYDAS G; KARATAS F; GURSU MF; BOZKURT HA; ILHAN N; YASAR A; CANATAN H. Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Archives of Medical Research* 33: 276-280. 2002.

BERNARDI F; GUOLO F; BORTOLIN T; PETRONILHO F; DAL-PIZZOL F. Oxidative stress and inflammatory markers in normal pregnancy and preeclâmpsia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 34: 948-51. 2008

BIONDI C; PAVAN B; LUNGI L; FIORINI S; VESCE F. The role and modulation of the oxidative balance in pregnancy. *Current pharmaceutical design* 11: 2075-89. 2005.

BRACE RA. Physiology of amniotic fluid volume regulation. *Clinical obstetrics and gynecology* 40: 280-9. 1997.

BUHIMSCHI IA; KRAMER WB; BUHIMSCHI CS; THOMPSON LP; WEINER CP. Reduction-oxidation (redox) state regulation of matrix metalloproteinase activity in human fetal membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 182: 458-464. 2000.

BUHIMSCHI IA; BUHIMSCHI CS; PUPKIN M; WEINER CP. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. *American journal of obstetrics and gynecology* 189: 181-8. 2003.

BUHIMSCHI IA; BUHIMSCHI CS; WEINER CP. Protective effect of N-acetylcysteine against fetal death and preterm labor induced by maternal inflammation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 188:203-8. 2003.

BUONOCORE G; PERRONE S. Biomarkers of oxidative stress in the fetus and newborn. *Haematologica reports* 2: 103-107. 2006.

CANCELIER AC; PETRONILHO F; REINKE A; CONSTANTINO L; MACHADO R; RITTER C; DAL-PIZZOL F. Inflammatory and oxidative parameters in cord

blood as diagnostic of early-onset neonatal sepsis: A case-control study. Pediatric Critical Care Medicine. Mar/ 2009. Aceito para publicação (E como fica na bibliografia, sem volume etc..., fica como está?) Você sabe quem será o publicante? Caso sim, ficaria apenas: Aceito para publicação por

CANCELIER ACL. Parâmetros de estresse oxidativo e interleucinas 6 e 10 em sangue de cordão umbilical para diagnóstico de sepse neonatal. Tese de Doutorado. Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC. 2009. (confira os dados)

CASEY BM; MCINTIRE DD; LEVENO KJ. The continuing value of the Apgar score for the assessment of newborn infants. New England Journal of Medicine 344: 467-71. 2001.

CHALLIS JRG; SIMON CR; YANG K. Endocrinology labour. Fetal and Maternal Medicine Review 3: 47-66. 1991.

COMPORTI M; SIGNORINI C; LEONCINI S; BUONOCORE G; ROSSI V; CICCOLI L. Plasma F2-isoprostanes are elevated in newborns and inversely correlated to gestational age. Free Radical Biology & Medicine 37: 724-32. 2004.

CROWLEY P. Interventions for preventing or improving the outcome of delivery at or beyond term. Cochrane Database of Systematic Reviews 4: CD000170. 2000.

CUNNINGHAM PC. et al. Post term pregnancy. In: CUNNINGHAM PC. et al. Williams Obstetrics. New York: Mc Graw- Hill 28: 729-742. 2001.

- DALLE-DONNE I; ALDINI G; CARINI M; COLOMBO R; ROSSI R; MILZANI A.
Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 10: 389-406. 2006.
- DIEJOMAOH MFE; OMU AE; TAHER S; AL-BUSIRI N; FATINIKUN T;
FERNANDES S; AL-OTHAMAN S. Nitric oxide metabolites in preterm and
induced labor. *Gynecol Obstet Invest* 56:197-202. 2003.
- DENNERY PA. Role of redox in fetal development and neonatal diseases.
Antioxidants & Redox Signaling 6: 147-53. 2004.
- DRAPER HH; HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid
peroxidation. *Methods in Enzymology* 186: 421–431. 1990.
- DRURY JA; NYCYK JA; BAINES M; COOKE RW: Does total antioxidant status relate
to outcome in very preterm infants? *Clinical Science* 94: 197-201. 1998.
- FACCHINETTI F; VALENSISE H; NERI I; MENGHINI S; ROMANINI C; VOLPE A.
Reduction of serum citrulline levels in women at term toward the day of labor
onset. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 77: 174-7. 1998.
- FAINARU O; ALMOG B; PINCHUK I; KUPFERMINEC MJ; LICHTENBERG D; MANY
A: Active labour is associated with increased oxidisibility of serum lipids ex vivo.
BJOG 109: 938-41. 2002.

