

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITOS DO TABAGISMO DURANTE A GESTAÇÃO EM SANGUE E
CORDÃO UMBILICAL DE NEONATOS**

EDNILDES DE ALMEIDA OLYMPIO RUA

VILA VELHA
2014

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITOS DO TABAGISMO DURANTE A GESTAÇÃO EM SANGUE E
CORDÃO UMBILICAL DE NEONATOS**

EDNILDES DE A. OLYMPIO RUA

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

VILA VELHA

2014

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

R894e Rua, Ednildes de Almeida Olympio.

Efeitos do tabagismo durante a gestação em sangue e cordão umbilical de neonatos / Ednildes de Almeida Olympio
Rua. – 2014.

66 f.: il.

Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Vila Velha, 2014.

Inclui bibliografias.

1. Fumo - Vício. 2. Gravidez – Abuso de drogas. 3. Recém-nascidos – Efeito de drogas. 4. Células sanguíneas I. Pereira, Thiago de Melo Costa. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 618.32686

EDNILDES DE A. OLYMPIO RUA

**EFEITOS DO TABAGISMO DURANTE A GESTAÇÃO EM
SANGUE E CORDÃO UMBILICAL DE NEONATOS**

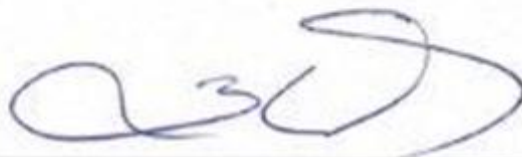
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 27 de maio de 2014

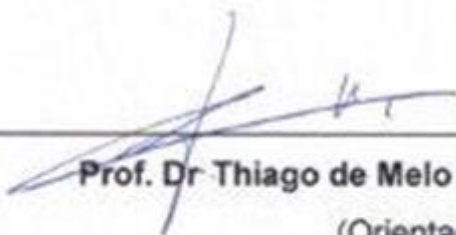
Banca examinadora:



Prof. Dra. Bianca Prandi Campagnaro (UVV)



Prof. Dr Breno Valentim Nogueira (UFES)



Prof. Dr Thiago de Melo Costa Pereira (UVV)

(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois nada acontece sem que ele permita, ele me sustenta em todos os momentos.

Ao meu orientador, Dr. Thiago de Melo Costa Pereira, pela confiança em mim depositada, fez despertar em mim a vontade de pesquisar. Aprendi com ele lições que vão além dessa etapa.

A Doutoranda Marcella Leite Porto, pela análise das minhas amostras com tanto carinho e atenção, e ao Dr. Breno Valentim, pela análise histológica do material, ambos dispensaram seu precioso tempo em prol desse trabalho.

Ao aluno de iniciação científica, Jean Louzada, pela análise do material nos laboratórios da UVV.

Ao colega Rogério Piontkovski, por ter realizado o processamento do material para análise histológica.

Aos laboratórios de fisiologia e de morfologia, respectivamente coordenados pelos Dr. Elisardo Corral Vasquez e Dr. Breno Valentim Nogueira, na UFES que tão prontamente me acolheram.

Aos colegas dos plantões das Maternidades, bem como a todos os funcionários onde foram colhidas as amostras, pelo carinho e crédito dados a minha pessoa à minha causa.

Aos meus pais, sempre incentivadores do meu desenvolvimento profissional.

A minha família, Sergio, Mariana e Carolina, pela compreensão e apoio, minhas desculpas pelos momentos em que não estive ao lado de vocês.

A todos os meus amigos, por terem entendido a minha ausência.

A parte que ignoramos é muito maior que tudo quanto sabemos.—(Platão)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fontes enzimáticas de $\bullet\text{O}_2^-$. As principais enzimas responsáveis pela geração de ERO na vasculatura inclui a NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, NOS desacoplada [...]	18
Figura 2	Principais enzimas endógenas antioxidantes: Superoxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione Redutase (GR). A SOD catalisa a dismutação do $\bullet\text{O}_2^-$ para uma espécie menos reativa, o H_2O_2 . [...]	22
Figura 3	Formação do DCF fluorescente para detecção indireta de H_2O_2 .	30
Figura 4	Formação do DHE oxidado fluorescente para detecção indireta de $\bullet\text{O}_2^-$	31
Figura 5	Esquema mostrando a oxidação protéica (formação dos grupos carbonilados). Essa imagem demonstra algumas fases para a formação de AOPP.....	33
Figura 6	Produção de ERO. (a) Histogramas representativos de citometria de fluxo, usando dihidroetídeo (DHE) e diclorodihidrofluoresceína (DCF), em células mononucleares sanguíneas do cordão umbilical de expostos e não expostos ao cigarro. [...].....	35
Figura 7	Análise apoptose por citometria de fluxo. Gráficos <i>dot plot</i> típicos, mostrando dados de apoptose comparando células mononucleares sanguíneas dos neonatos de mães (A) não-fumantes (n= 13, esquerda) e não fumantes (n=13, direita), usando iodeto de propídeo (PI) e anexina V. [...]	36
Figura 8	Quantificação de AOPP. Níveis de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) em cordão umbilical de gestantes fumantes (n=8) e não fumantes (n=6). Os valores estão expressos como média \pm EPM. * p <0,05 vs. não fumantes	37
Figura 9	Análise de área luminal. Gráficos de barras mostrando percentagem da área luminal obtidas por secção transversal das artérias (barras brancas) e veias (barras pretas) de cordão umbilical de neonatos do grupo de não fumantes (n=10) e	38

fumantes (n=12). Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

Figura 10 **Microfotografia de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do endotélio vascular de artérias umbilicais de pacientes grávidas.** A) Imagem típica de uma paciente não fumante, que mostra uma superfície regular que acompanha a direção longitudinal do vaso. B) Imagem típica de um paciente fumante, exibindo áreas difusas de espessamento endotelial com perda da arquitetura típica e disposição de células endoteliais (setas brancas). Barra de escala: 10 mm 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros das pacientes	34
----------	--------------------------------	----

RESUMO

RUA, Ednildes de A. Olympio, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, maio de 2014.
Efeitos do tabagismo durante a gestação em sangue e cordão umbilical de neonatos. Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.

