Priscila Fabiane dos Santos Beirigo

**Dosagens de melatonina e de citocinas de acordo com a via de
parto**

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

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ruano

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Beirigo, Priscila Fabiane dos Santos

Dosagens de melatonina e de citocinas de acordo com a via de parto / Priscila Fabiane dos Santos Beirigo. -- São Paulo, 2011.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Rodrigo Ruano.

Descritores: 1.Via de parto 2.Parto 3.Cesárea 4.Melatonina 5.Citocinas
6.Inflamação

USP/FM/DBD-285/11

Agradeço a Deus pela oportunidade de concluído mais essa etapa em minha vida.

Perante os outros

Nunca desestime a importância dos outros.

Frequentemente só pensamos na crítica como que os outros nos possam alvejar, esquecendo-nos de que é igualmente dos outros que recebemos a força para viver.

O auxílio ao próximo é o seu melhor investimento.

Valorize os outros, afim de que os outros valorizem você.

Pensem-nos outros, não em termos de angelitude ou perversidade, mas na condição de seres humanos com necessidades e sonho, problemas e luta semelhante aos seus.

Se a solidão valesse, as leis de Deus não fariam o seu nascimento na terra entre duas criaturas, convertendo você em terceira pessoa para construir um grupo maior.

Francisco Cândido Xavier

Dedicatória

Em especial a minha mãe, **Lucinea dos Santos Beirigo**, que em nenhum momento me deixou desistir sempre me apoiando com a sua imensa sabedoria.

A minha irmã, **Pâmela Jordana dos Santos Beirigo**, por sempre estar ao meu lado me ajudando no eu precisasse.

Ao meu falecido pai, **Sebastião Macedo Beirigo Filho**, mesmo não estando presente foi com os seus ensinamentos que consegui alcançar cada objetivo de minha vida.

Ao meus familiares, **tio Nei Macedo Beirigo** e família, que quando cheguei a São Paulo me acolheu em sua casa.

Ao tio, **Esio Macedo Beirigo** e família, que me apoiou e me ajudou para que eu concluísse mais essa etapa em minha vida.

A todos meus familiares maternos e paternos, que sempre me incentivaram para que eu conseguisse terminar o meu mestrado.

Agradecimentos especiais

Ao laboratório de **Cronofarmacologia** onde foi realizado grande parte do estudo.

A **Prof. Dr. Regina Markus Pelkeman**, por todos os puxões de orelhas, porém de todos validos. Onde não me esqueço de uma frase dita por ela, que eu precisava montar a cavalo sozinha.

E e a equipe de seu laboratório principalmente ao **Dr. Eduardo Koji Tamura**, que nas minhas maiores dificuldades não se opôs em nenhum momento a me ajudar.

Aos mestrandos e doutorandos **Claudia , Erica, Pedro, Marina, Marcos, Debora, Eduardo, Sanceray, Eliana e Camila** pelas imprescindíveis contribuições, no momento da qualificação e ao longo do processo. É uma honra conviver com profissionais tão comprometidos e disponíveis para a formação científica.

À clinica obstétrica

Ao **Prof.Dr. Marcelo Zugaib**, por me permitir participar de um universo tão rico de formação científica e pela confiança em mim depositada para o desenvolvimento de um bom trabalho.

Ao **Dr. Rodrigo Ruano**, por ter me dado essa oportunidade de estar aqui e pelo apoio para seguir em frente.

Ao **Dr. Silvio Martinelli**, que me ajudou com seus sábios ensinamentos e sempre sendo otimista que tudo ia dar certo.

Ao **Alan Garcia da Silva e Willian Santos**, por me agüentar todos esses anos, com muita paciência me ajudando e orientando em conhecimentos de informática.

À **Marina, Mirian, Soraia, Isis e Salete** pelo suporte na pós-graduação.

Aos meus amigos da pós **Andréia Matos, Cristiane Ortigosa, Eduardo Pimenta, Eugênia, Letícia Paiva, Luciana Garcia, Rogério Caixeta** e pela grande amizade e apoio no que fosse preciso.

À **CNPQ, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** e a **Fapesp, Fundação de amparo a Pesquisa do estado de São Paulo**, pelos auxílios concedidos que viabilizassem a realização deste trabalho.

E a todos os amigos e colegas da **Clínica Obstétrica** do HCFMUSP, pelo convívio enriquecedor.

A todas as parturientes que participaram deste trabalho no Hospital Universitário da Universidade do estado de São Paulo muito obriga pela disponibilidade, para a conclusão deste trabalho.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journal Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

I. INTRODUÇÃO	1
II. PROPOSIÇÃO	8
III. REVISÃO DE LITERATURA	10
III.a.Fisiológicos do parto	11
III.b.O papel da melatonina no processo inflamatório e no parto	12
III.c.Citocinas no processo inflamatório e no parto	19
III.c.1.Fator de necrose tumoral (TNF)	23
III.c.2.Interleucina 1 beta (IL-1 β)	24
III.c.3.Interleucina 6 (IL-6)	25
III.d.Via de parto	26
III.d.1.Parto vaginal	26
III.d.2.Parto por cesárea	26
IV. CAUÍSTICA E MÉTODO	28
IV.a.Tipo de estudo	29
IV.b.1.Seleção das pacientes	29
IV.b.1.1.Critérios de inclusão	29
IV.b.1.2.Critério de exclusão	30
IV.c.Método	31
IV.c.1.Coleta do Material	31
IV.c.2. Dosagem de melatonina do soro	31
IV.c.3 Dosagem de TNF do soro	32
IV.c.4.Dosagem de IL-1 β do soro	32
IV.c.5.Dosagem de IL-6 do soro	33
IV.d. Análise estatística	34
IV.e.Característica da população estudada	35

V. Resultados	37
V.a.Resultados gerais:comparação clínica entre os grupos	38
V.b. Dosagem de melatonina e citocinas de acordo com a via de parto	39
V.c.O ritmo diário da melatonina e das citocinas ao longo do dia	41
V.d.Análise de correlação as concentrações de melatonina e de citocinas obtidas do soro da veia do cordão umbilical e do soro da veia braquial	49
V.e.Análise de correlação entre as citocinas e a melatonina	55
VI. Discussão	59
VII. Conclusões	67
VIII.Anexos	69
IX. Referências	74

LISTA DE ABREVIATURA

IL-1 β	interleucina um beta
IL-6	interleucina seis
TNF	fator de necrose tumoral
VCU	veia do cordão umbilical
VB	veia braquial
SIL-2R	receptor solúvel de interleucina dois
SIL-4R	receptor solúvel de interleucina quatro
INF- γ	interferon gama
RNA	ácido ribonucleico
IL-8	interleucina oito
IL-7	interleucina sete
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
H	horas
P	probabilidade
Et al.	e outros
DP	desvio padrão
EPM	erro padrão da media

LISTA DE SÍMBOLOS

Pg/mL pico gramas por mililitros

°C graus celsius

Nm nanômetro

% porcentagem

N numero de casos

± mais ou menos

LISTA DE SIGLAS

USP universidade do estado de São Paulo

COMEP comissão de ética em pesquisa

HU hospital universitário

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Variação de melatonina (pg/ml) média $\pm$ EPM observada na veia do cordão umbilical (vcu) e na veia braquial (vb) em 5 parturientes parto vaginal e 5 parturientes operação cesariana - HU-USP - março a setembro de 201042

FIGURA 2 - Variação de TNF (pg/mL) média $\pm$ EPM observada na veia do cordão umbilical (vcu) e na veia braquial (vb) em 5 parturientes que evoluíram ao parto vaginal e 5 parturientes que foram submetidas a operação cesariana - HU-USP - março a setembro de 2010.....44

FIGURA 3- Variação de IL-1 β (pg/mL) média $\pm$ EPM observada na veia do cordão umbilical (vcu) e na veia braquial (vb) em 5 parturientes que evoluíram ao parto vaginal e 5 parturientes que foram submetidas a operação cesariana - HU-USP - março a setembro de 2010.....46

FIGURA 4 - Variação de IL-6 (pg/mL) média $\pm$ EPM observada na veia do cordão umbilical (vcu) e na veia braquial (vb) em 5 parturientes que evoluíram ao parto vaginal e 5 parturientes que foram submetidas a operação cesariana - HU-USP - março a setembro de 201048

FIGURA 5 Correlação melatonina (pg/mL) observada na veia do cordão umbilical (vcu) e na veia braquial (vb) 25 parturientes que evoluíram parto vaginal e 25 parturientes foram submetidas a operação cesariana - HU-USP - março a setembro de 201050

FIGURA 6 - Correlação TNF (pg/mL) observada na veia do cordão umbilical (vcu) e na veia braquial (vb), 25 parturientes que evoluíram parto vaginal e 25 parturientes foram submetidas a operação cesariana - HU-USP - março a setembro de 2010.....51

FIGURA 7 - Correlação IL-1 β (pg/mL) observada na veia do cordão umbilical (vcu) e na veia braquial (vb), 25 parturientes que evoluíram parto

vaginal e 25 parturientes foram submetidas a operação cesariana - HU-USP
- março a setembro de 201053

FIGURA 8 - Correlação IL-6 (pg/mL) observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB), 25 parturientes que evoluíram parto vaginal e 25 parturientes foram submetidas à operação cesariana - HU-USP - março a setembro de 201054

FIGURA 9 - Correlação de melatonina (pg/mL) x TNF (pg/mL) observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB) de amostras obtidas de parturientes entre 23h e 03h, 5 parturientes que evoluíram ao parto vaginal na veia do cordão umbilical (VCU) e veia braquial (VB) 5 parturientes que foram submetidas a operação cesariana veia do cordão umbilical (VCU) e veia braquial (VB) HU-USP - março a setembro de 201056

FIGURA 10- Correlação de melatonina (pg/mL) x IL-1 β (pg/mL) observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB) de amostras obtidas de parturientes entre 23h e 03h, 5 parturientes que evoluíram ao parto vaginal na veia do cordão umbilical (VCU) e veia braquial (VB) 5 parturientes que foram submetidas a operação cesariana veia do cordão umbilical (VCU) e veia braquial (VB) HU-USP - março a setembro de 201057

FIGURA-11- Correlação de melatonina (pg/mL) x IL-6 (pg/mL) observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB) de amostras obtidas de parturientes entre 23h e 03h, 5 parturientes que evoluíram ao parto vaginal na veia do cordão umbilical (VCU) e veia braquial (VB) 5 parturientes que foram submetidas a operação cesariana veia do cordão umbilical (VCU) e veia braquial (VB) - HU-USP - março a setembro de 2010.....58

LISTA DE TABELA

- Tabela 1-** Dados clínicos e obstétricos das 25 parturientes que evoluíram ao parto vaginal e 25 parturientes que foram submetidas à operação cesariana - HU-USP - março a setembro de 2010.....39
- Tabela 2-** Comparação entre as médias ($\pm$ EPM) das concentrações de melatonina e de citocinas observadas na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB) em amostras colhidas de 25 parturientes que evoluíram ao parto vaginal e 25 parturientes que foram submetidas à operação cesariana - HU-USP - março a setembro de 2010.....40
- Tabela 3 -** Média $\pm$ EPM da concentração de melatonina em 5 amostras observada na veia do cordão umbilical (VCU) e 5 amostras na veia braquial (VB) colhidas de parturientes que evoluíram ao parto vaginal e parturientes submetidas a operação cesariana comparando as amostras em relação ao local de coleta cesariana - HU-USP - março a setembro de 2010.....43
- Tabela 4 -** Média $\pm$ EPM da concentração de TNF em 5 amostras observada na veia do cordão umbilical (VCU) e 5 amostras na veia braquial (VB) colhidas de parturientes que evoluíram ao parto vaginal e parturientes submetidas a operação cesariana comparando as amostras em relação ao local de coleta cesariana - HU-USP - março a setembro de 2010.....45
- Tabela 5 -** Média $\pm$ EPM da concentração de IL-1 β em 5 amostras observada na veia do cordão umbilical (VCU) e 5 amostras na veia braquial (VB) colhidas de parturientes que evoluíram ao parto vaginal e parturientes submetidas a operação cesariana

comparando as amostras em relação ao local de coleta
cesariana -HU-USP- março a setembro de 2010.....47

Tabela 6- Média $\pm$ EPM da concentração de IL-6 em 5 amostras
observada na veia do cordão umbilical (VCU) e 5 amostras na
veia braquial (VB) colhidas de parturientes que evoluíram ao
parto vaginal e parturientes submetidas a operação cesariana
comparando as amostras em relação ao local de coleta
cesariana - HU-USP - março a setembro de 2010.....49

Resumo

Beirigo PFS. **Dosagens de melatonina e de citocinas de acordo com a via de parto.** [dissertação de mestrado] PF. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Objetivo: Avaliar o perfil de citocinas pró-inflamatórias e de melatonina no cordão umbilical e no sangue materno de gestantes hígdas de acordo com a via de parto. **Métodos:** Entre março e setembro de 2010, foi realizado estudo observacional prospectivo no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Foram dosadas citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF) e melatonina em pacientes sem doenças clínicas ou complicações obstétricas que entraram em trabalho de parto espontâneo. As concentrações de citocinas e de melatonina foram comparadas de acordo com a via de parto, além do período do dia e do local de coleta. O sangue retirado da veia do cordão umbilical (VCU) era obtido imediatamente após o parto, sendo que após uma hora era colhido o sangue da veia braquial materna (VB). Foram excluídas pacientes com infecção, parto prematuro e sofrimento fetal. **Resultados:** Foram estudadas 50 parturientes, das quais 25 evoluíram para parto vaginal e 25 para cesárea. A idade materna foi em média $26,0 \pm 6,7$ anos. A idade gestacional no parto foi em média $39,5 \pm 1,7$ semanas. O peso médio dos recém-nascidos foi $3366,5 \pm 340,2$ gramas. Todos os casos receberam analgesia durante o parto (analgesia combinada: peridural e raquianestesia). A maioria das pacientes era de nulíparas (31/50 - 62,0%). A duração do trabalho de parto foi semelhante nas pacientes que evoluíram para o parto vaginal ($7,6 \pm 4,4$ horas) e nas que foram submetidas à operação cesariana ($8,2 \pm 4,4$ horas; $p=0,87$). Houve tendência de níveis mais elevados de melatonina no VCU e na VB em pacientes após parto vaginal, porém sem diferença estatística ($p=0,41$ e $p=0,16$). Pacientes que evoluíram para cesariana apresentaram dosagens significativamente maiores de TNF na VB, de IL-1 β na VCU e na VB e de IL-6 na VCU que em pacientes que evoluíram para parto vaginal ($p=0,02$; $p<0,01$; $p<0,01$ e $p<0,01$; respectivamente). Observou-se variação no ritmo circadiano das dosagens dessas citocinas após cesariana, com correlação significativa entre dosagem de melatonina e de citocinas nessa via de parto. **Conclusão:** Pacientes submetidas à operação cesariana apresentaram tendência a redução da secreção de melatonina, com aumento significativo da secreção de citocinas pró-inflamatórias, o que pode ser consequência do processo inflamatório relacionado ao estresse cirúrgico.