FIGO. International classification of diseases: up date international. Journal of Obstetrics and Gynecology 17: 634-640. 1980.

MELLO FILHO AC; HOFFMANN ME; MENEGHINI R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. The Biochemical Journal 218: 273-5. 1984.

FOGEL I; PINCHUK I; KUPFERMINEC MJ; LICHTENBERG D; FAINARU O. Oxidative stress in the fetal circulation does not depend on mode of delivery. American Journal of Obstetrics and Gynecology 193: 241–6. 2005.

FREITAS F; MARTINS-COSTA SH; RAMOS JGL; MAGALHÃES JÁ .. et al. In: Rotinas em obstetrícia. 5.Ed. Porto Alegre: Artes Médicas 91-96. 2006.

FURCHGOTT RF; ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 288: 373–376. 1980.

GEORGESON GD; SZONY BJ; STREITMAN K; VARGA IS; KOVACS A; KOVACS L; LASZLO A. Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology 103: 136-139. 2002.

GITTO E; REITER RJ; KARBOWNIK M; TAN DX; GITTO P; BARBERI S; BARBERI I. Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal period. *Biology of the Neonate* 81: 146-57. 2002.

GRANT JM. Induction of labour confers benefits in prolonged pregnancy. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 101: 99-102. 1994.

GUNTER S; PAUL N; SIMON J; NALINDA R; DAMIAN J M; RAY J. Lipopolysaccharide induces nitric oxide synthase expression and platelet-activating factor increases nitric oxide production in human fetal membranes in culture. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2: 29. 2004.

HALLIWELL B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344: 721-4. 1994.

HALLIWELL B; GUTTERIDGE JM; CROSS CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *The Journal Of Laboratory And Clinical Medicine* 119: 598-620. 1992.

HANNAH ME; HANNAH WJ; HELLMANN J; HEWSON S; MILNER R, WILLAN A. Induction of labor is compared with serial ante natal monitoring in post-term pregnancy. A randomized controlled trial. The Canadian Multicenter Post-term Pregnancy Trial Group. *New England Journal of Medicine* 326: 1587-92. 1992.

HRACSKO Z; SAFAR Z; ORVOS H; NOVAK Z; PAL A; VARGA IS. Evaluation of oxidative stress markers after vaginal delivery or Caesarean section. *In Vivo* 21: 703-6. 2007.

INANC F; KILINC M; KIRAN G; GUVEN A; KURUTAS EB; CIKIM IG; AKYOL O. Relationship between oxidative stress in cord blood and route of delivery. *Fetal Diagnosis and Therapy* 20: 450-3. 2005.

ISHIHARA M. Studies on lipoperoxide of normal pregnant women and of patients with toxemia of pregnancy. *Clinica Chimica Acta* 84: 1-9. 1978.

JANE E. NORMAN AND IAIN T. Cameron Nitric oxide in the human uterus. *Reviews of Reproduction* 1: 61–68. 1996.

KELLY RW. Inflammatory mediators and cervical ripening. *Journal of Reproductive Immunology* 57: 217-24. 2002.

KLIMEK J. Cytochrome P-450 involvement in the NADPH-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1044: 158-64. 1990.

KODLIWADMATH SM; SADASHIVADU B; KODLIWADMATH MV. Serum Malondialdehyde and ceruloplasmin levels in toxemia of pregnancy. *Journal of Obstetrics and Gynaecology of India* 5: 648-51. 1989.

KULKARNI AP; KENEL MF. Human placental lipid peroxidation. Some characteristics of the NADPH-supported microsomal reaction. *General Pharmacology* 18: 491-6. 1987.

LEVINE RL; GARLAND D; OLIVER CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186: 464-478. 1990.

LITTLE RE; GLADEN BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reproductive toxicology* 13: 347-52. 1999.