O tabagismo é ainda um grande problema de saúde no Brasil e no mundo, sendo uma causa evitável de mau desfecho obstétrico. Ainda que conhecidamente o cigarro seja uma complexa mistura de mais de 4000 substâncias que podem levar danos aos fumantes ativos ou passivos, seus mecanismos bem como repercussões bioquímicas ainda não estão completamente elucidadas, principalmente em gestantes e neonatos. Portanto, propomos de maneira inédita, por meio da utilização da citometria de fluxo, estudar o impacto do tabagismo durante a gravidez sobre a viabilidade das células sanguíneas mononucleares de cordões umbilicais de recém-nascidos, objetivando verificar o grau de estresse oxidativo e viabilidade celular e investigar possíveis alterações bioquímico-morfológicas no cordão umbilical. Para tanto, foram colhidos sangue do cordão bem como o próprio cordão umbilical de puérperas internadas em maternidades públicas da Grande Vitória durante o terceiro período do parto, após o nascimento e o clampeamento do cordão, e após o desprendimento da placenta e lavagem de um segmento do cordão. A seguir, o sangue do cordão foi submetido a ensaios de citometria de fluxo e o cordão umbilical para ensaios bioquímico-histológicos. Dados expressos como média \pm EPM e para análise estatística, foram feitos teste t de *Student* (* $p < 0.05$). No grupo de pacientes analisadas, não houve diferença entre parâmetros como idade, pressão arterial média gestacional ou índices hematimétricos. Nos neonatos, parâmetros como peso, capurro, Apgar e perímetro cefálico também não apresentaram diferença. Entretanto, análises por citometria de fluxo mostraram que o tabagismo na gestação prejudica a qualidade das células sanguíneas mononucleares de cordão umbilical: houve uma diminuição de 10% na viabilidade celular, aumento das espécies reativas de oxigênio em relação às gestantes não expostas (DHE: $1887 \pm 189^*$; DCF: $814 \pm 66^*$ u.a vs. DHE: 987 ± 71 DCF: 532 ± 27 u.a., respectivamente) e um aumento de aproximadamente 2 vezes no índice de apoptose ($38 \pm 4.5^*$ % vs. $19 \pm 3.7\%$, respectivamente). No cordão umbilical, foi demonstrado um aumento de oxidação protéica (232.1 ± 52.9 vs. 94.3 ± 13.9 , $\mu\text{mol/mg}$ proteína, respectivamente) e perda da integridade endotelial por microscopia eletrônica de varredura, sem alterações de remodelamento tanto em artérias quanto em veias do cordão umbilical, avaliadas por estudos morfométricos. Portanto, nossos dados mostram que a exposição ao cigarro é capaz de prejudicar a viabilidade das células mononucleares oriundas do cordão umbilical e a própria integridade do cordão umbilical de mulheres expostas ao cigarro. Estes resultados através da citometria de fluxo fornecem novos rumos de investigações do impacto do tabagismo em neonatos.

Palavras-chave: estresse oxidativo, apoptose, fumantes, citometria de fluxo, AOPP

ABSTRACT

RUA, Ednildes de A. Olympio, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, maio de 2014.
Effects of smoking during pregnancy on the blood and umbilical cord in newborns Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.

Smoking is still a major health problem in Brazil and the world, one preventable cause of poor obstetric outcome. Although cigarette smoking is known to be a complex mixture of over 4000 substances that damage can lead to active or passive smoking. Its mechanisms and biochemical consequences are not yet fully understood, especially in pregnant women and neonates. Therefore, we propose a new way, through the use of flow cytometry to study the impact of smoking during pregnancy on the viability of blood mononuclear cells from umbilical cords of newborns in order to verify the degree of oxidative stress and cell viability and investigate possible biochemical and morphological changes in the umbilical cord. To this end, cord blood was collected and the umbilical cord itself hospitalized postpartum women in public hospitals in Greater Victoria during the third stage of labor, birth and after the cord clamping, and after detachment of the placenta and sterilization of a segment of cord. Then the cord blood was subjected to flow cytometry assays and the umbilical cord for biochemical and histological tests. Data are expressed as mean \pm SEM and statistical analysis were performed Student t test (* $p < 0,05$). In the group of patients analyzed there was no difference between parameters such as age, blood pressure or gestational average and hematimetric indices. In neonates, parameters such as weight, Capurro index, head circumference and Apgar scores also showed no difference. However, analysis by flow cytometry showed that smoking during pregnancy harms the quality of blood mononuclear cells from umbilical cord : there was a 10% decrease in cell viability , increase in reactive oxygen species in relation to pregnant women not exposed (DHE : 1887 ± 189 * ; DCF 814 ± 66 vs au * DHE : 987 ± 71 DCF : 532 ± 27 au , respectively) and an increase of approximately 2 fold the rate of apoptosis (38 ± 4.5 % * vs. 19 ± 3.7 % . , respectively). Cord blood was demonstrated increased protein oxidation (232.1 ± 52.9 vs. 94.3 ± 13.9 , mol / mg protein, respectively) and loss of endothelial integrity by scanning electron microscopy, no changes of remodeling in both arteries and veins in the cord, as assessed by morphometric studies. Therefore, our data show that exposure to smoking can impair the viability of mononuclear cells derived from the umbilical cord and the very integrity of the umbilical cords of women exposed to cigarette smoke. These results by flow cytometry provide new directions of investigations of the impact of smoking on neonates.