Descritores: Via de parto, parto, cesárea, melatonina, citocinas, IL-1 β , IL-6, TNF, inflamação.

Abstract

Beirigo PFS. **Melatonin and cytokines concentrations in accordance with the mode of delivery.** [dissertação de mestrado] PF. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Objective: To evaluate the profile of pro-inflammatory cytokines and the melatonin level in maternal and umbilical cord blood samples in accordance with the mode of delivery. **Methods:** Between March 2010 and September 2010, a prospective observational study was conducted at University Hospital of University of São Paulo. Cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF) and melatonin levels were analyzed from maternal brachial vein (BV) and umbilical cord vein (UCV) obtained from healthy patients that started spontaneous labor. The levels of cytokines and melatonin were evaluated in accordance to the mode of delivery as well as the day period and the local of blood sample (UCV - immediately after delivery and BV - one hour after delivery). Patients with infection, preterm labor and fetal distress were excluded. **Results:** A total of 50 patients were evaluated in the present study: 25 underwent vaginal delivery and 25 c-section. Mean maternal age was 26.0 ± 6.7 years. Mean gestational age at delivery was 39.5 ± 1.7 weeks. The average of newborn weight was 3366.5 ± 340.2 grams. All patients had combined epidural and raquianesthesia. The majority of the patients was nullipara (31/50 – 62.0%). The labor duration was similar in patients that underwent vaginal delivery (7.6 ± 4.4 hours) or c-section (8.2 ± 4.4 hours, $p=0.87$). There was a tendency of increased levels of melatonin in the UCV and BV samples after vaginal deliveries, but with statistical significance ($p=0.41$ and $p=0.16$). Patients that underwent c-section had increased levels of TNF at the BV, IL-1 β at the UCV and BV and IL-6 at the UCV than in patients that underwent vaginal delivery ($p= 0.02$; $p<0.01$; $p<0.01$ and $p<0.01$; respectively). Circadian variations of the cytokines and the melatonin levels were observed in patients that underwent c-section, with significant correlation between the levels of cytokines and melatonin. **Conclusion:** Patients that underwent c-section had a tendency of reduced melatonin level, with significant increase in the cytokine levels, which may be consequent of the inflammatory process related to the surgical stress.

Keywords: Delivery, mode of delivery, c-section, melatonin, cytokines, IL-1 β , IL-6, TNF, inflammation.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do feto nos mamíferos ocorre no organismo materno, e o período gestacional varia consideravelmente de acordo com o táxon, por exemplo, de 19 dias em ratos até 37 a 42 semanas em humanos. O processo gestacional em mamíferos gera alterações hormonais, bioquímicas e imunológicas que permitem a manutenção e a proteção do feto em seu organismo por determinado tempo. As modificações fisiológicas fazem parte do ciclo biológico da mulher, desde o desenvolvimento do feto parto e a lactação. Não há rejeição do sistema imune materno contra o feto, o que pode ser considerado um enigma imunológico. As alterações maternas poderiam ser, ou realmente são, simplesmente respostas à adaptação imunológica dos processos reprodutivos humanos. Em 1953, em trabalho clássico, foram sugeridas três hipóteses para explicar a ausência de reações imunológicas maternas: (i) imaturidade antigênica fetal, (ii) incapacidade materna de resposta imunológica, e (iii) separação imunológica entre mãe e feto ¹.

As alterações imunológicas e hormonais no organismo materno estão diretamente relacionadas com o bem estar e desenvolvimento da gravidez ². As citocinas participam de vários processos durante a gestação, como a implantação do embrião no útero, iniciação do trabalho de parto e proteção do feto contra agentes infecciosos, como vírus e parasitas ³. Graças à ausência de reações imunológicas entre o organismo materno e o feto, este se mantém tolerante aos antígenos maternos durante a gravidez. Suspeita-se que esse fato

se deva às variações das concentrações das citocinas envolvidas na gestação, mas essa teoria ainda necessita de comprovação ⁴.

A produção de citocinas pode ser regulada por diferentes hormônios, como a melatonina, hormônio secretado, durante a noite, pela glândula pineal de forma rítmica, a qual participa da fisiologia circadiana, sazonal e reprodutiva, além de ser um potente antioxidante endógeno ⁵. Alguns trabalhos mostram que citocinas pró-inflamatórias poderiam levar a uma redução da produção noturna de melatonina,⁶ isso ocorre porque a glândula pineal está instrumentada para responder a padrões moleculares envolvidos no retorno de uma resposta inflamatória na atividade da pineal e fornecer uma base molecular para a compreensão da expressão de temporização circadiana em organismos feridos, reforçando a idéia de um eixo imune pineal onde a produção de TNF inibe a produção de melatonina ^{7, 8}.

As citocinas têm ação autócrina, modulando as propriedades de suas células produtoras, e parácrina, de forma que a pequenas distâncias, elas podem afetar outras células do sistema imunológico. Entretanto, algumas citocinas são semelhantes a hormônios, atuando como mediadores distantes para células que não pertencem ao sistema imunológico. À medida que se tenta entender as funções das citocinas, uma importante questão surge sobre a complexidade e a inter-regulação entre papéis protetores e potencialmente danosos dessas substâncias ⁹.

Após um estímulo imunogênico com *Escherichia coli* ou zimosan

(partícula oriunda do fungo *Saccharomices cerevisiae*), células imunocompetentes presentes no colostro passam a produzir melatonina, demonstrando uma relação entre a melatonina e a atividade do sistema imunológico¹⁰.

Citocinas são importantes na relação feto-mãe, mas, em algumas condições desbalanceadas, pode causar prejuízos à gravidez. Por exemplo, o estresse térmico na fase de embriogênese pode provocar o aumento do TNF no líquido amniótico em ratas prenhas. Esse aumento de TNF durante a gestação ocasionaria comprometimentos do desenvolvimento do embrião/feto, podendo levar à morte intrauterina ¹¹.

Diversos relatos demonstram a participação da melatonina nos processos reprodutivos. Estudos para investigar as alterações na produção de melatonina em pacientes com doenças gestacionais severas demonstraram um aumento significativo na produção de melatonina durante o dia, iniciado durante a 24^a semana gestacional. Referido aumento se manteve ao longo de toda a gestação. O aumento diurno durante a gestação, foi reflexo do estado patológico da unidade feto-placentária, havendo a diminuição de sua concentração dois dias após o parto, quando comparado a parturientes saudáveis ¹².

A melatonina possui efeitos protetores variados ¹³, em ratas prenhas induzidas à hipoxia fetal, à melatonina administrada por via intraperitoneal, em diferentes tempos e concentrações, juntamente com água, *a posteriori*, foi

capaz de reduzir danos oxidativos cerebrais no neonato ¹⁴. Receptores de melatonina na placenta atuam de modo a proteger o feto contra danos causados pelo estresse oxidativo. A administração de melatonina na décima quinta semana gestacional de ratas prenhes gera um efeito positivo em relação ao peso fetal ¹⁵.

A secreção de melatonina e de citocinas também parece sofrer influência dependendo da via de parto. A importância de estudar o perfil imune e inflamatório, dependendo da via de parto, se relaciona a possíveis consequências, tanto para a gestante como para o recém-nascido.

Segundo Pontes et al.,2006 ¹⁰, a produção de fator de necrose tumoral (TNF) no colostro e no leite materno se mostrou mais elevada em parturientes submetidas à operação cesariana, resultando em suspensão da secreção da melatonina noturna. Ainda nas parturientes que foram submetidas à operação cesariana, a secreção de interleucina 12 (IL-12) no colostro estava reduzida na fase de escuro do ciclo claro/escuro ambiental, quando comparada com a de pacientes que evoluíram para parto vaginal. A variação diária da IL-12 só se normalizou após a recuperação da melatonina, que aconteceu, aproximadamente, 15 dias após o parto ¹⁶.

Semelhantemente, a produção de citocinas varia também dependendo da via de parto. A quantidade de sIL-2R (receptor solúvel de interleucina 2), interleucina 1 beta (IL-1 β) e TNF no soro de neonatos e de sIL-4R (receptor solúvel de interleucina 4), interferon gama (INF- γ), interleucina 1-beta (IL-1 β) e

interleucina seis (IL-6) no soro das mães, é maior no parto vaginal em relação à operação cesariana eletiva ¹⁷. Alguns autores sugerem que os aumentos de IL-1 β , IL-6 e TNF, durante o parto normal, refletem o estresse desencadeado pelo próprio procedimento ou ainda por fatores ambientais externos ¹⁸.

Outro estudo demonstrou que as concentrações de IL-1 β e IL-6, na veia de cordão umbilical de recém-nascido, após cesariana eletiva, foram significativamente menores que após parto vaginal. Por outro lado, a concentração do TNF foi significativamente maior após cesárea eletiva ¹⁹.

O parto é um processo fisiológico composto por distintas fases. Começa com eventos bioquímicos que resultam na ruptura das membranas fetais e contrações ²⁰. Na maioria das vezes, acarreta diversas reações hormonais e psicológicas, que podem ser influenciadas por diferentes fatores, como o estresse, as reações adversas aos sedativos e os fatores ambientais ²¹.

A operação cesariana é uma das cirurgias mais realizadas no mundo, tendo como uma de suas principais indicações a progressão anormalmente lenta do trabalho de parto. Esse tipo de parto é mais agressivo devido aos processos de injúrias decorrentes das incisões ²². O parto vaginal parece ter menores alterações no processo inflamatório, em comparação à operação cesariana ²³. Como a taxa de cesariana vem aumentando no mundo inteiro, questiona-se se essa via de parto apresentaria diferente resposta imune e hormonal que poderia ter consequências para a mãe e o conceito. Além disso, não se sabe se o tipo de parto pode estar associado à resposta imune diferente

e se esse processo teria alguma repercussão para o feto.

O presente estudo visa traçar o perfil de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e a TNF e suas relações com os níveis de melatonina no soro de cordões umbilicais e de mães, submetidas à operação cesariana ou parto vaginal realizados em diferentes horários.

PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem por objetivo avaliar as diferenças no perfil inflamatório e na produção da melatonina por meio da dosagem de citocinas (TNF, IL-1 β , IL-6) e de melatonina no sangue materno e no sangue do cordão umbilical, entre gestantes hípidas, de acordo com a via de parto vaginal ou operação cesariana.

REVISÃO DE LITERATURA

III.a. Fisiológicos do parto

O parto é o processo de dar a luz. Entretanto, uma simples definição não traduz o quanto esse processo é complicado ²⁰. Os mecanismos que desencadeiam a iniciação do parto vêm sendo amplamente estudados, porém muito ainda precisa ser esclarecido. O parto é caracterizado por uma complexa rede de fatores autócrinos, parácrinos e moleculares provenientes dos tecidos intrauterinos, formando um emaranhado de mecanismos bioquímicos e moleculares ²⁴.

Durante 36 a 38 semanas de gestação, o miométrio permanece quiescente devido à atuação de vários processos independentes, mas cooperativos ²⁵. Mesmo durante esse período de quiescência, o miométrio apresenta atividade contrátil característica do período gestacional, com contrações isoladas de longa duração e pequena amplitude. Perto do final da gravidez, o útero começa a preparação para o trabalho de parto, e uma fase de transição é necessária para que a atividade contrátil possa ser estabelecida por meio de contrações de curta duração e grande amplitude, realizadas de forma sincronizada por todo o corpo muscular uterino ²⁰.

O mecanismo envolvido nessa fase de transição ainda não foi totalmente esclarecido, sendo que as contrações uterinas que levam à dilatação cervical, posicionamento e nascimento do feto iniciam-se repentinamente, sem sinal algum ²⁵. Uma vez estabelecido o trabalho de parto, o intervalo entre as contrações diminui gradualmente de 10 minutos para menos de 1 minuto, sendo

necessários períodos de relaxamento entre elas, essenciais para o bem-estar do feto. Na fase ativa do trabalho de parto, a duração de cada contração varia de 30 a 90 segundos, com média em torno de 60 segundos ¹. Portanto, as últimas horas da gravidez apresentam grandes gastos de energia, sendo conhecida como “trabalho de parto”, em que as contrações do músculo liso uterino apresentam-se dolorosas, caracterizando as chamadas “dores do parto”²⁵.

Os processos fisiológicos na gravidez que provocam a iniciação do parto ainda não estão bem definidos. Na maioria das espécies de mamíferos, a diminuição ou retirada de progesterona pode ocorrer antes do início do parto, o que parece não ocorrer em humanos. Os níveis de progesterona no plasma materno aumentam durante a gestação, diminuindo apenas após a dequitação. Atualmente, duas teorias tentam explicar a iniciação do parto, estando baseadas na (I) hipótese de retirada da manutenção da gravidez e (II) teoria da indução do parto por uterotonina. Alguns pesquisadores também especulam que a maturidade do feto, de forma ainda não definida, seria início para desencadear o processo do parto. Apesar de esse conceito ter sido proposto por Speigelberg em, 1882, nenhum sinal fetal foi descoberto até hoje ²⁵.