LONGINI M; PERRONE S; KENANIDIS A; VEZZOSI P; MARZOCCHI B; PETRAGLIA F; CENTINI G; BUONOCORE G. Isoprostanes in amniotic fluid: a predictive marker for fetal growth restriction in pregnancy. *Free Radical Biology & Medicine* 38: 1537-41. 2005.

LONGINI M; PERRONE S; VEZZOSI P; MARZOCCHI B; KENANIDIS A; CENTINI G; ROSIGNOLI L; BUONOCORE G. Association between oxidative stress in pregnancy and preterm premature rupture of membranes. *Clinical Biochemistry* 40: 793-7. 2007.

LOWRY OH; ROSEBROUGH NJ; FARR AL; RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275. 1951.

LURIE S; MATAS Z; BOAZ M; FUX A; GOLAN A; SADAN O. Different degrees of fetal oxidative stress in elective and emergent cesarean section. *Neonatology* 92: 111-5. 2007.

MARINONI E; DI IORIO R; VILLACCIO B; ALBERINI A; ROTA F; COSMI EV. Amniotic fluid nitric oxide metabolite levels and nitric oxide synthase localization in feto-placental tissues are modified in association with human labor. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 89: 47-54. 2000.

MAUL H; LONGO M; SAADE GR; GARFIELD RE. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Current Pharmaceutical Design* 9: 359-80. 2003.

MAUL H; MACKAY L; GARFIELD RE. Cervical ripening: biochemical, molecular, and clinical considerations. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 49: 551-63. 2006.

MEHMETOGLU I; KART A; CAGLAYAN O; CAPAR M; GOKCE R. Oxidative stress in mothers and their newborns in different types of labour. *Turkish Journal of Medical Sciences* 32: 427-9. 2002.

MIHAILOVI M; CVETKOVI M; LJUBI A; KOSANOVI M; NEDELJKOVI S; JOVANOVI I; PESUT O. Selenium and malondialdehyde content and glutathione peroxidase activity in maternal and umbilical cord blood and amniotic fluid. *Biological Trace Element Research* 73: 47-54. 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. In: *Gestação de Alto Risco: Gestação Prolongada*. Secretaria de Políticas, Área Técnica da Saúde da Mulher. Brasília. 2000.

MIRANDA KM; ESPEY MG; WINK DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5: 62-71. 2001.

MOCATTA TJ; WINTERBOURN CC; INDER TE; DARLOW BA. The effect of gestational age and labour on markers of lipid and protein oxidation in cord plasma. *Free Radical Research* 38: 185-91. 2004.

MORRIS JM; GOPAUL NK; ENDRESEN MJ ; KNIGHT M; LINTON EA; DHIR S; ANGGÅRD EE; REDMAN CW. Circulating markers of oxidative stress are raised in normal pregnancy and preeclampsia. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 105: 1195–9. 1998.

MORRIS NH; CARROLL S; NICOLAIDES KH; STEER PJ; WARREN JB. Exhaled nitric oxide concentration and amniotic fluid nitrite concentration during pregnancy. *European Journal of Clinical Investigation* 25: 138 – 141. 2008

MORROW JD; HARRIS TM; ROBERTS LJ 2nd. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Analytical Biochemistry* 184: 1-10. 1990.

MUELLER A; KOEBNICK C; BINDER H; HOFFMANN I; SCHILD RL; BECKMANN MW; DITTRICH R. Placental defence is considered sufficient to control lipid peroxidation in pregnancy. *Medical Hypotheses* 64: 553-7. 2005.

MUTLU-TURKOGLU U; ADEMOGLU E; IBRAHIMOGLU L; AYKAÇ-TOKER G, UYSAL M. Imbalance between lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 46: 37-40. 1998.

MYATT L; BREWER AS; LANGDON G; BROCKMAN DE. Attenuation of the vasoconstrictor effects of thromboxane and endothelin by nitric oxide in the human fetal-placental circulation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 166: 224-30. 1992.

MYATT L. Oxidative Stress, Vascular Damage and Alterations in Blood Flow in the Placenta and Fetus. *Placenta* 1: 697-698. 1998.