Key words: oxidative stress, apoptosis, smoking, flow cytometry, AOPP

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
2.1	TABAGISMO	11
2.1.1	Tabagismo no mundo	11
2.1.2	Tabagismo no Brasil	12
2.2	PRINCIPAIS COMPONENTES DO CIGARRO	12
2.3	TABAGISMO NA GRAVIDEZ	13
2.3.1	Circulação feto-materno-placentária	15
2.4	ESTRESSE OXIDATIVO	17
2.4.1	Fatores anti-oxidantes	21
2.4.2	Estresse oxidativo e gestação	23
3	OBJETIVOS	24
3.1	OBJETIVO GERAL	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4	MÉTODOS	25
4.1	CASUÍSTICA E MÉTODOS	25
4.2	CITOMETRIA DE FLUXO	26
4.2.1	Funcionamento do citômetro de fluxo	27
4.2.2	Isolamento de células mononucleares do sangue do cordão umbilical	28
4.2.3	Determinação da viabilidade e apoptose (anexina)	29
4.2.4	Medida de estresse oxidativo pela determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (DHE E DCF)	30
4.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA	31
4.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	32
4.5	AOPP	32
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5	RESULTADOS	34
5.1	PARÂMETROS GERAIS DAS PACIENTES	34
5.2	ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (ERO) E ANÁLISE DE APOPTOSE EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE DE NEONATOS.....	35
5.3	QUANTIFICAÇÃO DE AOPP NO CORDÃO UMBILICAL	36

5.4	AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS	37
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÃO	47
8	REFERENCIAS	48
	APÊNDICE	

1. INTRODUÇÃO

O tabagismo ainda é um grande problema de saúde pública, considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a principal causa de morte evitável e que pode matar cerca de 20 milhões de pessoas por ano em todo o mundo até 2020 (OMS, 2012). No Brasil cerca de 200.000 mortes ocorrem por ano em decorrência do tabagismo (OPAS, 2011).

A fumaça do cigarro contém mais de 4000 substâncias, sendo algumas delas oxidantes e pró oxidantes, capazes de induzir danos aos lipídios, proteínas, DNA, carboidratos ao gerar radicais livres e por conseguinte estresse oxidativo *in vivo* facilitando o desenvolvimento de diversas doenças tais como genéticas, cardiovasculares e neoplásicas (PRESTON, 1991; FAUX et al., 2009). Estudos recentes têm mostrado que algumas das substâncias genotóxicas ou metabólitos da fumaça do cigarro são capazes de passar através da placenta prejudicando a saúde do recém-nascido (CASTELAO & GAGO-DOMINGUEZ, 2008; FELTES et al., 2013; AYDOGAN et al., 2013). Ainda, estudos pormenorizados revelam diferentes tipos de riscos à saúde, tais como leucemia e tumores do SNC em crianças cujas mães fumaram durante a gravidez (FILIPPINI; FARINOTTI; FERRARINI, 2000; MUCCI; GRANATH; CNATTINGIUS, 2004).

A avaliação desses danos genotóxicos pode ser conseguida com sucesso através da medição de parâmetros de estresse oxidativo como as espécies reativas de oxigênio (ROS), cujos principais representantes são o ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Atualmente, avaliações de produção de ERO por citometria de fluxo têm auxiliado o entendimento de diversas patologias do tipo "estresse oxidativo dependentes" (TONINI et al., 2013; DIAS et al., 2014).

No presente estudo, propusemos de maneira inédita, por meio de utilização de citometria de fluxo, estudar o impacto do tabagismo durante a gravidez sobre a funcionalidade das células sanguíneas mononucleares de cordões umbilicais de neonatos objetivando verificar o grau de estresse oxidativo e viabilidade celular. Ainda, análises morfométricas e bioquímicas foram utilizadas para investigar o grau de impacto do tabagismo sobre lesão endotelial e estresse oxidativo em cordões umbilicais de puérperas expostas e não expostas ao cigarro. Portanto, este trabalho abre novos rumos de investigações do impacto do tabagismo em humanos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 TABAGISMO

Segundo a OMS (2012), o tabaco mata em torno de 6 milhões de pessoas por ano no mundo. Cerca de 85% dessas mortes são o resultado direto do uso do tabaco, sendo mais de 600.000 o resultado de não-fumantes expostos à fumaça (OMS, 2012). A menos que medidas urgentes sejam tomadas, o número anual de mor pode subir para mais de 8 milhões em 2030 (OMS, 2012).

2.1.1 Tabagismo no mundo

Ainda que existam inúmeras evidências de prejuízo à saúde humana, o consumo mundial de produtos de tabaco ainda aumenta mesmo sob redução em alguns países de alta e média renda (OMS, 2012). A prevalência de tabagismo entre gestantes varia ao redor do mundo, em diferentes países podendo ser de 9,9% no Japão até 30-35% na Espanha (AL-SAHAB et al., 2010). Em relação ao gênero, o tabagismo ainda é considerado um problema majoritariamente masculino. Entretanto, estima-se que existam cerca de 250 milhões de mulheres no mundo que fumam cigarros e outros milhões de mulheres que usam produtos de tabaco sem fumaça, comprometendo a saúde da gestante e do seu conceito no período gestacional (AYDOGAN et al., 2013; SIEMINSKA & JASSEM, 2014).

O uso do cigarro continua sendo a forma mais prevalente de uso do tabaco entre meninas e mulheres em todo o mundo (OMS, 2012). Entretanto, em outras partes do mundo, especialmente em países de baixa e média renda, uma proporção considerável de mulheres, inclusive aquelas em idade reprodutiva utilizam o tabaco de outras formas. Por exemplo, na parte central e sul da Índia, 17- 45 % das mulheres usam *mishri*, uma substância em pó utilizada para limpeza dos dentes contendo tabaco (PRATINIDHI et al., 2010). Da mesma forma, no Camboja a prevalência de mascar tabaco entre as mulheres mais do que duplica a cada década da vida adulta até o ponto em que cerca de metade de todas as mulheres mais velhas mastigam tabaco (SINGH et al., 2009). Outro método tradicional de uso do tabaco é fumar narguilé. Esta forma de uso do tabaco é especialmente difundida na região do Mediterrâneo Oriental, onde as mulheres e as meninas são mais propensas a começar a fumar narguilé do que usar outras formas de tabaco sendo

uma prática popular entre fumantes mais jovens (MAZIAK; WARD; EISSENBERG, 2007).