III.b. O papel da Melatonina no Processo Inflamatório e no Parto

Durante a gestação, ocorre a liberação de diversos hormônios, dentre eles, a melatonina, que é sintetizado na glândula pineal, em órgãos linfoides como medula óssea e timo, linfócitos e em algumas outras células e tecidos. A

melatonina, possui um papel imunomodulador, tendo assumindo importância considerável nos últimos anos ²⁶.

A melatonina é uma molécula que participa de uma infinidade de funções e pode ser onipresente nos organismos. Foi encontrada em bactérias, eucariotos unicelulares, algas, fungos, plantas e em vários animais. Sua função biológica em organismos unicelulares primitivos é a defesa antioxidante contra outros organismos unicelulares primitivos e contra radicais livres tóxicos. Durante a evolução, ela tem sido adotada por organismos multicelulares para executar muitas outras funções biológicas, entre as quais se incluem: a expressão química da escuridão em vertebrados e a tolerância ambiental em fungos e plantas, a sinalização sexual em aves e peixes, a regulamentação fotoperiódica reprodutiva em mamíferos e a imunomodulação / atividade anti-inflamatória em todos os vertebrados ²⁷.

Na maioria dos vertebrados, incluindo seres humanos, a melatonina é sintetizada principalmente pela glândula pineal, sendo regulada pela luz ambiental (ciclo claro/escuro), através da ação sobre os núcleos supraquiasmático. Os pinealócitos funcionam como tradutor neuroendócrino que secreta melatonina, durante a fase escura do ciclo claro/escuro, e, por isso, a melatonina é chamada de hormônio do escuro ²⁸. A melatonina, também está diretamente envolvida com o eixo imune-pineal onde foi demonstrado que a glândula pineal é um participante constitutivo na resposta imune inata e a estimulação com endotoxinas, leva a produção de TNF inibindo a síntese de

melatonina ⁷. A glândula pineal está instrumentada para responder a padrões moleculares associados a perigo, e a citocinas pró-inflamatória poderiam levar a uma redução da produção noturna de melatonina ^{6, 29}

Certamente, a melatonina está envolvida na regulação do sono, assim como em uma série de outras atividades corporais cíclicas. Ela é secretada pela glândula pineal principalmente à noite. Sua síntese também ocorre em outras células do corpo, incluindo os linfócitos, podendo assim influenciar outras funções fisiológicas ²⁶.

Diversas pesquisas revelam a presença da melatonina, antes do surgimento de aves e mamíferos, bem como a sua regulação e o aprimoramento do sistema imunológico ao longo dos anos. Portanto, os efeitos da melatonina no sistema imunológico reforçam o seu papel regulador na fisiologia dos seres vivos ³⁰.

Durante o dia, ocorrem mudanças na temperatura ambiental que levam os organismos a adaptarem seu ritmo, de modo a montar uma resposta imunológica adequada. Assim, o aumento noturno dos níveis da melatonina, cuja duração é determinada pelas alterações sazonais da duração do dia, fornece um índice conveniente para distinguir as estações do ano ^{31, 32}.

A melatonina também foi extraída de sementes e de algumas plantas, onde sua concentração não varia, já no plasma humano foi verificado que a concentração varia resultando no aumento da imunidade. Tomando em

conjunto essas evidências, a melatonina implica uma gama de efeitos com uma significativa influência reguladora sobre muitas funções fisiológicas do corpo ²⁸. É conhecido o fato de que as mudanças do sistema imune em pequenos mamíferos e aves estão associadas positivamente com as alterações na síntese da melatonina ^{33, 34}.

Além disso, a função biológica primária da melatonina nos organismos unicelulares primitivos é na defesa antioxidante que protege contra danos de radicais livres tóxicos. Sua produção decrescente durante o envelhecimento pode refletir os efeitos da senescência em termos de um relógio biológico em muitos organismos. Inversamente, os elevados níveis de melatonina podem servir como sinal de vitalidade e saúde. As múltiplas funções biológicas da melatonina podem ser parcialmente atribuídas ao seu metabolismo não convencional que é composto por vias multienzimáticas, pseudoenzimáticas e não enzimáticas. Como resultado de seu metabolismo e de suas funções biológicas, a melatonina produz alguns metabólitos ativos que atuam como mediadores de seu funcionamento ²⁷.

Em uma variedade de mamíferos, a melatonina desempenha um papel crucial no processo reprodutivo, atuando não somente sobre o sistema nervoso central, mas também se comportando como um regulador fisiológico periférico. Para abordar a relevância da melatonina para a manutenção da gravidez e na relação feto placentária, foram investigados dois receptores de melatonina por meio da coleta por curetagem de 100 mg de amostras da placenta humana de

pacientes que tiveram aborto na 10ª semana gestacional. O tecido placentário foi colhido e imediatamente congelado em nitrogênio até a extração do RNA, sendo o resto submetido à cultura de células para verificar a expressão da melatonina na placenta, foi demonstrada a transcrição da síntese de melatonina e receptores que estão presentes no primeiro trimestre gestacional. A melatonina pode se comportar como um bom regulador na função placentária, de forma Parácrina / autócrina, desempenhando um papel importante para a reprodução humana ³⁵.

Em ratas prenhes, foi verificada a concentração de melatonina na placenta na 10ª, 12ª, 17ª e 21ª dias gestacionais. As coletas eram feitas à meia-noite e uma hora da madrugada. Observou-se que a concentração circulante de melatonina aumentava com o avançar da gestação ³⁶.

O efeito positivo do tratamento com melatonina foi verificado no primeiro momento da concepção para avaliar a atividade reprodutiva de ovelhas. Por meio de um implante subcutâneo onde ocorria a liberação lenta de 18 mg de melatonina, observou-se que houve aumento da atividade reprodutiva dos animais ³⁷.

O efeito dos implantes subcutâneos de melatonina administrados em carneiros durante a fase de fertilização, traduziu-se por uma melhora não apenas na quantidade, mas também na qualidade de espermatozoides e na taxa de fertilização em relação aos homólogos controles não tratados ³⁸.

Além de células do esperma, vários estudos recentes indicam que, tanto *in vitro* como *in vivo*, a melatonina promove a maturação e desenvolvimento de ovócitos de búfalos ³⁹, vacas ⁴⁰, suínos ⁴¹ e ratos ^{42, 43}. Em um ensaio clínico, a administração de melatonina, a partir do quinto dia do ciclo anterior até o dia da captação dos oócitos, em mulheres de baixa fertilização, mostrou uma melhora na qualidade dos oócitos e aumento nas taxas de fertilização ⁴³.

Receptores de melatonina na placenta atuam de modo a proteger o feto contra danos causados pelo estresse oxidativo. A administração de melatonina na décima semana de gestação de ratas prenhes mostrou atuação protetora da melatonina na placenta, gerando um efeito positivo em relação ao peso fetal ¹⁵.

Estudos para investigar as alterações na produção de melatonina em pacientes com doenças gestacionais severas demonstraram aumento significativo na produção de melatonina durante o dia, iniciado durante a 24ª semana gestacional, o qual se manteve ao longo de toda gestação, diminuindo a concentração dois dias após o parto, quando comparado a parturientes saudáveis ¹².

Um estudo foi realizado com vinte ovelhas para verificar o efeito da melatonina sobre outros hormônios, analisando-se quatro grupos: o primeiro grupo era controle, o segundo grupo era tratado com melatonina ao longo do dia, o terceiro grupo controle dias curtos e o quarto era tratado com melatonina dias curtos. O tratamento exógeno com a melatonina era feito no início da

lactação e as amostras de sangue foram coletadas de todas as ovelhas, cinco dias depois do parto, com quatro sessões de coleta em intervalos de 10 dias, durante 40 dias, logo após o por do sol. Isso mostrou que o tratamento com melatonina, no início da lactação reduziu a secreção da prostaglandina, durante a maior parte do período, apesar do forte estímulo induzido pela sucção. Portanto Parece existir uma relação muito forte entre melatonina, prostaglandina e hormônio do crescimento, indicando que o fotoperíodo induz um sinal bioquímico, ou seja, a melatonina é capaz de modificar a concentração dos outros hormônios envolvidos na produção de leite ⁴⁴.

A melatonina tem demonstrado possuir um efeito anti-inflamatório por meio de uma série de ações, reduzindo a destruição do tecido, durante reações inflamatórias, sendo sua capacidade de sequestrar radicais livres um protetor dos danos moleculares em todos os órgãos ⁴⁵. A administração via oral de melatonina para recém-nascidos com sepse reduziu as lesões em órgãos causadas pela reação inflamatória exagerada, melhorando suas taxas de sobrevivência ⁴⁶.

O tratamento com melatonina pode resultar em uma ampla gama de benefícios para a saúde, melhoria da qualidade de vida, reduzindo complicações no período neonatal e trazendo proteção contra lesões inflamatórias ⁴⁷.

Como a melatonina possui um efeito imunomodulador, durante a gravidez, sua secreção pode ser diferente, dependendo da via de parto. Porém, não existem estudos sobre o assunto, na literatura, que focaram a via de parto.

III.c. Citocinas no processo inflamatório e no parto

Vários aspectos na imunidade materna são alterados, durante a gravidez, entre os quais as concentrações de citocinas. Modulações significativas na expressão gênica de algumas citocinas ocorrem durante o terceiro trimestre e se alteram próximo ao parto, criando um padrão previamente inesperado em outras fases gestacionais ⁴⁸.

No terceiro trimestre, algumas citocinas tendem a aumentar de acordo com a duração do trabalho de parto ⁴⁹. Elas são importantes mediadores das respostas a estresse e infecção, como: 1L β , IL-6 e TNF. Essas citocinas são encontradas em vários tecidos e fluidos durante a gestação. A presença de mecanismos inflamatórios mostra uma grande associação, durante o início do trabalho de parto quando há um aumento desses marcadores nas parturientes ⁵⁰.

Diferentes fatores contribuem para o desencadeamento do trabalho de parto, que em modelos animais, é caracterizado por uma resposta inflamatória. Investigando a concentração de citocinas em animais, observou-se que TNF, 1L β e IL-6, durante a gestação e no momento do trabalho de parto, desempenham um papel importante ⁵¹.

O aumento dessas citocinas no líquido amniótico mostra ter relação com o trabalho de parto a termo ⁵². Em amostras colhidas do líquido amniótico, da placenta, do soro venoso do cordão umbilical, do soro da artéria umbilical e do soro materno, no momento da operação cesariana, foi observada correlação entre as citocinas das membranas fetais e as do líquido amniótico, concluindo-se que os tecidos internos, como nas membranas fetais, são a fonte principal de IL-1 β e IL-6 ⁵³.

Amostras de líquido amniótico são frequentemente usadas para a detecção de citocinas. Durante o parto vaginal a termo de parturientes saudáveis, foi realizado um bioensaio sensível para detectar a presença de TNF, sendo identificado o papel fisiológico do TNF na placenta e no líquido amniótico ⁵⁴.

O envolvimento dessas citocinas na placenta tem sido identificado também nos partos prematuros, ficando claro que o processo inflamatório está envolvido, tanto no parto a termo como no parto prematuro ²⁴. Estudos têm demonstrado que a infecção intrauterina pode provocar a interrupção da gravidez, bem como o aumento de secreção de citocinas ⁵⁵.

Grande parte dos partos prematuros é desencadeado pelo aumento do estado pró- inflamatório do organismo, causado por infecções bacterianas ⁵⁶.

A associação na produção de citocinas e o hormônio do crescimento em amostras do soro de gestação de baixo risco, colhidas antes da anestesia, três

dias após o parto vaginal e três dias após a operação cesariana eletiva, mostram que IL-6 e a IL-8 diminuíram significativamente após o parto, e apenas a interleucina 7 ficou alterada em pacientes que foram submetidas a operação cesariana. As pacientes não apresentaram aumento do risco de resposta inflamatória prolongada, independente se submetidas à operação cesariana ou se evoluíram para parto vaginal ⁵⁷.

Citocinas foram pesquisadas em parturientes saudáveis que evoluíram para parto vaginal e naquelas que foram submetidas à operação cesariana eletiva. Verificou-se que parturientes que evoluíram para parto vaginal tiveram aumento na produção de várias citocinas, como a IL-6 e a IL-1 β e TNF, as quais estão associadas com a imunidade neonatal por meio de diferentes mecanismos ¹⁷.

Outro estudo avaliou a participação da IL-6 na resposta de infecção intrauterina, em gestantes em trabalho de parto prematuro, colhido no líquido amniótico de gestantes no terceiro trimestre, em trabalho de parto a termo e trabalho de parto pré- termo. Os níveis de IL-6 estavam mais elevados em gestantes que tiveram trabalho de parto pré termo, sendo assim a IL-6 um fator prognóstico para tratamento das mulheres com parto prematuro (58, 59) Na infecção intraamniótica a IL-6 tinha altas concentrações, podendo assim auxiliar no diagnóstico de trabalho de parto prematuro, já que maiores concentrações de IL-6 estão presentes nesta situação ^{60, 61}.

Comparações feitas em diferentes fases do trabalho de parto prematuro e trabalho de parto a termo para diagnosticar infecção intra-uterina com altas concentrações de IL-6 mostraram que aquelas que tiveram parto prematuro apresentavam níveis elevados de IL-6 e também que esse fato estava associado com a infecção intrauterina ⁶².

A avaliação de pacientes em trabalho de parto a termo e em trabalho de parto prematuro permitiu observar que a invasão microbiana na cavidade amniótica está associada à ativação de citocinas, pela detecção de TNF ⁶³.

Em estudo sobre a participação das citocinas IL-1 β IL-6 e TNF, durante o processo de parto vaginal, em mulheres hípidas, observou-se que, durante o parto e até 2 horas após, a IL-6 tem um papel importante no parto vaginal. Já IL-1 β e o fator de necrose tumoral não foram detectados ⁶⁴.