MYATT L; CUI X. Oxidative stress in the placenta. *Histochemistry and Cell Biology* 122: 369-82. 2004

NORWITZ ER; SNEGOVSKIKH VV; CAUGHEY AB. Prolonged pregnancy: when should we intervene? *Clinical Obstetrics and Gynecology* 50: 547-57. 2007.

NOVAK Z; VARGA SI; KOVÁCS L; PÁL A; PATAKI L; MATKOVICS B. The effects of Oradexone and Ambroxol pretreatment of the oxidative sensitivity of the red blood cells in preterm infants. *Clinica Chimica Acta* 182: 241-5. 1989.

OLESEN AW; WESTERGAARD JG; OLESEN J. Perinatal and maternal complications related to postterm delivery: a national register-based study, 1978-1993. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 189: 222-7. 2003.

PAAMONI-KEREN O; SILBERSTEIN T; BURG A; RAZ I; MAZOR M; SAPHIER O; WEINTRAUB AY. Oxidative stress as determined by glutathione (GSH) concentrations in venous cord blood in elective cesarean delivery versus uncomplicated vaginal delivery. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 276: 43-6. 2007.

PATIL SB; KODLIWADMATH MV; SHEELA M. KODLIWADMATH. Study Of Oxidative Stress And Enzymatic Antioxidants In Normal Pregnancy. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 22: 135-137. 2007.

PIERCE JD; CACKLER AB; ARNETT MG. Why should you care about free radicals? *RN* 67: 38-42. 2004.

PORANEN AK; EKBLAD U; UOTILA P; AHOTUPA M. The effect of vitamin C and E on placental lipid peroxidation and antioxidative enzymes in perfused placenta. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 77: 372-6. 1998.

RAIJMAKERS MT; ROES EM; STEEGERS EA; VAN DER WILDT B; PETERS WH. Umbilical glutathione levels are higher after vaginal birth than after cesarean section. *Journal of Perinatal Medicine* 31: 520-2. 2003.

RAIJMAKERS MTM; DECHEND R; POSTON L. Oxidative stress and preeclampsia: rationale for antioxidant clinical trials. *Hypertension* 44: 374-380. 2004

ROGERS MS; MONGELLI JM; TSANG KH; WANG CC; LAW KP. Lipid peroxidation in cord blood at birth: the effect of labor. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 105: 739-44. 1998.

ROGERS S; WITZ G; ANWAR M; HIATT M; HEGYI T. Antioxidant capacity and oxygen radical diseases in the preterm newborn. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 154: 544-548. 2000.

SÁ RAM; LOPES LM; NETO HC. Conduta na gestação pós-termo. *Femina* 28: 451. 2000.

SABARATNAN. A. Prolonged pregnancy In: James, D.K. et al. *High risk pregnancy: management options*. London: WB Sanders, cap. 16. 1994.

SAHLIN L; STJERNHOLM-VLADIC Y; ROOS N; MASIRONI B; EKMAN-ORDEBERG G. Impaired leukocyte influx in cervix of postterm women not responding to prostaglandin priming. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2; 6: 36. 2008.

SAKAMAKI H; AKAZAWA S; ISHIBASHI M; IZUMINO K; TAKINO H; YAMASAKI H; YAMAGUCHI Y; GOTO S; URATA Y; KONDO T; NAGATAKI S. Significance of

glutathione-dependent antioxidant system in diabetes-induced embryonic malformations. *Diabetes*. 48: 1138-44. 1999.

SANCHEZ-RAMOS L; OLIVIER F; DELKE I; KAUNITZ AM. Labor induction versus expectant management for postterm pregnancies: a systematic review with meta-analysis. *Obstetrics and gynecology* 101: 1312-8. 2003.

SÁNCHEZ-VERA I; BONET B; VIANA M; SANZ C. Relationship between alpha-tocopherol content in the different lipoprotein fractions in term pregnant women and in umbilical cord blood. *Annals of Nutrition & Metabolism* 48: 146-50. 2004.

SAUGSTAD OD. Oxidative stress in the newborn – a 30-year perspective. *Biology of the Neonate* 88: 228-236. 2005.

SCHAFER FQ; BUETTNER GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine* 30: 1191–212. 2001.

SLADEK SM.; REGENSTEIN AC.; LYKINS D; ROBERTS JM. Nitric Oxide Synthase Activity in Pregnant Rabbit Uterus Decreases on the Last Day of Pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 169 :1285-1291. 1993.