Atualmente, fumar narguilé está ganhando popularidade em todo o mundo, inclusive nos países desenvolvidos, como os EUA, onde 10-20% de algumas populações de adultos jovens fazem uso (COBB et al., 2010).

2.1.2 Tabagismo no Brasil

Dados da Pesquisa Nacional por Amostras de Domicílio (PNAD) de 2008, incluindo indivíduos de 15 anos ou mais com informações para hábito de tabagismo e ocupação, encontrou a prevalência de fumo diário no Brasil de 15,1%, variando de 17,4% na região Sul a 12,8% na região Norte. A pesquisa foi realizada com 252.768 indivíduos, sendo 131.072 (51,8%) do sexo feminino e 121.696 (48,2%) do sexo masculino. Os dados do Ministério da saúde divulgados em Abril de 2012 (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas (por Inquérito Telefônico) revelaram o número de fumantes no Brasil, acima de 18 anos de idade, em 14,8%. Entre os homens, o percentual de fumantes ficou em 18,1% e entre as mulheres, 12%. Entre aqueles que fumam 20 cigarros ou mais por dia, 5,4% são homens e 3,3%, mulheres. Os homens, em compensação, estão deixando mais o cigarro: 25% se declararam ex-fumantes, enquanto 19% das mulheres afirmaram terem sido tabagistas (IBGE, 2009).

2.2 PRINCIPAIS COMPONENTES DO CIGARRO

Na fumaça do cigarro estão presentes mais de 4.000 substâncias tóxicas. Essas substâncias contem grande número de toxinas, como cianeto, sulfureto, cádmio, hidrocarbonetos carcinogênicos e nicotina, substâncias essas capazes de induzir a danos celulares (ZHANG & RATCLIFFE, 1993; AYDOGAN et al., 2013). A nicotina e a cotinina são metabólitos do cigarro e passam através da placenta, exercendo efeitos diretos sobre a proliferação e diferenciação das vilosidades trofoblásticas, podendo explicar os efeitos negativos sobre a placentação e a formação das membranas (JAUNIAUX & BURTON, 1992; ZDRAVKOVIC et al., 2005). Níveis de concentração de cotinina foram encontrados em sangue de cordão umbilical de neonatos recém-nascidos de mães fumantes em quantidade até três vezes maior que os níveis encontrados no sangue venoso materno (TOPINKA et al., 2009).

Outros estudos mostram que muitas substâncias encontradas na fumaça do cigarro são consideradas carcinogênicas (PFEIFER et al., 2002; SEPETDJIAN; SHIHADDEH; SALIBA 2008). Dentre elas estão os óxidos de nitrogênio, o butadieno, o isopreno, o formaldeído, o benzeno, o estireno, o acetaldeído, a acroleína e o furano, todos esses considerados agentes carcinogênicos (PFEIFER et al., 2002; CHAOUACHI & SAJID, 2010). Também podem ser encontrados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, N-nitrosaminas e metais pesados, além da nicotina, esse último, composto psicoativo do cigarro que gera dependência (PFEIFER et al., 2002).

2.3 TABAGISMO NA GRAVIDEZ

Estudos mostram que a exposição crônica ao cigarro está associada a restrição de crescimento fetal, risco de parto prematuro, descolamento prematuro de placenta, natimortos e abortamento (MORTENSEN et al., 2001; BERGMANN; BERGMANN; DUDENHAUSEN, 2008). Defeitos no desenvolvimento dos membros e órgãos, bem como a diminuição de peso de recém-nascidos são quadros clínicos comuns (JAUNIAUX & BURTON, 2007). Os fetos e recém-nascidos de grávidas fumantes ou expostas à fumaça do cigarro podem apresentar defeitos morfológicos ao longo do desenvolvimento, em especial nos tecidos ósseos e neurológico (HACKSHAW; RODECK; BONIFACE, 2011).

Curiosamente, os malefícios do uso do cigarro se iniciam, nas mulheres, antes mesmo da gravidez, quando alguns estudos mostram a diminuição da taxa de fertilidade de fumantes (AUGOOD; DUCKITT; TEMPLETON, 1998; TONG et al., 2009). O tabagismo na gravidez associa-se com restrição de crescimento intrauterino, prematuridade e aumento de morte súbita de recém-nascidos (TONG et al., 2009). Em 2010, o Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC) divulgou evidências consistentes que ligam o tabagismo a alterações cromossômicas ou danos ao DNA nas células germinativas do esperma, afetando a fertilidade masculina, a viabilidade da gravidez e consequentes anomalias na descendência. Ainda, associou o tabagismo materno a patologias pulmonares, cerebrais e outras como lábio leporino e fenda palatina. Houve também associação de aumentos transitórios da frequência cardíaca materna, e pressão arterial materna (principalmente a diastólica), provavelmente mediada pela liberação de catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) bem como alterações placentárias

responsáveis pelo aumento na incidência de parto prematuro e baixo peso ao nascer (CDC, 2010). O CDC ainda afirma que há evidências consistentes que o tabagismo leva a efeitos imunossupressores, incluindo desregulação da resposta inflamatória, que pode levar ao aborto e parto prematuro (TONG et al., 2009).