Foi demonstrada a atividade biológica do TNF no leite humano tendo sido parcialmente bloqueada por anticorpos contra o TNF. Mostrando que a atividade desta citocina no leite humano exerce efeito no sistema imunológico do bebê e na glândula mamária da mãe ⁶⁵.

Durante a gravidez e o trabalho de parto, algumas citocinas têm papel fundamental, na defesa contra agentes infecciosos ⁴⁹.

Este trabalho fornece uma oportunidade *in vivo*, da possível interação das citocinas, no momento do parto, em uma condição fisiológica em que se tem conhecimento da participação de uma resposta imunológica.

III.c.1. Fator de necrose tumoral (TNF)

Fator de necrose tumoral é uma citocina pró- inflamatória produzida principalmente por macrófagos ativados, bem como por monócitos e neutrófilos, em resposta a vários estímulos como produtos bacterianos, vírus e complexos imunes. Essa citocina tem diversas funções, como a capacidade de inibir a proliferação de células amnióticas, estimular a síntese de prostaglandinas, induzir à morte programada de células (apoptose) e estimular a produção de enzimas que degradam a matriz extracelular ⁶⁶.

O aumento de TNF no líquido amniótico sugere a participação fisiológica dessa citocina, durante o parto, uma vez que a sua concentração média, em mulheres em trabalho de parto a termo, é significativamente maior que aquelas fora de trabalho de parto. Esse papel fisiológico poderia estar relacionado com o estímulo para produção de prostaglandinas, indução de apoptose e estímulo para degradação da matriz extracelular, promovendo a ruptura de membranas e a dilatação cervical ⁶⁶. A concentração de citocinas inflamatórias em secreção cérvico-vaginal aumenta durante o trabalho de parto a termo, atingindo um pico quando a dilatação cervical é completada ²⁴. Os níveis de TNF na secreção cérvico-vaginal aumentam acentuadamente após a ruptura de membranas ⁶⁷. Pouco se conhece sobre os efeitos sistêmicos dessas alterações durante o trabalho de parto.

A expressão de RNAm para TNF em amostras de sangue total não sofre grandes alterações, durante a gestação, sendo maiores que em mulheres não grávidas. Vários estudos indicam a participação de TNF em mecanismos do parto associados à infecção ⁶³, sendo essa citocina associada a condições patológicas de parto pré-termo ou abortos recorrentes. Poucos trabalhos avaliam a variação sérica materna desta citocina, no momento do parto, em busca de um marcador para alterações pré-natais.

III.c.2. Interleucina 1 beta (IL-1 β)

Em resposta a alterações infecciosas e imunológicas, ocorre rápida produção de IL-1 β , que atua em várias células, promovendo a síntese de outras citocinas (TNF e IL-6) e outros mediadores de inflamação. A IL-1 β pode: estar relacionada com a proliferação, ativação e migração de leucócitos; estimular modificações nas proteínas da matriz extracelular; provocar efeitos mitogênicos e citotóxicos; causar febre e ativar a resposta de fase aguda; promover a formação de prostaglandinas no miométrio, decídua e membranas fetais. Antes do início do trabalho de parto, na presença de membranas intactas, não se detecta IL-1 β no fluido amniótico. Durante o trabalho de parto espontâneo a termo, sua presença pode ser constatada em amostras coletadas por amniocentese transabdominal ou transuterina, com concentrações de 100 a 5000 pg/ml. A produção de IL1 β pode ser relacionada a fagócitos mononucleares ou neutrófilos ativados e recrutados para o líquido amniótico, após o início do trabalho de parto, quando ocorre a dilatação cervical e a

formação da bolsa amniótica, expondo as células decíduas na região vaginal ²⁵. Assim, o aumento das concentrações de IL-1 β (bem como TNF) no líquido amniótico poderia variar e estar correlacionado com a infiltração de granulócitos na placenta ⁶⁷.

III.c.3. Interleucina 6 (IL-6):

A IL-6 é uma citocina que tem importante papel como mediador de resposta à infecção ao dano tecidual(68). A expressão do gene da IL-6 é induzida por diversas citocinas associadas à inflamação, incluindo IL-1 β e TNF ^{69, 70}.

Os tipos de células capazes de secretar IL-6 em uma resposta são: fibroblastos, monócitos, macrófagos, células endoteliais, queratinócitos e células do estroma endotelial ^{71, 72}.

A citocina é capaz de provocar mudanças nos parâmetros bioquímicos e fisiológicos e reduzir os efeitos sistêmicos de infecção e lesão tecidual ^{70, 71, 73}.

Estudos clínicos indicaram a elevação de IL-6, durante o trabalho de parto como fator preditor para parto prematuro ⁶⁰. Em um estudo com RNAm de IL-6 demonstra que raramente ele pode ser detectado em tecidos antes do início do trabalho de parto ⁷⁴. Sua presença no momento do parto poderia ser detectada no soro materno, com o início de uma evolução natural do trabalho de parto sem complicações, mostrando ser um possível marcador de alterações nos mecanismos envolvidos no amadurecimento cervical.

III.d. Via de parto

III.d.1. Parto vaginal

O parto é caracterizado por contrações do miométrio, cujas principais funções são a dilatação cervical e a expulsão do feto pelo canal de parto. Essas contrações são dolorosas, porém, antes do seu início, o útero sofre modificações fisiológicas e bioquímicas locais juntamente com o aumento da frequência de contrações indolores (contração de Braxton –Hicks), até se inicie a fase ativa do trabalho de parto^{75, 76}.

O diagnóstico de trabalho de parto está condicionado à presença de contrações uterinas com ritmo e características peculiares, combinadas a alterações progressivas do colo uterino (esvaecimento e dilatação) e a formação da bolsa d'água. O feto é expulso do útero pelo canal de parto por meio da ação conjugada das contrações uterinas e das contrações voluntárias dos músculos abdominais (puxos)⁷⁷.

III.d.2. Parto por cesárea

No parto que ocorre por operação cesariana, ou cesárea, o nascimento se dá por meio de incisão cirúrgica abdominal, ou seja, laparotomia e incisão uterina (histerotomia). Entre as indicações para esse procedimento, esta a apresentação fetal pélvica^{78, 79}. Acrescentam-se a isso os procedimentos da medicina reprodutiva, que resultam em incremento das gestantes que adentram o grupo de alto risco (gestação múltipla, idade materna avançada, etc.), levando

ao crescimento das indicações operatórias e outros fatos que emergem para explicar o aumento na taxa de cesáreas: diminuição da prole, retardamento da maternidade, indução do parto e a obesidade gestacional ⁸⁰. As indicações para essa cirurgia devem obedecer ao critério do melhor interesse à saúde do binômio materno-fetal.

CASUÍSTICA E MÉTODO

IV.a. Tipo de estudo

Trata-se de estudo observacional prospectivo em que foram realizadas coletas de sangue da veia umbilical e de veia periférica materna, após o parto no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, no período de 20/03/2010 à 20/09/2010.

IV.b.1. Seleção das pacientes

As pacientes foram divididas em grupos, parto vaginal e operação cesariana, além da subdivisão, em 5 blocos de horários:

1. 07h00 - 11h00
2. 11h00 - 15h00
3. 15h00 - 19h00
4. 19h00 – 23h00
5. 23h00 - 03h00

IV.b.1.1. Critérios de inclusão

As amostras foram coletadas no Centro Obstétrico do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (USP) de pacientes que apresentaram os seguintes critérios de inclusão:

- Gestação única com feto vivo;

- Idade gestacional de 37 a 40 semanas 6 dias;
- Pacientes em trabalho de parto que evoluíram para parto vaginal ou cesárea;
- Ausência de suspeita de sofrimento fetal, prematuridade, restrição de crescimento fetal, malformações fetais;
- Ausência de mecônio;
- Ausência de ruptura prematura das membranas ovulares;
- Ausência de doenças maternas como hipertensão arterial crônica, doença hipertensiva específica da gestação, cardiopatias, corioamnionite, pneumopatias, anemias, ausência de história de tabagismo e/ou etilismo;
- Ausência de evidência clínica de infecção materna;
- Concordância com o termo de consentimento Livre e Esclarecido do protocolo de pesquisa- Anexo-A, aprovado pela comissão de Ética do Hospital Universitário de São Paulo (COMEP-HU).

IV.b.1.2. Critério de exclusão

- Diagnóstico de restrição de crescimento fetal após o parto;
- Presença de anomalias fetais congênitas não identificadas no pré-natal;
- Presença de infecção materna ou neonatal diagnosticadas

após o parto;

- Operação cesariana eletiva (iterativa).

IV.c. Método

IV.c.1. Coleta do Material

Foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue da veia do cordão umbilical, logo após o parto, e da veia braquial da mãe aproximadamente 1 hora após o parto. As amostras foram levadas para o laboratório do Hospital Universitário e centrifugadas (160xg, 10 minutos), aliquotadas em tubos contendo 1mL do soro de cada amostra, as amostras, sendo nomeadas como SORO CORDÃO (soro da artéria umbilical) e SORO MÃE (soro da veia braquial) e foram estocados em -80°C até o momento das dosagens.

IV.c.2. Dosagem de melatonina do soro

As dosagens foram realizadas pelo método ELISA (do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando-se *kit* comercial (IBL, Hamburgo, Alemanha). Esse ensaio baseia-se na competição entre a melatonina das amostras e melatonina biotinilada pelo anticorpo específico presente na placa. A quantidade de melatonina biotinilada ligada ao anticorpo foi determinada pela adição de um anticorpo anti-biotina acoplado a enzima fosfatase alcalina, cuja

atividade forma um produto colorimétrico, detectado por espectrofotômetro a 450 nm (SpectraMax 250, Molecular Devices, CA, EUA). A quantidade de melatonina biotinilada é inversamente proporcional à quantidade de melatonina nas amostras. A quantificação das amostras é realizada por interpolação dos valores em uma curva-padrão. O limite de detecção do *kit* é de 4,0 pg/mL.

IV.c.3. Dosagem de TNF do soro

As dosagens foram realizadas pelo método ELISA (do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando-se *kit* comercial (eBioscience, Inc. San Diego, CA, EUA). Este ensaio baseia-se na ligação do TNF das amostras a um anticorpo de captura específico para o TNF humano (MAB1) previamente aderido à placa de dosagem. A quantidade de TNF presente na amostra é determinada pela adição de um anticorpo de detecção anti-humano TNF (MAB11) biotinilado e de uma enzima peroxidase associada à avidina (avidina-HRP, do inglês *Horseradish Peroxidase*). A atividade da enzima sob a biotina forma um produto colorimétrico que é medido por espectrofotômetro a 450 nm (SpectraMax 250, Molecular Devices, CA, EUA). A quantificação das amostras é realizada por interpolação dos valores em uma curva-padrão. O limite de detecção do *kit* é de 16 pg/mL.

IV.c.4. Dosagem de IL-1 β do soro

As dosagens foram realizadas pelo método ELISA (do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando-se *kit* comercial (eBioscience, Inc. San

Diego, CA, EUA). Este ensaio baseia-se na ligação do IL-1 β , das amostras a um anticorpo de captura específico para o IL-1 β previamente aderido à placa de dosagem. A quantidade de IL-1 β presente na amostra é determinada pela adição de um anticorpo de detecção anti-humano IL-1 β biotinilado e de uma enzima peroxidase associada à avidina (avidina-HRP, do inglês *Horseradish Peroxidase*). A atividade da enzima sob a biotina forma um produto colorimétrico que é medido por espectrofotômetro a 450 nm (SpectraMax 250, Molecular Devices, CA, EUA). A quantificação das amostras é realizada por interpolação dos valores em uma curva-padrão. O limite de detecção do *kit* é de 4 pg/mL.

IV.c.5. Dosagem de IL-6 do soro

As dosagens foram realizadas pelo método ELISA (do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando-se *kit* comercial (eBioscience, Inc. San Diego, CA, EUA). Esse ensaio baseia-se na ligação do IL-6 das amostras a um anticorpo de captura específico para o IL-6 previamente aderido à placa de dosagem. A quantidade de IL-6 presente na amostra é determinada pela adição de um anticorpo de detecção anti-humano IL-6 biotinilado e de uma enzima peroxidase associada à avidina (avidina-HRP, do inglês *Horseradish Peroxidase*). A atividade da enzima sob a biotina forma um produto colorimétrico que é medido por espectrofotômetro a 450 nm (SpectraMax 250,

Molecular Devices, CA, EUA). A quantificação das amostras é realizada por interpolação dos valores em uma curva-padrão. O limite de detecção do *kit* é de 2 pg/mL.

IV.d. Análise estatística

Como não existe dado na literatura sobre a associação dessas substâncias com a via de parto, o tamanho amostral foi calculado empiricamente usando-se os resultados obtidos no estudo em colostro, considerando um poder estatístico de 80% e um erro alfa de 5%. Estimou-se um tamanho amostral de 50 pacientes, o que foi confirmado pelos resultados do presente estudo.

Os dados clínicos e obstétricos foram inicialmente usados para descrever as características da população estudada. Os seguintes dados foram descritos: idade materna, idade gestacional no parto, paridade, tempo de trabalho de parto, tempo de amniotomia, indicação da operação cesariana e peso dos recém-nascidos. Para confirmar similaridade entre os grupos (“Parto Vaginal” versus “Operação cesariana”), foram realizados os testes *t* de student e o Mann-Whitney U (SPSS versão 17; Microsoft Corporation; Chicago, IL, USA).