SOORANNA SR; MORRIS NH; STEER PJ. Placental nitric oxide metabolism. *Reproduction, Fertility, and Development* 7: 1525-31. 1995.

STIPEK S; MECHUROVA A; CRKOVSKA J; ZIMA T; PLATENIK J. Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in umbilical and maternal blood. *Biochemistry and Molecular Biology International* 35: 705-11. 1995.

STYGAR D; WANG H; VLADIC YS; EKMAN G; ERIKSSON H; SAHLIN L. Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix. *Biology of Reproduction* 67: 889-94. 2002.

SULLIVAN JL. Iron, plasma antioxidants and the "oxygen radical disease of prematurity". *American Journal of Diseases of Children* 142: 1341-4. 1988.

THAETE LG; DEWEY ER; NEERHOF MG. Endothelin and the regulation of uterine and placental perfusion in hypoxia-induced fetal growth restriction. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 11: 16-21. 2004.

TICCONI C; ZICARI A; REALACCI M, VITO M; DENORA P; NARCISI M; RUSSO M; PICCIONE E. Oxytocin modulates nitric oxide generation by human fetal membranes at term pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology* 52(3): 185 – 191. 2004.

VAISANEN-TOMMISKA M; NUUTILA M; AITTOMÄKI K; HIILESMAA V; YLIKORKALA O. Nitric oxide metabolites in cervical fluid during pregnancy: further evidence for the role of cervical nitric oxide in cervical ripening. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 188: 779–85. 2003.

VÄISÄNEN-TOMMISKA M; NUUTILA M; YLIKORKALA O. Cervical nitric oxide release in women postterm. *Obstetrics and Gynecology* 103: 657-62. 2004

VAN LANGENDONCKT A; CASANAS-ROUX F; DONNEZ J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 77: 861-70. 2002.

WAGENAAR GT; TER HORST SA; VAN GASTELEN MA; LEIJSER LM; MAUAD T, VAN DER VELDEN PA; DE HEER E; HIEMSTRA PS; POORTHUIS BJ; WALTHER FJ. Gene expression profile and histopathology of experimental bronchopulmonary dysplasia induced by prolonged oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 36: 782-801. 2004.

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. *Acta Obstetrics and Gynecology Scandinavia* 56: 247-53. 1977.

WICKENS D; WILKINS MH; LUNEC J; BALL G; DORMANDY TL. Oxidation (peroxidation) products in plasma in normal and abnormal pregnancy. *Annals of Clinical Biochemistry* 18: 158-62. 1981.

WINTERBOURN CC; CHAN T; BUSS H; INDER TE; MOGRIDGE N; DARLOW BA. Protein carbonyls and lipid peroxidation products as oxidation markers in preterm infant plasma: associations with chronic lung disease and retinopathy and effects of selenium supplementation. *Pediatric Research* 48: 84-90. 2000.

WOODS JR Jr. Reactive oxygen species and preterm premature rupture of membranes-a review. *Placenta* 22: 38-44. 2001.

YAACOBI N; OHEL G; HOCHMAN A. Reactive oxygen species in the process of labor. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 263: 23-24. 1999.

YALLAMPALLI C. Nitric Oxide Inhibits Uterine Contractility During Pregnancy But Not During Delivery. *Endocrinology* 133: 1899-1902. 1993.

YALLAMPALLI C. Role and Regulation of Nitric Oxide in the Uterus During Pregnancy and Parturition. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 5: 58-67. 1998.

YOUNG A; THOMSON AJ; LEDINGHAM M; JORDAN F; GREER IA; NORMAN JE. Immunolocalization of proinflammatory cytokines in myometrium, cervix, and fetal membranes during human parturition at term. *Biology of Reproduction* 66: 445-9. 2002.

ZUSTERZEEL PL; RÜTTEN H; ROELOFS HM; PETERS WH; STEEGERS EA. Protein carbonyls in decidua and placenta of pre-eclamptic women as markers for oxidative stress. *Placenta* 22: 213-9. 2001.