Nos Estados Unidos, uma em cada quatro mulheres fumantes param de fumar durante a gestação, sendo que 13 a 25% delas fumam até o final do primeiro trimestre da gravidez (ROGERS, 2008). Fumantes ativas inalam o fumo do tabaco produzido em altas temperaturas, e essa é filtrada pelos seus pulmões. A fumaça produzida pela combustão espontânea da ponta do cigarro entre as “tragadas” é inalada pelo fumante passivo, sendo então exposta a diversas substâncias (WEISS et al., 1983; SCHERER et al., 1990). A nicotina e o monóxido de carbono atravessam facilmente a placenta e se acumulam em tecidos fetais (ANKABERG, 2001). Existem evidências de que a concentração de nicotina na circulação fetal é 15% maior que na circulação materna, e 88% maior no líquido amniótico que no plasma materno (LUCK et al., 1984), facilmente justificada por ser uma base fraca, sendo uma molécula aprisionada pela armadilha iônica. A nicotina promove no feto vasoconstrição, levando a hipoperfusão, reduzindo o aporte de nutrientes e oxigênio para o feto (QUIGLEY et al., 1979; LAMBERS & CLARK, 1996; BENOWITZ & DEMPSEY, 2004). Já o monóxido de carbono liga-se a hemoglobina, formando a carboxihemoglobina, comprometendo o aporte de oxigênio fornecido ao tecido fetal sendo contribuinte para o baixo peso ao nascer e geração de *déficits* neurológicos (TONG et al., 2009). Efeitos adversos dos componentes da fumaça do cigarro como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, são também responsabilizados pelo aumento na incidência de restrição de crescimento fetal (DEJMEK et al., 2002; TONG et al., 2009). Outro poluente encontrado frequentemente na fumaça do cigarro é o cádmio, sendo encontradas quantidades semelhantes em sangue de cordão umbilical e em plasma de fumantes, mostrando que esse metal é um constituinte do tabaco que facilmente passa da mãe para o feto, e que também pode indiretamente influenciar negativamente no crescimento fetal, acrescido de potencial genotóxico (SALPIETRO et al., 2002; YANG et al., 2006).

O cigarro é descrito na literatura como fator de risco na formação de radicais livres, podendo afetar gestantes e seus fetos (FAUX et al., 2009). Fumantes passivas ou ativas são associadas com importantes alterações no balanço entre oxidantes e antioxidantes no sangue do cordão umbilical que causam potente estresse oxidativo (AYCICECK & IPEK, 2008). Em relação aos parâmetros

bioquímicos antioxidantes, foram encontrados no plasma de neonatos *down regulation* de enzimas antioxidantes como glutathiona peroxidase (GPX), superóxido dismutase (SOD) além de queda de outros antioxidantes intrínsecos como beta caroteno, riboflavina, vitamina E, selênio, cobre, zinco, ceruloplasmina, transferrina, dentre outros (BRACCI & BUONOCORE, 1998; MISTRY et al., 2008).

Nas fumantes, a concentração de progesterona, ferro e zinco encontra-se diminuída no sangue (PIASEK et al., 2001). O tabaco também diminui os níveis de estrogênio, gonadrotrofina coriônica e estradiol, que pode levar a abortos espontâneos (PIASEK et al., 2001).

Sbrana et al. (2011), observou um aumento significativo de nó sincicial em placentas de fumantes. Essas estruturas são mais encontrados em placentas de fetos maduros que em prematuros e têm sido usadas para avaliar maturidade fetal (JONES & FOX, 1977; BURTON & JONES, 2009). Considera-se que o aumento destes é uma resposta de vilosidades à hipóxia, onde as vilosidades tentam aumentar sua área de superfície facilitando as trocas de oxigênio com o sangue materno (HEAZELL et al., 2007).

Além disso foi observada a presença de nós sinciciais mais frequentes em placentas de fumantes, confirmando as observações de Demir, Demir e Yananc (1994), que sugerem má perfusão e dano oxidativo aumentado em placentas de fumantes (SBRANA et al., 2011).

Existem preocupações acerca da saúde de recém-nascidos de mães fumantes, pois há evidências que fetos e crianças, por terem alta proliferação celular, baixa competência imunológica e capacidade reduzida de ação detoxificante carcinogênica e reparo de danos ao DNA, são mais sensíveis que adultos a toxicidade de vários agentes poluentes dentre eles o cigarro (ANDERSON et al., 2000; PERERA et al., 2004; VAN LEEUWEN et al., 2008).

2.3.1 Circulação feto-materno-placentária

A circulação fetal é diferente da circulação extra-uterina anatômica e funcionalmente. O feto se conecta com o meio externo através da placenta e o cordão umbilical é o órgão que conecta o feto à placenta, responsável pelo transporte de sangue e nutrientes ao feto. Normalmente, o cordão umbilical apresenta duas artérias e uma veia única mais larga e circundada pela geléia de Wharton (BORRALHO et al., 1996). Estudos de microscopia eletrônica, imunohistoquímica comprovaram que as células presentes na substância basal

amorfa da geléia de Wharton, tratam-se de células com características de células musculares lisas e fibroblastos (TAKECHI; KUWABARA; MIZUNO, 1993). Essas células são mais abundantes ao redor dos vasos umbilicais, apresentando características de células produtoras de colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos (TAKECHI; KUWABARA; MIZUNO, 1993; HEIMLI et al., 1997). A substância basal forma uma rede de fibrilas colágenas (que se entrelaçam) e apresenta um amplo sistema de cavidades interligadas, formando estruturas canaliculares e também consistindo de espaços cavernosos e perivasculares (BANKOWSKI et al., 1996; VIZZA et al., 1996). No caso de compressão externa ou expansão dos vasos umbilicais, as estruturas formadas pelos canaliculos, espaços cavernosos e espaços perivasculares adaptam-se à situação, permitindo que a substância basal do cordão flua através dos canaliculos para os espaços cavernosos, alterando, assim, consideravelmente, seu volume e, por conseguinte, o fluxo sanguíneo no local. Os miofibroblastos, além de atuarem na síntese do colágeno e dos glicosaminoglicanos para a substância basal, contribuem para a regulação do fluxo umbilical e também como camada adventícia, ausente no cordão umbilical, envolvendo os vasos umbilicais (KJELLEN & LINDAHL, 1991). As células do estroma da geléia de Wharton possuem função contrátil que pode ajudar na proteção aos vasos umbilicais contra compressão (KOBAYASHI; KUBOTA; ASO, 1998). A geléia de Wharton que envolve os vasos umbilicais tem função protetora, evitando que estes vasos sofram torção e compressão impróprias (HILL; KISLAK; RUNCO, 1987).