As dosagens de citocinas e de melatonina foram apresentadas em pg/mL. A comparação entre os grupos (parto vaginal e operação cesariana) foi realizada por análise de variância (two way ANOVA). Utilizou-se o teste (*t* de student) para fazer as comparações entre os locais de coleta (veia do cordão

umbilical e veia braquial) em parturientes que evoluíram ao parto vaginal e aquelas que foram submetidas a operação cesariana. As análises de correlação foram realizadas para avaliar se as concentrações de melatonina e de citocinas eram semelhantes entre amostras obtidas da veia do Cordão umbilical e da veia braquial (Parto vaginal e operação cesariana) com o coeficiente de correlação de Pearson, que mede o grau da correlação (e a direção dessa correlação - se positiva ou negativa) entre duas variáveis quantitativas. E foi feita a correlação entre os níveis de melatonina com as diferentes citocinas nas amostras obtidas entre as 23hs e 03hs da veia do cordão umbilical e da veia braquial (parto vaginal e operação cesariana) com o coeficiente de correlação de Pearson, que mede o grau da correlação (e a direção dessa correlação - se positiva ou negativa) entre duas variáveis quantitativas.

A regressão linear simples foi usada para examinar a correlação entre melatonina e as citocinas (TNF, IL-6 e IL-1 β), as análises foram realizadas com o programa Graph Pad Prism versão 4.0.

Foi considerada diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

IV.e. Característica da população estudada

No presente estudo, foram avaliadas 50 parturientes no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, das quais 25 evoluíram para parto vaginal e 25, para operação cesariana. Todas as pacientes incluídas no

presente estudo iniciaram trabalho de parto espontaneamente. Em nenhum caso, houve infecção materna nem neonatal. A idade maternal foi em média $26,0 \pm 6,7$ anos. A idade gestacional no parto foi em média $39,5 \pm 1,7$ semanas. O peso médio dos recém-nascidos foi $3366,5 \pm 340,2$ gramas. Todos os casos receberam analgesia durante o parto (analgesia combinada, peridural e raquianestesia). A maioria das pacientes eram nulíparas (31/50 - 62,0%). As indicações de operação cesariana foram: distocia funcional (n=14; 56,0%), e desproporção céfalo-pélvica (n=11; 44,0%) sendo que 4 casos foram macrossômicos. A duração média do trabalho de parto foi de $8,0 \pm 4,4$ horas. Amniotomia artificial foi realizada em 34 parturientes (68,0%).

RESULTADOS

No período do estudo, foram avaliadas 50 parturientes, sendo que 25 evoluíram ao parto vaginal e 25 a operação cesariana. Os grupos foram separados em diferentes blocos de horários ao longo do dia, 07h00-11h00; 11h00-15h00; 15h00-19h00; 19h00-23h00; 23h00-03h00. Para cada um dos blocos, foram coletadas amostras de 5 parturientes, o que facilitou a classificação do material, de acordo com intervalos de tempo fixos em relação à hora do parto.

Foram dosadas citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF) e o hormônio melatonina no sangue colhido da veia do cordão umbilical (chamado nas figuras de VCU) e da veia braquial (chamados nas figuras de VB). Uma hora após o parto, permitindo a avaliação do perfil das citocinas ao longo do tempo.

V.a. Resultados gerais: comparação clínica entre os grupos

Ambos os grupos (“Parto vaginal” e “Operação cesariana”) apresentavam características obstétricas similares (Tabela 1).

Tabela 1. Dados clínicos e obstétricos das parturientes em ambos os grupos:

	Grupo Parto Vaginal (n=25)	Grupo Operação cesariana (n=25)	p
Idade materna em anos – média e desvio padrão	26,8 ± 7,1	25,1 ± 6,3	0,93
Nulipara - N (%)	14 (56,0%)	18 (72,0%)	0,27
Idade gestacional no parto em semanas - média e desvio padrão	39,1 ± 1,3	39,9 ± 1,3	0,84
Duração do trabalho de parto em horas - média e desvio padrão	7,6 ± 4,4	8,2 ± 4,4	0,87
Tempo de amniotomia em horas - média e desvio padrão	4,1 ± 3,1	4,3 ± 2,7	0,40
Peso do recém-nascido em gramas - média e desvio padrão	3280,8 ± 280,4	3350,8 ± 378,4	0,35

V.b. Dosagens de melatonina e citocinas de acordo com a via de parto

Os resultados gerais comparando as dosagens de melatonina e citocinas na VCU e na VB entre os grupos “Parto vaginal” e “Operação cesariana” estão apresentados na tabela 2.

Parturientes que evoluíram ao parto vaginal apresentaram tendência de maior dosagem de melatonina que àquelas que foram submetidas à operação cesariana, apesar de esse resultado não ter sido estatisticamente significativo. Por outro lado, pacientes submetidas à operação cesariana apresentaram maiores dosagens de TNF na VB, IL-1 β na VCU e na VB e IL-6 na VCU (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação entre as médias ($\pm$ EPM) das concentrações de melatonina e de citocinas observadas na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB) em amostras colhidas de parturientes que evoluíram ao parto vaginal e parturientes que foram submetidas à operação cesariana (n=50 – março a setembro de 2010 - HU-USP).

	Grupo Parto Vaginal (n=25)	Grupo Operação cesariana (n=25)	P
Melatonina na VCU - média, EPM	29,6 $\pm$ 0,41	22,6 $\pm$ 5,9	0,41
Melatonina na VB - média, EPM	41,1 $\pm$ 7,7	29,1 $\pm$ 6,7	0,16
TNF na VCU - média, EPM	13,5 $\pm$ 3,4	8,6 $\pm$ 2,2	0,18
TNF na VB - média, EPM	7,5 $\pm$ 2,5	14,2 $\pm$ 4,7	0,02
IL-1β na VCU - média, EPM	11,1 $\pm$ 2,7	21,5 $\pm$ 5,2	<0,01
IL-1β na VB - média, EPM	9,0 $\pm$ 2,3	24,9 $\pm$ 6,0	<0,01
IL-6 na VCU - média, EPM	3,9 $\pm$ 0,5	20,8 $\pm$ 3,5	<0,01
IL-6 na VB - média, EPM	17,3 $\pm$ 2,7	11,8 $\pm$ 2,1	0,27

V.c. O ritmo diário da melatonina e das citocinas ao longo do dia

As dosagens de melatonina indicam uma variabilidade dentre os horários no grupo de parturientes que evoluíram ao parto vaginal, sendo observado um aumento entre 23 e 3 horas, tanto no soro colhido da veia do cordão umbilical (figura 1) quanto o da veia braquial. As parturientes que foram submetidas à operação cesariana não apresentaram alterações significativas nos diferentes horários. Em relação às amostras colhidas do cordão umbilical e da veia braquial, não foram observadas diferenças significativas, tanto no parto vaginal quanto na operação cesariana. Comparando as amostras em relação ao local de coleta, não se observou significância estatística tanto em parturientes que evoluíram ao parto vaginal quanto aquelas que foram submetidas à operação cesariana (Tabela 3).

Figura 1: Variação de melatonina (pg/ml) média $\pm$ EPM observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB). Círculos representam amostras colhidas do cordão umbilical e quadrados, da veia braquial. Símbolos verdes representam amostras de parturientes que evoluíram ao parto vaginal e símbolos vermelhos daquelas que foram submetidas à operação cesariana. Os dados foram segregados de acordo com a hora do parto apresentados no eixo X (n=5 amostras para cada um dos pontos) – março a setembro de 2010 (HU-USP), * = representam variações significativas entre outros horários do mesmo grupo ($p < 0,05$).

Tabela -3 Média $\pm$ EPM da concentração de melatonina observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB) em amostras colhidas de parturientes que evoluíram ao parto vaginal e daquelas que foram submetidas à operação cesariana (ANOVA). Comparando a amostra em relação ao local do soro da veia do cordão umbilical e soro da veia braquial de parturientes que evoluíram ao parto vaginal e daquelas que foram submetidas à operação cesariana (t de student) (n=5 amostras para cada um dos pontos) – março a setembro de 2010 (HU-USP).

Horário	Vaginal		Cesárea		Vaginal x cesarea	Vaginal x cesarea
	VCU Média ($\pm$ EPM)	VB Média ($\pm$ EPM)	VCU Média ($\pm$ EPM)	VB Média ($\pm$ EPM)	VCU P	VB P
07-11h	37,64 $\pm$ 13,62	31,57 $\pm$ 10,10	23,49 $\pm$ 3,33	21,99 $\pm$ 3,24	0,18	0,2
11-15h	29,83 $\pm$ 5,51	38,88 $\pm$ 12,34	38,90 $\pm$ 15,01	21,33 $\pm$ 9,71	0,29	0,14
15-19h	19,72 $\pm$ 4,46	30,56 $\pm$ 16,01	13,89 $\pm$ 1,43	16,06 $\pm$ 4,32	0,13	0,21
19-23h	24,30 $\pm$ 8,09	27,32 $\pm$ 9,07	35,15 $\pm$ 22,23	24,29 $\pm$ 7,69	0,33	0,4
23-03h	58,03 $\pm$ 21,04	77,29 $\pm$ 27,35	36,73 $\pm$ 13,46	32,42 $\pm$ 13,37	0,21	0,09

A figura 2 mostra a variação do TNF ao longo do dia, indicando parturientes que evoluíram para o parto vaginal e as parturientes que foram submetidas à operação cesariana apresentaram algumas variações entre as amostras, as quais estas não foram estatisticamente significativas quando comparadas aos diferentes horários. Nas amostras colhidas entre 19hs e 23hs de parturientes que evoluíram ao parto vaginal, as concentrações de TNF foram maiores nas amostras obtidas do cordão umbilical em relação às àquelas encontradas na veia braquial. A Comparação das amostras em relação ao local de coleta mostrou não ter correlação estatisticamente significativa nas parturientes que evoluíram ao parto vaginal como nas que foram submetidas à operação cesariana (Tabela 4).

Figura 2: Variação de TNF (pg/ml) média $\pm$ EPM observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB). Círculos representam amostras colhidas do cordão umbilical e quadrados, amostras colhidas da veia braquial. Símbolos verdes representam amostras de parturientes que evoluíram ao parto vaginal e símbolos vermelhos, amostras que foram submetidas à operação cesariana. Os dados foram segregados de acordo com a hora do parto apresentados no eixo X (n=5 amostras para cada um dos pontos) – março a setembro de 2010 (HU-USP), * = representa diferenças estatísticas entre as amostras de VCU e VB de parturientes que evoluíram ao parto vaginal do grupo 19hs-23hs ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Média $\pm$ EPM da concentração de TNF observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB) em amostras colhidas de parturientes que evoluíram ao parto vaginal e parturientes que foram submetidas à operação cesariana (ANOVA), comparando a amostra em relação ao local soro da veia do cordão umbilical e soro da veia braquial entre parturientes que evoluíram ao parto vaginal e as que foram submetidas a operação cesariana (t de student)(n=5 amostras para cada um dos pontos) – março a setembro de 2010 (HU-USP).

Horário	Vaginal		Cesárea		Vaginal x cesarea	Vaginal x cesarea
	VCU	VB	VCU	VB	VCU	VB
	Média ($\pm$ EPM)	Média ($\pm$ EPM)	Média ($\pm$ EPM)	Média ($\pm$ EPM)	P	P
07-11h	9,92 $\pm$ 2,97	4,67 $\pm$ 1,18	8,86 $\pm$ 4,06	19,03 $\pm$ 14,79	0,41	0,19
11-15h	7,49 $\pm$ 2,01	4,41 $\pm$ 1,24	4,58 $\pm$ 1,08	4,99 $\pm$ 1,29	0,12	0,37
15-19h	5,91 $\pm$ 2,55	7,33 $\pm$ 2,01	4,00 $\pm$ 0,49	3,36 $\pm$ 0,91	0,25	0,06
19-23h	29,57 $\pm$ 13,90	4,42 $\pm$ 0,94	4,21 $\pm$ 0,27	17,70 $\pm$ 10,62	0,07	0,13
23-03h	14,67 $\pm$ 5,77	16,71 $\pm$ 13,78	21,45 $\pm$ 8,42	25,98 $\pm$ 15,38	0,26	0,33

Em relação à variação de IL-1 β (figura 3), ao longo do dia, observa-se um ritmo da citocina apenas nas parturientes submetidas à operação cesariana, sendo os níveis máximos detectados nos grupos das 15hs-19hs e das 19hs-23hs. Não foram observadas diferenças significativas entre as amostras colhidas de cordão umbilical e veia braquial em cada um dos tipos de parto. Comparando as amostras em relação ao local de coleta, observou-se que parturientes submetidas à operação cesariana apenas entre 19hs e 23hs, apresentam concentrações maiores de IL-1 β do que aquelas que evoluíram ao parto vaginal, no mesmo horário, tanto nas amostras do soro da veia do cordão umbilical como nas amostras da veia braquial (Tabela 5).

Figura 3 - Variação de IL-1 β (pg/ml) média $\pm$ EPM observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB). Círculos representam amostras colhidas do cordão umbilical e quadrados, amostras colhidas da veia braquial. Símbolos verdes representam amostras de parturientes que evoluíram ao parto vaginal e símbolos vermelhos, amostras que foram submetidas à operação cesariana. Os dados foram segregados de acordo com a hora do parto apresentados no eixo X (n=5 amostras para cada um dos pontos). * = (p<0,05) ** = (P<0,001) representam diferenças significativas entre os tipos de parto em relação ao local de coleta (ex: VCU versus VCU) – março a setembro de 2010 (HU-USP).

Tabela 5 - Média $\pm$ EPM da concentração de IL-1 β observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB) em amostras colhidas de parturientes que evoluíram ao parto vaginal e parturientes que foram submetidas à operação cesariana (ANOVA), comparando a amostra em relação ao local soro da veia do cordão umbilical e soro da veia braquial de parturientes que evoluíram ao parto vaginal e parturientes que foram submetidas a operação cesariana (t de student) (n=5 amostras para cada um dos pontos) – março a setembro de 2010 (HU-USP).