ANEXOS**ANEXO A - FORMULÁRIO DE ADMISSÃO**

NOME :

ENDEREÇO :

TELEFONES :

ESTADO CIVIL :

DATA DE NASCIMENTO :

IDADE :

GESTA : PARA : P. NORMAL: P. CESÁREA : ABORTO :

DATA PROVÁVEL DO PARTO (DPP) : _____

IDADE GESTACIONAL PELA USG : _____

1ª USG REALIZADA COM ____ SEMANAS

INTERCORRÊNCIAS NA GESTAÇÃO ATUAL:

USO DE MEDICAÇÕES:

PESO AO NASCIMENTO:

APGAR: 1º MINUTO _____ 5º MINUTO _____

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO

O Lab de Imunologia e Mutagênese do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UNESC está desenvolvendo uma pesquisa para avaliar alguns fatores que podem contribuir para que a gravidez ultrapasse as 40 semanas (ou 9 meses).

Este estudo tem o objetivo pesquisar gestantes com mais de 41 semanas de gestação e comparar os resultados com os das gestantes com menos de 39 semanas, para assim contribuir no entendimento dos motivos que levam algumas gestantes a irem além dos 9 meses de gravidez, mais exatamente além das 41 semanas, que é o período em que, segundo trabalhos recentes, se observa um aumento dos riscos maternos e principalmente fetais.

Você não tem nenhuma obrigação de contribuir para este estudo e sua recusa não ocasionará em nenhum prejuízo ao seu atendimento neste serviço ou em outros serviços de saúde pública. Não receberá nenhum tipo de remuneração, assim como não terá custos, participando do estudo.

Se você concordar em participar desta pesquisa acontecerá o seguinte:

1) Um dos pesquisadores, seu médico ou outro profissional da Equipe de Saúde, através de breve entrevista, ou a partir de dados da carteirinha do acompanhamento pré-natal, coletará algumas informações que serão úteis para esta pesquisa. Esses dados serão analisados de forma confidencial, não identificando você e suas respostas em nenhum momento do estudo. Mesmo participando, você poderá se recusar a responder a algumas ou a todas as informações solicitadas. Em nenhum momento seu nome será revelado em publicações, relatórios, ou em quaisquer outros meios, sendo, portanto, o resultado desta pesquisa, se divulgado, anônimo e confidencial.

2) Outra parte do estudo é a coleta. Será necessário coletar 3 ml de sangue do cordão umbilical, retirar um pequeno fragmento da placenta e coletar 3 ml do líquido

amniótico (“bolsa das águas”). A retirada de sangue do cordão umbilical, assim como do fragmento placentário, só será realizada após o nascimento do bebê, o clampeamento do cordão umbilical e a dequitação (retirada) da placenta. A coleta do líquido amniótico será realizada no momento em que se incisa o útero para o bebê nascer. Por esta incisão se coletará, com uma pequena sonda de aspiração, um pouco de líquido amniótico, que geralmente é o primeiro a fluir pela incisão. Esta sonda é a mesma que se usa para aspirar o líquido que fica na cavidade oral e no estômago do bebê quando o mesmo nasce. A placenta, o líquido amniótico e o sangue do cordão umbilical, neste hospital são habitualmente descartados, assim o seu destino é a incineração.

Estes procedimentos não oferecerem riscos graves para você nem seu bebê, sendo procedimentos totalmente estéreis, e realizados por pessoas altamente capacitadas. Este estudo não prevê benefícios diretos para você, mas poderá ajudar no melhor conhecimento das gestações chamadas prolongadas. O estudo não vai interferir na conduta obstétrica ou na indicação da sua cesariana.

Após a realização do estudo aqui proposto, o restante do seu material biológico ficará armazenado pelo tempo regulamentar para realização de eventuais testes para confirmar ou complementar a avaliação laboratorial necessária.

Após leitura do texto acima concordei em participar deste estudo.

Nome: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Quaisquer dúvidas favor contatar seu médico em sua unidade de saúde, ou o Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão no telefone 48-3431 2758 (horário comercial), ou na UNESC – laboratório de Imunologia

Eu, abaixo assinado, me responsabilizo pelo cumprimento das condições aqui expostas.

Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão
Coordenador da Pesquisa

Dr. Orlando Tobias Junior
Ginecologista e Obstetra

Araranguá - SC, ____ de _____ de 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)