Durante a primeira metade da gestação, as artérias espiraladas sofrem uma série de modificações. O trofoblasto invade e destrói o endotélio e a camada média dessas artérias, levando a perda de elasticidade, aumento da distensibilidade e perda do controle vasomotor das mesmas (BROSENS et al., 1967; DEKKER & SIBAI, 1998; WHITLEY & CARTWRIGHT, 2009). Essas modificações diminuem a resistência ao fluxo e melhoram a perfusão uteroplacentária (BENIRSCHKE & DRISCOLL, 1967; MOLL et al., 1988).

Durante a vida extrauterina, os ventrículos trabalham em série com o débito cardíaco do ventrículo direito (VD) igualando aquele do esquerdo. Entretanto, na fase fetal, através de quatro “bypasses” principais - o forâmen oval, o canal arterial, a placenta e o ducto venoso, os ventrículos trabalham em paralelo. O sangue oxigenado proveniente da placenta chega ao feto através da veia umbilical. Este segmento ao adentrar a parede abdominal passa pelo fígado e termina no ramo esquerdo da veia porta, levando sangue oxigenado para o feto (OKUMURA &

BARROS, 2002). Esse sangue passa principalmente (45%) através do ducto venoso “bypassando” o fígado fetal. O sangue da cava inferior representa aproximadamente 70% do volume total do retorno venoso. Este chega ao átrio direito (AD) e é parcialmente (33%) dirigido para o átrio esquerdo (AE) através do forame oval. A energia cinética do fluxo sanguíneo da veia cava inferior é a principal responsável pela manutenção da permeabilidade do forame oval no feto, já que as diferenças nas pressões médias da veia cava, AD e AE são mínimas. (OKUMURA & BARROS, 2002; PASTORE; PASTORE; PASTORE, 2003). O restante do fluxo de retorno da cava inferior mistura-se ao retorno da veia cava superior e seio coronário e passa para o VD. O sangue que chega ao AE e daí ao ventrículo esquerdo e a aorta ascendente, artérias coronárias e cérebro é, conseqüentemente, o mais saturado com aproximadamente 65% em relação a uma saturação de 55% no VD, que será dirigido através do canal arterial para a parte inferior do corpo do feto (RUDOLPH & HEYMANN, 1967; PASTORE; PASTORE; PASTORE, 2003).

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio possui tanto efeitos positivos quanto nocivos secundários para os sistemas biológicos. Sua alta reatividade permite ao oxigênio participar na transferência de elétrons de alta energia, e, por conseguinte, auxiliar a geração de grandes quantidades de adenosina-5-trifosfato (ATP) através da fosforilação oxidativa sendo necessário para permitir a manutenção de organismos multicelulares complexos. O oxigênio tem fundamental importância na formação de subprodutos, conhecidos como espécies reativas do oxigênio (ERO) (NEVITT & RODRIGUES, 2007; PARAVICINI & TOUYZ, 2008). As ERO são moléculas altamente reativas as quais se subdividem em dois grupos principais: os radicais livres que apresentam elétrons desemparelhados ($\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ e $\cdot\text{NO}$ e, portanto mais instáveis) e os derivados não radicais (H_2O_2 e OONO^- , mais estáveis). Em sistemas biológicos, o $\cdot\text{O}_2^-$ e o H_2O_2 são os mais abundantes (PARAVICINI & TOUYZ, 2008; TONINI et al., 2013). Convém ressaltar que existem outras fontes de produção das ERO (denominadas fontes enzimáticas pró-oxidantes), as quais estão resumidamente apresentadas na Figura 1. As principais fontes são mediadas pela NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, NOS desacoplada, cicloxigenase, lipoxigenase e enzimas do citocromo p450 (CYP's).

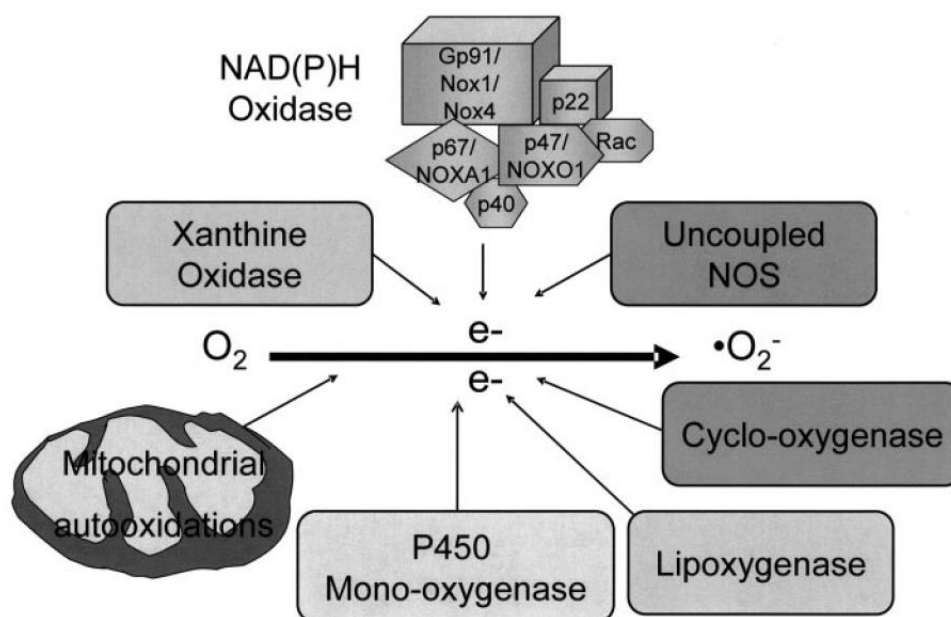


Figura 1 – Fontes enzimáticas de $\bullet\text{O}_2^-$. As principais enzimas responsáveis pela geração de ERO na vasculatura inclui a NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, NOS desacoplada. A NAD(P)H oxidase é uma enzima com várias sub-unidades , compreendendo a gp 91 phox, p22 phox, p 47 phox, p67 phox e p40 phox. Outras enzimas participantes são: cicloxigenase, lipoxigenase e enzimas do citocromo p450 (CYP's). (Adaptado de PARAVICINI; TOUYZ, 2008).