Horário	Vaginal		Cesárea		Vaginal x cesarea	Vaginal x cesarea
	VCU	VB	VCU	VB	VCU	VB
	Média ($\pm$ EPM)	Média ($\pm$ EPM)	Média ($\pm$ EPM)	Média ($\pm$ EPM)	P	P
07-11h	6,18 $\pm$ 0,33	6,80 $\pm$ 1,26	5,67 $\pm$ 0,90	5,46 $\pm$ 0,26	0,31	0,17
11-15h	11,05 $\pm$ 7,25	10,01 $\pm$ 1,76	7,36 $\pm$ 1,29	9,44 $\pm$ 2,01	0,32	0,41
15-19h	19,70 $\pm$ 8,99	16,36 $\pm$ 11,83	36,65 $\pm$ 15,48	34,23 $\pm$ 17,58	0,18	0,21
19-23h	12,61 $\pm$ 7,49*	5,51 $\pm$ 0,81*	52,67 $\pm$ 9,05	56,70 $\pm$ 12,90	0,04*	0,008*
23-03h	5,77 $\pm$ 0,52	6,34 $\pm$ 0,33	5,32 $\pm$ 0,15	5,61 $\pm$ 0,65	0,22	0,17

A variação de IL-6 (figura 4) nas parturientes que evoluíram ao parto vaginal não representa variação dessa citocina, tanto no soro da veia do cordão umbilical como da veia braquial. Já nas parturientes que foram submetidas à operação cesariana observam-se diferenças significativas apenas no horário das 07hs-11hs e das 15hs-19hs entre as dosagens realizadas no cordão umbilical e na veia braquial. Comparando a amostra em relação ao local soro da veia do cordão umbilical coleta observou que as maiores concentração de IL-6 foi nas parturientes que foram submetidas à operação cesariana nos horários de 7hs-11hs 15hs-19hs e 19hs-23hs (Tabela 6).

Figura 4 - Variação de IL-6 (pg/ml) média $\pm$ EPM observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB). Círculos representam amostras colhidas do cordão umbilical e quadrados, amostras colhidas da veia braquial. Símbolos verdes representam amostras de parturientes que evoluíram ao parto vaginal e símbolos vermelhos, amostras que foram submetidas à operação cesariana. Os dados foram segregados de acordo com a hora do parto apresentados no eixo X (n=5 amostras para cada um dos pontos) – HUFGMUSP- Março de 2010 a Setembro de 2010, *, ** = $p < 0,05$ e $p < 0,001$ entre as amostras obtidas de cordão umbilical e da veia braquial, respectivamente. * = representam diferenças significativas entre os tipos de parto em relação ao local de coleta ($p < 0,05$) (ex: VCU versus VCU) – março a setembro de 2010 (HU-USP).

Tabela 6 - Média $\pm$ EPM da concentração de IL-6 observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB) em amostras colhidas de parturientes que evoluíram ao parto vaginal e das que foram submetidas à operação cesariana (ANOVA), comparando a amostra em relação ao local, soro veia do cordão umbilical e soro da veia braquial de entre parturientes que evoluíram ao parto vaginal e as que foram submetidas à operação cesariana (t de student) (n=5 amostras para cada um dos pontos) – março a setembro de 2010 (HU-USP).

Horário	Vaginal		Cesárea		Vaginal x cesarea	Vaginal x cesarea
	VCU	VB	VCU	VB	VCU	VB
	Média ($\pm$ EPM)	Média ($\pm$ EPM)	Média ($\pm$ EPM)	Média ($\pm$ EPM)	P	P
07-11h	3,18 $\pm$ 0,69	24,59 $\pm$ 10,71	21,66 $\pm$ 3,30	4,18 $\pm$ 0,48	0,002*	0,06
11-15h	3,92 $\pm$ 0,88	10,82 $\pm$ 2,43	22,26 $\pm$ 10,68	11,27 $\pm$ 2,34	0,08	0,44
15-19h	2,78 $\pm$ 0,41	22,55 $\pm$ 6,17	29,74 $\pm$ 11,71	16,86 $\pm$ 4,85	0,04*	0,24
19-23h	5,49 $\pm$ 1,91	15,50 $\pm$ 4,08	22,34 $\pm$ 4,73	14,35 $\pm$ 8,61	0,009*	0,45
23-03h	4,17 $\pm$ 0,70	12,82 $\pm$ 2,60	8,06 $\pm$ 3,26	12,12 $\pm$ 3,26	0,15	0,43

V.d. Análise de correlação as concentrações de melatonina e de citocinas obtidas do soro da veia do cordão umbilical e do soro da veia braquial

Para avaliar se as concentrações de melatonina e de citocinas eram semelhantes entre as amostras obtidas do soro de cordão umbilical (VCU) e da veia braquial (VB), tornou-se necessário realizar análises de correlação entre esses grupos nos diferentes tipos de parto.

As análises de correlação de concentração de melatonina feitas entre amostras colhidas do soro da veia do cordão umbilical e veia braquial de

parturientes que evoluíram ao parto vaginal (figura 5) não apresentaram uma correlação estatisticamente significativa. Já as análises realizadas em parturientes que foram submetidas à operação cesariana, em amostras que foram colhidas do soro da veia umbilical e amostras colhidas da veia braquial, demonstraram uma correlação estatisticamente significativa.

Figura 5 - Correlação de melatonina (pg/ml) observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB). Círculos representam amostras colhidas do cordão umbilical e da veia braquial quando a parturiente evoluiu ao parto vaginal ($p = 0,34$) e quadrados vermelhos representam amostras colhidas da veia umbilical e da veia braquial quando a parturiente foi submetida à operação cesariana ($p = 0,002$) ($n=25$ parturientes para cada grupo) – março a setembro de 2010 (HU-USP).

Tanto entre as parturientes que evoluíram ao parto vaginal como entre as que foram submetidas à operação cesariana (figura 6), não foram observada correlação nos níveis de TNF entre o soro da veia do cordão umbilical e o soro da veia braquial, indicando que as concentrações dessa citocina não variam igualmente de acordo com o local de obtenção da amostra.

Figura 6 - Correlação de TNF (pg/ml) observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB). Círculos representam amostras colhidas do cordão umbilical e veia braquial, quando a parturiente evoluiu ao parto vaginal ($p = 0,45$) e quadrados vermelhos representam amostras colhidas da veia umbilical e veia braquial quando a parturiente foi submetida à operação cesariana ($p = 0,12$) ($n=25$ parturientes para cada grupo) – março a setembro de 2010 (HU-USP).

A análise de correlação das concentrações de IL-1 β (figura 7) entre o soro da veia do cordão umbilical e do soro da veia braquial demonstrou não ter nenhuma correlação em amostras colhidas de parturientes foram submetidas ao parto vaginal. Já, nas amostras de parturientes que foram submetidas à operação cesariana, observa-se uma correlação significativa entre o soro da veia do cordão umbilical e da veia braquial, ou seja, quando a concentração de IL-1 β estava aumentada no cordão umbilical, o mesmo fato se observava uma hora após o parto no soro da veia braquial das parturientes, mostrando, assim, uma correlação positiva.

Figura 7 - Correlação de IL-1 β (pg/ml) observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB). Círculos representam amostras colhidas do cordão umbilical e veia braquial, quando a parturiente evoluiu ao parto vaginal ($p = 0,35$) e quadrados vermelhos representam amostras colhidas da veia umbilical e veia braquial, quando a parturiente foi submetida à operação cesariana ($p = 0,001$) ($n = 25$ parturientes para cada grupo) – março a setembro de 2010 (HU-USP).

Na análise de correlação de IL-6 (figura 8), no soro da veia do cordão umbilical e no soro da veia braquial de parturientes que evoluíram ao parto vaginal e de parturientes que foram submetidas à operação cesariana, não se constatou correlação na concentração de IL-6. A concentração dessa citocina não varia igualmente, de acordo com o local de obtenção da amostra.

Figura 8 - Correlação de IL-6 (pg/ml) observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB). Círculos representam amostras colhidas do cordão umbilical e veia braquial, quando a parturiente evoluiu ao parto vaginal ($p = 0,56$) e quadrados vermelhos representam amostras colhidas da veia umbilical e veia braquial quando a parturiente foi submetida à operação cesariana ($p = 0,81$) ($n=25$ parturientes para cada grupo) – março a setembro de 2010 (HU-USP).

V.e. Análise de correlação entre as citocinas e a melatonina

Na próxima etapa do trabalho, correlacionamos os níveis de melatonina com as diferentes citocinas. Para tanto, utilizamos apenas as amostras obtidas entre as 23hs e 03hs por apresentarem níveis significativos de melatonina. Na análise de correlação entre o TNF e a melatonina (figura 9), no soro da veia do cordão umbilical e no soro da veia braquial em parturientes que evoluíram ao parto vaginal e naquelas submetidas à operação cesariana, observamos que as parturientes que evoluíram ao parto vaginal não apresentaram correlação significativa, já aquelas que foram submetidas à operação cesariana apresentaram uma correlação significativa no soro da veia braquial, ou seja, quanto menos TNF, menor a concentração de melatonina na veia braquial, uma hora após o parto.

Figura 9 - Correlação de melatonina (pg/ml) x TNF (pg/ml) observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB) de amostras obtidas de parturientes entre 23hs e 03hs. Círculos representam amostras colhidas do cordão umbilical e veia braquial, quando a parturiente evoluiu ao parto vaginal, e quadrados vermelhos representam amostras colhidas da veia umbilical e veia braquial, quando a parturiente foi submetida à operação cesariana ($p = 0,01$) (n=5 amostras para cada grupo) – março a setembro de 2010 (HU-USP).

A análise de correlação entre melatonina e IL-1 β (figura 10) no soro da veia do cordão umbilical e no soro da veia braquial de parturientes que evoluíram ao parto vaginal e parturientes submetidas à operação cesariana, não demonstrou correlação significativa nas parturientes que evoluíram ao parto vaginal, assim como para aquelas que foram submetidas à operação cesariana.

Figura 10 - Correlação de melatonina (pg/ml) x IL-1β (pg/ml) observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB) de amostras obtidas de parturientes entre 23hs e 03hs. Círculos representam amostras colhidas do cordão umbilical e da veia braquial, quando a parturiente evoluiu ao parto vaginal, e quadrados vermelhos representam amostras colhidas da veia umbilical e da veia braquial quando a parturiente foi submetida à operação cesariana (n=5 amostras para cada grupo) – março a setembro de 2010 (HU-USP).

As análises de correlações entre IL-6 e melatonina (figura 11), em parturientes que evoluíram ao parto vaginal, não foram observadas nenhuma correlação significativa. As correlações feitas em parturientes que foram submetidas à operação cesariana mostraram uma correlação estatisticamente significativa nas amostras obtidas do soro da veia braquial. Já na amostras da veia do cordão umbilical não foram estatisticamente significantes.

Figura 11 - Correlação de melatonina (pg/ml) x IL-6 (pg/ml) observada na veia do cordão umbilical (VCU) e na veia braquial (VB) de amostras obtidas de parturientes entre 23hs e 03hs. Círculos representam amostras colhidas do cordão umbilical e veia braquial, quando a parturiente evoluiu ao parto vaginal, e quadrados vermelhos representam amostras colhidas da veia umbilical e veia braquial, quando a parturiente foi submetida à operação cesariana ($p = 0,005$) ($n = 5$ amostras para cada grupo) – março a setembro de 2010 (HU-USP).

DISCUSSÃO

VI. Discussão

A partir da evidência de que um processo inflamatório pode estar envolvido com os mecanismos do parto, esse trabalho busca melhor compreender as diferenças no perfil inflamatório pela dosagem de citocinas (TNF, IL-1 β , IL-6) e na produção de melatonina na veia do cordão umbilical (VCU), logo após o parto, e, na parturiente, uma hora após o parto (VB), entre gestantes híginas, dependendo da via de parto: vaginal ou em operação cesariana. Neste estudo, pretendemos estabelecer associação de efeitos imunomoduladores da melatonina em relação ao parto vaginal e à operação cesariana.

No presente estudo, observamos tendência à redução da dosagem de melatonina no grupo de pacientes submetidas à operação cesariana. Além disso, pacientes submetidas à cesárea apresentaram aumento na concentração de TNF, após uma hora, de IL-1 β imediatamente e após uma hora da cirurgia e de IL-6, somente durante o parto.

É interessante notar que essas variações de citocinas se apresentaram somente nas pacientes submetidas à operação cesariana. Esse fato sugere a participação da melatonina na regulação da resposta imune (inflamatória) em pacientes que foram submetidas à cirurgia.

Em relação à melatonina, observamos pico em parturientes que evoluíram ao parto vaginal nas amostras colhidas da VCU (23hs-03hs). Isso

confirma que o hormônio melatonina produzido pela glândula pineal é responsável principalmente pela sinalização do ciclo claro-escuro ambiental, demonstrando que este é um hormônio em cuja maior produção é na fase escura ⁵. Muitos trabalhos têm mostrado que o parto acarreta diversas mudanças hormonais e psicológicas ²¹ podendo influenciar diversos fatores, como as semelhanças entre o processo inflamatório e o parto, uma vez que esse processo pode estar relacionado com mudanças fisiológicas que lembram inflamação ⁸¹.

Com relação a essa hipótese, podemos sugerir ter ocorrido o bloqueio da liberação desse hormônio (regulação negativa) nas parturientes que foram submetidas à operação cesariana, entre diferentes amostras, pois, coincidentemente, nesses mesmos horários, observamos picos de citocinas nessas parturientes ²⁶. Nas parturientes submetidas à operação cesariana não é observado o aumento da produção noturna de melatonina, reforçando que a produção deste hormônio estaria suprimida quanto da montagem de uma resposta inflamatória. E o eixo imune pineal em uma situação de montagem de resposta inflamatória suprime a produção noturna de melatonina ^{6, 7, 16}.