O $\bullet\text{O}_2^-$ é rapidamente reduzido a H_2O_2 pela enzima SOD. A carga do $\bullet\text{O}_2^-$ dificulta sua travessia pelas membranas, exceto por canais iônicos. Em contraste, o H_2O_2 é mais difusível e de maior tempo de meia vida (PARAVICINI & TOUYZ, 2008; TONINI et al., 2013). As ERO e seus produtos parecem estar entre as maiores causas de destruição da membrana celular e dano celular. Tanto o oxigênio quanto seus produtos de redução são vulneráveis para atacar qualquer molécula biológica, quer seja uma proteína, lípideo ou DNA (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; PARAVICINI & TOUYZ, 2008), contribuindo assim para o estresse oxidativo. Esse termo é frequentemente utilizado para indicar uma condição em que as células estão expostas a excessivos níveis de ERO (TONINI et al., 2013). Geralmente, o estresse oxidativo é desencadeado por um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes a favor dos oxidantes, que potencialmente pode induzir uma lesão (OGA, 2003; PARAVICINI & TOUYZ, 2008). Sendo assim, a superprodução de ERO, tais como ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), ânion peroxinitrito (OONO), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) e o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), pode resultar em processos de morte celular por necrose ou apoptose, através da interação com lipídeos, proteínas e DNA (TONINI et al., 2013; DIAS et al., 2014).

Um equilíbrio entre mecanismos oxidantes e antioxidantes é fundamental para a compreensão do estresse oxidativo. A perturbação pode ser desencadeada

por alterações em ambos os lados do equilíbrio como, por exemplo, elevada geração de ERO ou deficiências ou defeitos genéticos nas defesas antioxidantes, uso de drogas, toxinas ou transferência de elétrons ao oxigênio por metais de transição (VASCONCELOS et al., 2007). Convém salientar que nem sempre as ERO são subprodutos prejudiciais. A presença de ERO em quantidades fisiológicas são necessárias para a homeostasia. Atualmente já é reconhecido que eles desempenham um papel importante como mensageiros secundários em muitas vias sinalização intracelular e resposta imunológica (DROGE, 2002; RIBEIRO, 2006; TONINI et al., 2013). Assim, pequenas perturbações (ou modulações) no equilíbrio do estresse oxidativo são importantes para induzir adaptações homeostáticas em resposta a mudanças no ambiente imediato, ao passo que mais perturbações importantes podem levar a danos irreparáveis e morte celular (DIAS et al., 2014). A fronteira entre as alterações fisiológicas normais e injúrias é, portanto, inevitavelmente, indistinta. A definição de estresse oxidativo fornecida acima é necessária porque o resultado depende, em parte, no compartimento celular em que as ERO são geradas. Existem muitas potenciais fontes de ERO, e as contribuições relativas destes dependerá das circunstâncias ambientais prevalecentes. Assim, as células estão constantemente expostas aos possíveis danos causados pelas ERO, que podem ser geradas endogenamente (fonte majoritária) e/ou exogenamente. As ERO endógenas são formadas pelo próprio metabolismo celular através da mitocôndria, peroxissomos, lipoxigenases (BOVERIS et al., 1972; TURRENS & BOVERIS, 1980; TURRENS, 1997; GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2010). Por vias exógenas, uma das fontes mais comuns é fonte de interesse no presente estudo: o cigarro (FAUX et al., 2009).

As enzimas envolvidas na produção e remoção das ERO são expressas em vários tecidos, incluindo células vasculares (CLEMPUS & GRIENGLING, 2006). A produção intencional de ERO parece ser importante para promover uma função vascular normal, atuando como moléculas de sinalização celular, desde a proliferação de células musculares lisas até o controle de seu tônus (PARAVICINI & TOUYZ, 2008). O endotélio é um importante regulador do tônus vascular, pois controla a agregação plaquetária/trombose, a inflamação, a coagulação, a regeneração e a permeabilidade vascular. Enquanto tecido “saudável”, expressa por exemplo, enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) que degrada ERO, convertendo $\cdot O_2^-$ em peróxido de hidrogênio H_2O_2 (ROSS, 1993). Em seguida, outras enzimas denominadas catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPX), podem

converter o H_2O_2 em H_2O e O_2 , removendo integralmente os subprodutos das ERO e evitando assim danos permanentes em lipídeos, proteínas e DNA (LONN; DENNIS; STOCKER, 2012; TONINI et al., 2013; KALYANARAMAN, 2013).

Outro importante prejuízo marcado pelo estresse oxidativo refere-se a diminuição da biodisponibilidade de NO desencadeada pela presença de $\cdot\text{O}_2^-$. Quando estas duas espécies são formadas em células, mesmo na presença de radicais sequestrantes e enzimas antioxidantes, elas reagirão devido à constante de velocidade mais elevada do que outras reações (KALYANARAMAN, 2013). Como consequência, geram um produto denominado peroxinitrito (OONO^-) (PARAVICINI & TOUYZ, 2008). Como consequência, os efeitos fisiológicos importantes mediados pelo NO podem ser comprometidos.

O radical NO é sintetizado a partir de um aminoácido chamado L-arginina, que sofre um processo de oxidação catalisado por uma enzima chamada NO sintase (NOS), produzindo L-citrulina e NO. A NOS pode ser do tipo constitutiva (cNOS), dividida em NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS), ou induzível (iNOS) (NORIS et al., 2004). Por que o NO um radical tão importante para a fisiologia humana? A eNOS é fundamental no processo de vasodilatação e proteção endotelial seja quando receptores da membrana das células endoteliais são ativados por acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, serotonina e outros, ou por estímulos causados pelos atritos no endotélio vascular (*shear stress*), produzindo assim o NO (PAPAHARALAMBUS & GRIENGLING, 2007). O NO atua na proteção vascular regulando o tônus vascular através de sua liberação contínua em pequenas quantidades. Além de prevenir a agregação plaquetária pela elevação da GMPc e diminuição do Ca^{++} intraplaquetário, essencial na ativação das plaquetas, o NO inibe tanto a produção de TXA_2 plaquetário (LOSCALZO, 2001; RAY; HUANG; TSUJI, 2012) como também a adesão de neutrófilos e monócitos ao endotélio vascular (LÓPEZ-JARAMILLO et al., 2001).