Alguns trabalhos buscam contribuir para o esclarecimento das funções biológicas, mostrando a atuação de algumas citocinas inflamatórias, como o TNF e o hormônio melatonina após o parto ¹⁶. Em nossos resultados, verificamos não haver diferença significativa na variação de TNF em parturientes que foram submetidas à operação cesariana. Já, nas que

evoluíram para o parto vaginal, constatamos variação dessa citocina, no horário das 19hs às 23hs logo após o parto, em amostras da veia do cordão umbilical também observamos que a mesma variação de TNF ocorreu em todas as parturientes. Podemos notar que essa variação em trabalhos em que a expressão de RNAm para TNF, está demonstrada em preparações de sangue total, não apresentou alterações significativas, durante a gestação, se encontrou levemente aumentada, logo após o parto, em relação a mulheres não grávidas ⁸². A comparação entre as amostras e o local de coleta mostrou não ter significância estatística. Há trabalhos que mostram que essa citocina não varia em diferentes tipos de parto ⁸³. Podemos resumir que no horário entre 19 e 23hs da coleta dessas amostras, as parturientes estavam com o sistema imunológico alterado, ou seja, mais sensível e que provavelmente exista mesmo uma relação entre secreção de melatonina e produção de TNF, de acordo com o tipo de parto. No parto vaginal, ambos se elevam proporcionalmente enquanto que nas pacientes submetidas à operação cesariana, ambos devam estar inibidos.

Inversamente, o ritmo circadiano de IL-1 β apresentou pico em parturientes que foram submetidas à operação cesariana no grupo das 15hs às 19hs e 19hs às 23hs, horários similares aos observados anteriormente para a melatonina e o TNF. Sendo assim, essas parturientes poderiam estar passando por algum estresse inflamatório o que poderia levar ao aumento dessas citocinas, em determinados horários ⁸⁴. O aumento de estresse e a demanda de

energia, durante o parto operatório, poderiam ser acompanhados por elevação dos níveis de alguns hormônios e citocinas⁸⁵. Também foi observado o ritmo de IL-6, cuja diferença estatística nas parturientes que foram submetidas à operação cesariana no horário das 07hs às 11hs e 15hs às 19hs nas amostras da veia do cordão umbilical.

Existem alguns trabalhos que demonstram a presença de citocinas durante a gestação e parto, boa parte deles feitos em amostras de líquido amniótico de pré-termo^{64, 66}. Também outros trabalhos mostram que em condição de infecção, ocorrem mudanças nas concentrações das citocinas⁸⁶. Como nossas pacientes eram saudáveis e as infecções maternas foram descartadas, as variações das citocinas poderiam ter sido causadas por outros fatores.

Estresses prévios ao parto, como ruptura prematura de membranas, doenças clínicas, prematuridade, também foram cuidadosamente excluídos no nosso estudo, não influenciando os resultados como observado em outro estudo onde mostra que sintomas de estresse e depressão prevê a uma exagerada resposta inflamatória⁸⁴.

Além disso, o tempo de trabalho de parto poderia ter sido um fator que poderia influenciar a secreção circadiana da melatonina e das citocinas no presente estudo. Porém, como o critério de inclusão principal foi a seleção de pacientes em trabalho de parto, excluindo cesáreas iterativas ou eletivas, uma

possível interferência nos resultados. No presente estudo, confirmamos que a duração do trabalho de parto foi estatisticamente semelhante entre as gestantes que evoluíram para o parto vaginal e aquelas que acabaram sendo submetidas à operação cesariana. Assim, nosso estudo apresenta evidência considerável de que a operação cesariana poderia ser considerada como um estresse inflamatório, com inibição da melatonina e do TNF, agudamente, após o parto (VCU), mas com elevação tardia do TNF (uma hora após o parto), aguda e tardia da IL-1 β e apenas tardia da IL-6.

Como mencionado anteriormente, o pico de melatonina foi totalmente diferente do que seria esperado fisiologicamente em mulheres não gestantes de acordo com o ciclo circadiano. Esse fato pode ser explicado pelo trabalho de parto e o parto propriamente dito terem ocorrido em Centro Cirúrgico com luz artificial constante. Podemos considerar que a exposição luminária artificial deva ter sido considerada semelhante em ambos os grupos, uma vez que, tanto no parto vaginal como na operação cesariana realizados no hospital em questão, os focos de luzes utilizados são semelhantes.

No presente estudo, avaliamos também a correlação da melatonina com as citocinas, de acordo com a via de parto. Nossos resultados confirmaram haver correlação entre melatonina e citocinas apenas no grupo de pacientes submetidas à operação cesariana. Esse fato sugere fortemente que a cesárea consiste em um estresse inflamatório para a paciente com participação direta da melatonina. Sabe-se que a operação cesariana está associada à maior

estresse que o parto vaginal, devido a ativação do componente inflamatório ⁷⁹. E sabendo que a melatonina apresenta efeitos antioxidantes e protetores para os tecidos ⁴⁵ e a ação pelos quais a melatonina poderia interferir nesse processo facilita a compreensão de como a melatonina, produzida por células imunocompetentes ativadas, atuaria de forma positiva no processo inflamatório. Já entre as parturientes que evoluíram ao parto vaginal não foi constatada nenhuma variação desse hormônio. Nossos resultados sugerem que o parto vaginal representa um estado fisiológico com menores repercussões inflamatórias que a operação cesariana. Trabalhos mostram que o parto vaginal parece ter menores alterações no processo inflamatório, em comparação a operação cesariana ⁸⁷.

A correlação entre a melatonina e as citocinas, nos faz supor que a operação cesariana tenha sido responsável pela ativação de processo inflamatório, com provável redução da melatonina, o que estaria associada à redução imediata de TNF e elevação imediata de IL-1 β . Posteriormente, ocorre manutenção da produção de IL-1 β , mas com ativação de produção tardia de TNF e de IL-6. Nossos resultados mostraram correlação significativa entre concentrações de melatonina e de citocinas ao longo do ciclo circadiano somente em pacientes submetidas à operação cesariana. Isso significa que a operação cesariana causou resposta inflamatória, levando à redução da melatonina e elevação das citocinas, no mesmo período do dia.

Com isso, nosso estudo sugere que a operação cesariana representa um estresse inflamatório para a parturiente, culminando com alteração na produção de melatonina e citocinas.

O presente estudo não teve como objetivo avaliar as repercussões clínicas e obstétricas da resposta imune, dependendo da via de parto. Novos estudos são necessários para avaliar as repercussões das alterações na produção de melatonina e de citocinas na operação cesariana para a parturiente (puérpera) e para o recém-nascido durante o processo de aleitamento materno.

CONCLUSÕES

VII. Conclusões

1. Houve tendência de dosagens menores de melatonina tanto em VCU como na VB de pacientes submetidas à operação cesariana, porém sem significância estatística;
2. Observou-se aumento significativo das dosagens de citocinas (de TNF na VB, de IL-1 β na VCU e na VB e de IL-6 na VCU) em pacientes submetidas à operação cesariana;
3. A dosagem de melatonina se correlacionou significativamente com dosagens de TNF na VB, de IL-1 β na VCU e na VB e de IL-6 na VCU em pacientes submetidas à operação cesariana, sugerindo regulação desse hormônio na resposta imune após a cirurgia.

ANEXOS

Anexo A

São Paulo, 11 de dezembro de 2009.

Il^{ma}(a) S^{ra}(a)

Dr. Rodrigo Ruano

Divisão de Clínica Obstétrica do Hospital Universitário
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “Dosagens de citocinas e melatonina no sangue materno e fetal de acordo com a via de parto” - **Pesquisador(a) Responsável:** Dr. Rodrigo Ruano - **Co-Investigador(es):** Priscila Fabiane dos Santos Beirigo, Eduardo Koji Tamura, Regina Pekelmann Markus, Prof. Dr. Marcelo Zugaib - **Registro CEP-HU/USP:** 952/09 – **SISNEP CAAE:** 0070.0.198.000-09

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 11 de dezembro de 2009, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO** bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, inciso IX.2, letra “c”.

O primeiro relatório está previsto para 11 de dezembro de 2010.

Atenciosamente,

Dr. Mauricio Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

Anexo B

FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na 161ª reunião no dia 30 de junho de 2009, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado: **"DOSAGEM DE CITOCINAS E MELATONINA NO SANGUE MATERNO E FETAL DE ACORDO COM A VIA DE PARTO"**, dos seguintes pesquisadores: Priscila Fabiane dos Santos Beirigo, Rodrigo Ruano, Eduardo Koji Tamura, Regina Pekelmann Markus e Marcelo Zugaib.

São Paulo, 30 de junho de 2009.

Profa. Dra. ANGELA MAGGIO DA FONSECA
Presidente do Comitê de Ética do DOG-FMUSP

Prof. Dr. SEIZO MIYADAHIRA
Secretário do Comitê de Ética do DOG-FMUSP

APROVADO PELO CONSELHO
DO DOG EM 03/07/2009

ad referendum

PROF. DR. EDMUND CHADA BARACAT
Chefe do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Anexo C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**I. Título da pesquisa: Dosagem de citocinas e melatonina no sangue materno e fetal de acordo com a via de parto**

Pretendemos investigar se existem diferenças discretas na produção de hormônios durante o parto, dependendo se for um parto vaginal ou cesárea. Vamos estudar um hormônio que se chama melatonina, que é secretado normalmente por todas as pessoas, cuja secreção e função durante o parto são pouco conhecidas. Assim, gostaríamos de convidá-la a participar desse estudo, que consiste em colher seu sangue (10mL) e do cordão umbilical da placenta (5mL) logo após o parto vaginal ou cesárea. Não vamos colher sangue do seu bebê, não acarretando risco algum para ele. Para você, geralmente se colhe sangue da mãe durante o parto, o que também não acarretará riscos a mais. Como não se conhece a relação entre a quantidade de melatonina e o tipo de parto, não haverá resultado normal ou alterado. Assim, você será atendida pela equipe médica com os mesmos cuidados padronizados para todas gestantes em trabalho de parto no serviço, independentemente se você quiser ou não participar desse estudo. Participando desse estudo, você estará contribuindo com o nosso conhecimento em relação as alterações na produção de hormônio durante o parto. Você tem liberdade para desistir de sua participação na pesquisa, podendo deixar de participar do estudo a qualquer momento. Essa pesquisa tem duração de dois anos e asseguramos sua confidencialidade, sigilo e privacidade, pois os resultados desses exames e seu nome não serão divulgados. Estaremos a disposição para esclarecer eventuais dúvidas.

Os dados dos pesquisadores responsáveis são fornecidos abaixo.

Qualquer dúvida também pode ser questionada no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo: Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900 – São Paulo – SP - Telefones: 3091-9457 ou 3091-9479 - E-mail: cep@hu.usp.br

II. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DOS SUJEITOS DA PESQUISA

1. **Pesquisador executante:** Priscila Fabiane dos Santos BEIRIGO, 1663205-2, Divisão de Clínica Obstétrica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

2. **Pesquisador responsável:** Rodrigo RUANO, 24517841-7, Divisão de Clínica Obstétrica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

Endereço para contato: Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900 – São Paulo – SP – 4º andar – Divisão de Clínica Obstétrica. Telefones: 3091-9221 ou 30919277 - E-mail: rodrigor@hu.usp.br.

III. Declaração de participação no estudo por livre e espontânea vontade

Eu, Sra. _____,

RG _____, declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Projeto de Pesquisa.”;

São Paulo, _____ de _____ de 200 _____.

Sujeito da pesquisa

Pesquisador

REFERÊNCIAS

Referências:

1. Deslascio D, Guariento A. Conceito de prenhez: nomenclatura. In: Obstetrícia Normal Brinquet São Paulo: sarvier, 1987;(3):35-7.
2. Traina E, Daher S, Moron AF, Sun SY, Franchim CS, Mattar R. Polymorphisms in VEGF, progesterone receptor and IL-1 receptor genes in women with recurrent spontaneous abortion. Journal of Reproductive Immunology. 2011;88(1):53-7.
3. Weetman AP. The immunology of pregnancy. Thyroid. 1999;9(7):643-6.
4. Curry C. A perspective on developing emergency medicine as a specialty. Int J Emerge Med. 2008;1 (3):163-7.
5. Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. Pharmacological Reviews. 2003;55(2):325-95.

6. Markus RP, Ferreira ZS, Fernandes PACM, Cecon E. The immune-pineal axis: A shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation*. 2007;14(3-4):126-33.
7. Cruz-Machado SdS, Carvalho-Sousa CE, Tamura EK, Pinato L, Cecon E, Magno Fernandes PAC. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFkB pathway. *Journal of Pineal Research*. 2010;49(2):183-92.
8. Carvalho-sousa EC, Cruz-Machado SS, Tamura KE, Fernandes MP, Pinato L, Muxel S. Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosisfactor. 2011.
9. Nesin M, Cunningham-Rundles S. Cytokines and neonates. *American Journal of Perinatology*. 2000;17(8):393-404.
10. Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MMS, Markus RP. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *Journal of Pineal Research*. 2006;41(2):136-41.
11. Kumar P, Rathore B, Saxena AK, Purohit DC, Mathur N, Paul BN. Role of TNF-alpha in prenatal alterations in dams of mice under thermal stress. *Laboratory Animals*. 2006;40(2):172-9.

12. Nakamura Y, Tamura H, Kashida S, Takayama H, Yamagata Y, Karube A. Changes of serum melatonin level and its relationship to feto-placental unit during pregnancy. *Journal of Pineal Research*. 2001;30(1):29-33.
13. Kachi T, Tanaka D, Watanabe S, Suzuki R, Tonosaki Y, Fujieda H. Physiological pineal effects on female reproductive function of laboratory rats: Prenatal development of pups, litter size and estrous cycle in middle age. *Chronobiology International*. 2006;23(1-2):289-300.
14. Hamada F, Watanabe K, Wakatsuki A, Nagai R, Shinohara K, Hayashi Y. Therapeutic Effects of Maternal Melatonin Administration on Ischemia/Reperfusion-Induced Oxidative Cerebral Damage in Neonatal Rats. *Neonatology*. 2010;98(1):33-40.
15. Richter HG, Hansell JA, Raut S, Giussani DA. Melatonin improves placental efficiency and birth weight and increases the placental expression of antioxidant enzymes in undernourished pregnancy. *Journal of Pineal Research*. 2009;46(4):357-64.
16. Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MMS, Markus RP. Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after

cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *Journal of Pineal Research*. 2007;43:365-71.

17. Malamitsi-Puchner A, Protonotariou E, Boutsikou T, Makrakis E, Sarandakou A, Creatsas G. The influence of the mode of delivery on circulating cytokine concentrations in the perinatal period. *Early Human Development*. 2005;81(4):387-92.

18. Protonotariou E, Malamitsi-Puchner A, Giannaki G, Rizos D, Phocas I, Sarandakou A. Patterns of inflammatory cytokine serum concentrations during the perinatal period. *Early Human Development*. 1999;56(1):31-8.

19. Zanardo V, Solda G, Trevisanuto D. Elective cesarean section and fetal immune-endocrine response. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2006;95(1):52-3.

20. Olson DM, Mijovic JE, Sadowsky DW. Control of human parturition. *Seminars in Perinatology*. 1995;19(1):52-63.

21. Melville JL, Gavin A, Guo YQ, Fan MY, Katon WJ. Depressive Disorders During Pregnancy Prevalence and Risk Factors in a Large Urban Sample. *Obstetrics and Gynecology*. 2010;116(5):1064-70.

22. Driul I, Iondero A P, Salvador S , Fruscalzo A , Peris Bhatsa , Cistossi A , et al. Retrospective analysis of one year of cesarean sections: indications and risk factors associated with intrapartum cesarean section. 2010;5(62):403-14.
23. Carlander Ak, Edman G, Chistensson K, Andolf E, Wikleend I. Contact between mother, child and partner and attitudes towards breastfeeding in relation to mode of delivery. Sex reprod Helthc. 2010;1(1):27-34.
24. Keelan JA, Marvin KW, Sato TA, Coleman M, McCowan LME, Mitchell MD. Cytokine abundance in placental tissues: Evidence of inflammatory activation in gestational membranes with term and preterm parturition. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 1999;181(6):1530-6.
25. Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, GilstrapIII IC, Hauth JC, Wenestrom KD. Williams Obstetrics. Nova Iorque: Mc graw Hill. 2001;(11):251-90.
26. Srinivasan V, Spence DW, Trakht I, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP, Maestroni GJ. Immunomodulation by melatonin: Its significance for seasonally occurring diseases. Neuroimmunomodulation. 2008;15(2):93-101.
27. Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Paredes SD, Korkmaz A, Sainz RM. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an

antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biological Reviews*. 2010;85(3):607-23.

28. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin - Nature's most versatile biological signal? *Febs Journal*. 2006;273(13):2813-38.

29. Fernandes PACM, Cecon E, Markus RP, Ferreira ZS. Effect of TNF- α on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing. *Journal of Pineal Research*. 2006;41(4):344-50.

30. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*. 2005;27(2):189-200.

31. Prendergast BJ, Hotchkiss AK, Bilbo SD, Kinsey SG, Nelson RJ. Photoperiodic adjustments in immune function protect Siberian hamsters from lethal endotoxemia. *Journal of Biological Rhythms*. 2003;18(1):51-62.

32. Martin LB, Weil ZM, Nelson RJ. Seasonal changes in vertebrate immune activity: mediation by physiological trade-offs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*. 2008;363(1490):321-39.

33. Nelson RJ, Drazen DL. Melatonin mediates seasonal adjustments in immune function. *Reproduction Nutrition Development*. 1999;39(3):383-98.
34. Nelson RJ, Drazen DL. Melatonin mediates seasonal changes in immune function. *Neuroimmunomodulation*. 2000;917:404-15.
35. Iwasaki S, Nakazawa K, Sakai J, Kometani K, Iwashita M, Yoshimura Y. Melatonin as a local regulator of human placental function. *Journal of Pineal Research*. 2005;39(3):261-5.
36. Tamura H, Takayama H, Nakamura Y, Reiter RJ, Sugino N. Fetal/placental regulation of maternal melatonin in rats. *Journal of Pineal Research*. 2008;44(3):335-40.
37. Mura MC, Luridiana S, Vacca GM, Bini PP, Carcangiu V. Effect of genotype at the MTNR1A locus and melatonin treatment on first conception in Sarda ewe lambs. *Theriogenology*. 2010;74(9):1579-86.
38. Casao A, Vega S, Palacin I, Perez-Pe R, Lavina A, Quintin FJ. Effects of Melatonin Implants During Non-Breeding Season on Sperm Motility and Reproductive Parameters in Rasa Aragonesa Rams. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010;45(3):425-32.

39. Manjunatha BM, Devaraj M, Gupta PSP, Ravindra JP, Nandi S. Effect of Taurine and Melatonin in the Culture Medium on Buffalo In Vitro Embryo Development. *Reproduction in Domestic Animals*. 2009;44(1):12-6.
40. Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more - occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008;65(13):2001-18.
41. Kang JT, Koo OJ, Kwon DK. Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. *Journal of Pineal Research*. 2009;47(1):107.
42. Voznesenskaya T, Makogon N, Bryzgina T, Sukhina V, Grushka N, Alexeyeva I. Melatonin protects against experimental immune ovarian failure in mice. *Reproductive Biology*. 2007;7(3):207-20.
43. Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Tanoguchi K, Maekawa R, Asada H. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*. 2008;44(3):280-7.
44. Molik E, Misztal T, Romanowicz K, Zieba DA. The effects of melatonin on prolactin and growth hormone secretion in ewes under different photoperiods,

during the early post partum period. *Small Ruminant Research*. 2010;94(1-3):137-41.

45. Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi WB, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Neuroimmunomodulation*. 2000;917:376-86.

46. Gitto E, Karbownik M, Reiter RJ, Tan DX, Cuzzocrea S, Chiurazzi P. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatric Research*. 2001;50(6):756-60.

47. Gitto E, Pellegrino S, Gitto P, Barberi I, Reiter RJ. Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *Journal of Pineal Research*. 2009;46(2):128-39.

48. TranchotDiallo J, Gras G, ParnetMathieu F, Benveniste O, Marce D, Roques P. Modulations of cytokine expression in pregnant women. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1997;37(3):215-26.

49. Tsunoda H, Tamatani T, Oomoto Y, Hirai Y, Kasahara T, Iwasaki H. Changes in interleuin-1 levels in human amniotic-fluid with gestational ages and delivery. *Microbiology and Immunology*. 1990;34(4):377-85.

50. Unal ER, Cierny JT, Roedner C, Newman R, Goetzl L. Maternal inflammation in spontaneous term labor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2011;204(3).
51. Opsjon SL, Wathen NC, Tingulstad S, Wiedswang G, Sundan A, Waage A. Tumor-necrosis-factor,interleukin-1,and interleukin-6 in normal human pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1993;169(2):397-404.
52. Houben ML, Nikkels PGJ, van Bleek GM, Visser GHA, Rovers MM, Kessel H. The Association between Intrauterine Inflammation and Spontaneous Vaginal Delivery at Term: A Cross-Sectional Study. *Plos One*. 2009;4(8).
53. Gunn L, Hardiman P, Tharmaratnam S, Lowe D, Chard T. Measurement of interleukin-1 alpha and interleukin-6 in pregnancy-associated tissues. *Reproduction Fertility and Development*. 1996;8(7):1069-73.
54. Jaattela M, Kuusela P, Saksela E. Demonstration of tumor necrosis factor in human amniotic fluids and supernatants of placental and decidual tissues. *Laboratory Investigation*. 1988;58(1):48-52.

55. Winkler M, Rath W. The role of cytokines in the induction of labor, cervical ripening and rupture of the fetal membranes. *Zeitschrift Fur Geburtshilfe Und Neonatologie*. 1996;200(3):1-12.
56. Straka M. Pregnancy and periodontal tissues. *Neuro Endocrinol*. 2011;Feb21;32(1):34-8.
57. Gyarmati B, Beko G, Szalay B, Cseh A, Vasarhelyi B, Treszl A. Maternal Cytokine Balance on the Third Postpartum Day is Not Affected by the Mode of Delivery After Healthy Pregnancies. *Journal of International Medical Research*. 2010;38(1):208-13.
58. Romero R, Avila C, Santhanam U, Sehgal PB. Amniotic-fluid interleukin-6 in preterm labor-Association with infection. *Journal of Clinical Investigation*. 1990;85(5):1392-400.
59. Coultrip LL, Lien JM, Gomez R, Kapernick P, Khoury A, Grossman JH. The value of amniotic-fluid interleukin-6 determination in patientes with preterm labor and intact membranes in the detection of microbial invasion of the amniotic cavity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1994;171(4):901-11.
60. Ghidini A, Jenkins CB, Spong CY, Pezzullo JC, Salafia CM, Eglinton GS. Elevated amniotic fluid Interleukin-6 levels during the early second trimester are

associated with greater risk of subsequent preterm delivery. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1997;37(3):227-31.

61. Laham N, Rice GE, Bishop GJ, Hansen MB, Bendtzen K, Brennecke SP. Elevated plasma interleukin-6 - A biochemical marker of human preterm labor. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 1993;36(3):145-7.

62. Greig PC, Murtha AP, Jimmerson CJ, Herbert WNP, RoitmanJohnson B, Allen J. Maternal serum interleukin-6 during pregnancy and during term and preterm labor. *Obstetrics and Gynecology*. 1997;90(3):465-9.

63. Romero R, Mazor M, Sepulveda W, Avila C, Copeland D, Williams J. Tumor-necrosis-factor in preterm and term labor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1992;166(5):1576-87.

64. Arntzen KJ, Lien E, Austgulen R. Maternal serum levels of interleukin-6 and clinical characteristics of normal delivery at term. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*. 1997;76(1):55-60.

65. Rudloff HE, Schmalstieg FC, Mushtaha AA, Palkowetz KH, Liu SK, Goldman AS. Tumor-necrosis-factor-alpha in human milk. *Pediatric Research*. 1992;31(1):29-33.

66. Maymon E, Ghezzi F, Edwin SS, Mazor M, Yoon BH, Gomez R, et al. The tumor necrosis factor alpha and its soluble receptor profile in term and preterm parturition. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1999;181(5):1142-8.
67. Bowen JM, Chamley L, Mitchell MD, Keelan JA. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: Biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women. *Placenta*. 2002;23(4):239-56.
68. Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. Interferon Beta-2/b-cell stim ulatory factor type-2 shares indentity with monocyte-derid hepatocyte-stimula factor and regulates the major acute phase protein response in liver-cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(20):7251-5.
69. Kohase M, Henriksendestefano D, May LT, Vilcek J, Sehgal PB. Induction of interferon-beta-2 by tumor-necrosis-factor- A homeostatic mechanism in the control of cell proliferation. *Controll of celll*. 1986;45(5):659-66.
70. Kupper TS, Min K, Sehgal P, Mizutani H, Birchall N, Ray A. Production of IL-6 by keratinocytes - Implications for epidermal inflammation and immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1989;557:454-65.

71. Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. Interferon beta-2/cell stimulatory factor type-2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver-cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(20):7251-5.
72. Tabibzadeh SS, Santhanam U, Sehgal PB, May LT. Cytokine-induced production of IFN-beta-2 IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells - Modulation by estradiol -17 beta. *Journal of Immunology*. 1989;142(9):3134-9.
73. Sehgal PB, Grieninger G, Tosato G. Regulation of the acute phase and immune responses : interleukin-6. *AnnNY acad Sci*. 1989;1:557-454-65.
74. Dudley DJ, Hunter C, Varner MW, Mitchell MD. Elevation of amniotic fluid interleukin-4 concentrations in women with preterm labor and chorioamnionitis. *American Journal of Perinatology*. 1996;13(7):443-7.
75. Casey ML, MacDonald PC. Transforming growth factor-beta inhibits progesterone-induced enkephalinase expression in human endometrial stromal cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1996;81(11):4022-7.

76. Challis JRG. Mechanism of parturition and preterm labor. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 2000;55(10):650-60.
77. Nomura RMY, Alves EA, Zugaib M. Maternal complications associated with type of delivery in a university hospital. *Revista De Saude Publica*. 2004;38(1):9-15.
78. Vanroosmalen J, Vanderdoes CD. Cesarean birth-rates worldwide - A search for determinants. *Tropical and Geographical Medicine*. 1995;47(1):19-22.
79. Stoll W. Indications for cesarean-section. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*. 1990;120(8):255-9.
80. Davis E, Olson C. Obesity in Pregnancy. *Primary Care*. 2009;36(2):341.
81. Kelly RW. Inflammatory mediators and parturition. *Reprodu*. 1996;1:89-96.
82. Kruse N, Greif M, Morabadi NF, Marx L, Toyka KV, Rieckmann P. Variations in cytokine mRNA expression during normal human pregnancy. *Clinical and Experimental Immunology*. 2000;119(2):317-22.

83. Cicarelli LM, Perroni AG, Zugaib M, de Albuquerque PB, Campa A. Maternal and cord blood levels of serum amyloid A, C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 during and after delivery. *Mediators of Inflammation*. 2005(2):96-100.
84. Christian LM, Franco A, Iams JD, Sheridan J, Glaser R. Depressive symptoms predict exaggerated inflammatory responses to an in vivo immune challenge among pregnant women. *Brain Behavior and Immunity*. 2010;24(1):49-53.
85. Marchini G, Hagenas L, Kocoska-Maras L, Berggren V, Hansson LO. Insulin-like growth factor binding protein-1 and interleukin-6 are markers of fetal stress during parturition at term gestation. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism*. 2005;18(8):777-83.
86. Stallmach T, Hebisch G, Joller H, Kolditz P, Engelmann M. Expression pattern of cytokines in the different compartments of the feto-maternal unit under various conditions. *Reproduction Fertility and Development*. 1995;7(6):1573-80.
87. Carlander A, K., Edman G, Christensson K, Andolf E, Wiklund I. Contact between mother, child and partner and attitudes towards breastfeeding in relation to mode of delivery. *Sex Reprod healthc*. 2009;1(1):Feb 27-34.