Foi demonstrado que o tabagismo na gravidez reduz a atividade da eNOS na vasculatura fetal, o que contribui para o crescimento intra uterino restrito causado pela diminuição da vasodilatação, nesses fetos. Estudos com cordões umbilicais e placentas de recém-nascidos cujas mães eram usuárias de cigarro demonstram, que há aumento na liberação de substâncias vasoconstritoras acompanhado de decréscimo na liberação de substâncias vasodilatadoras (MORROW et al., 1995; ENGLAND, 2003).

2.4.1 Fatores anti-oxidantes

Embora variadas ERO sejam produzidas durante o metabolismo celular normal, defesas enzimáticas e não enzimáticas participam da remoção dessas espécies. Os mecanismos protetores enzimáticos já foram previamente citados pela SOD, CAT e GPX. Também existem os mediadores não enzimáticos como a glutathione, o ácido ascórbico, flavonoides e carotenóides (BUETTNER, 1993; KALYANARAMAN, 2013).

Convém agora uma abordagem mais pormenorizada das enzimas antioxidantes. Encontramos descrição de duas isoformas de SOD em mamíferos, a Cu-Zn SOD, encontrada no citosol, no espaço intermembranar da mitocôndria e no espaço extracelular e a Mn-SOD, encontrada apenas na matriz mitocondrial (JACOB, 2009). Essas enzimas tem um metal de transição em sua essência, podendo assumir diferentes valências como transferência de elétrons durante o processo de desintoxicação. Duas formas de SOD convertem $\bullet\text{O}_2^-$ para com o co-fator manganês, processo esse restrito as mitocôndrias, enquanto as formas de cobre e zinco restritas ao citoplasma (MISTRY & WILLIAMS, 2011). Por fim, H_2O_2 é então transformado em H_2O e O_2 pelas ações da CAT ou GPx conforme citado anteriormente. A atividade da GPx depende da presença de glutathione reduzida (GSH) como um doador de hidrogênio (Figura 2). A glutathione é o principal tampão redox tiol celular em células, e é sintetizado em citosol a partir de L-glutamato, L-cisteína e glicina. A GSH participa num grande número de reações que formam desintoxicantes dissulfureto de glutathione (GSSG), que é convertido de volta para GSH pela ação da glutathione redutase (GR), à custa de NADPH. O último é gerado através da via das pentoses fosfato, dos quais a glicose - 6 - fosfato desidrogenase (G6PD) é a primeira enzima. Esta enzima está sujeita a polimorfismos comuns, e sua diminuição da atividade pode comprometer as concentrações de GSH e levar a embriopatia (NICOL et al., 2000).

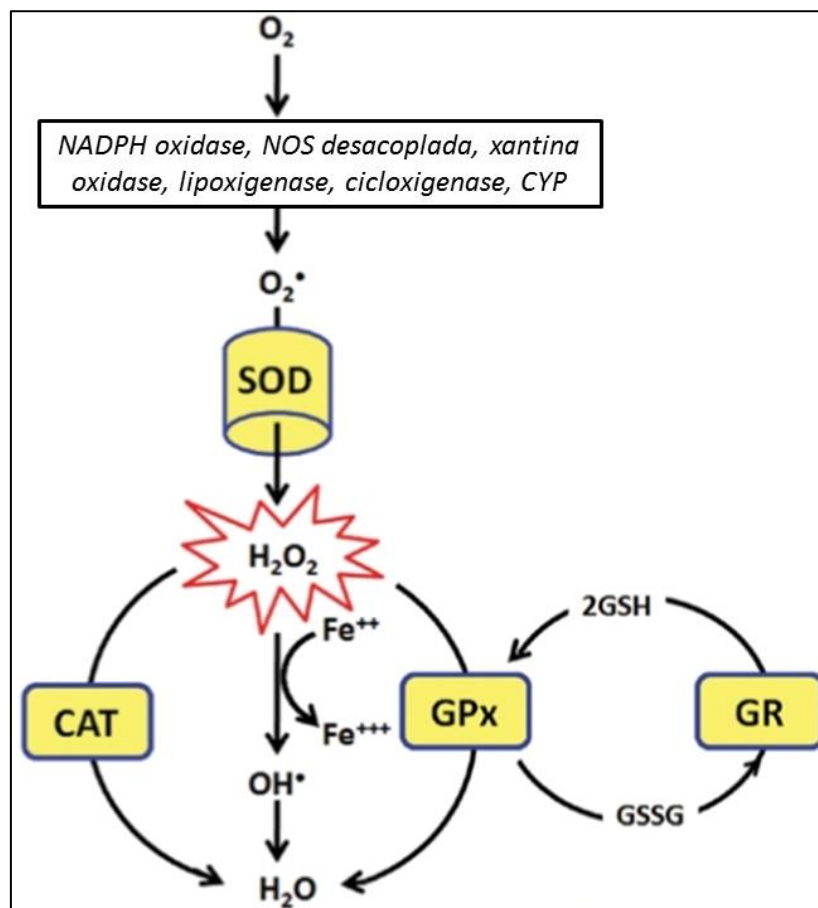


Figura 2 – Principais enzimas endógenas antioxidantes: Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutaciona Peroxidase (GPx) e Glutaciona Redutase (GR). A SOD catalisa a dismutação do $\bullet\text{O}_2^-$ para uma espécie menos reativa, o H_2O_2 . Em seguida, pode ocorrer uma conversão de H_2O_2 para $\bullet\text{OH}$ (reação de Fenton), que é muito reativo. Gpx neutraliza o H_2O_2 pela redução através de duas moléculas de glutatona resultando na formação de 2 moléculas de H_2O e uma de glutatona reduzida (GSSG). A GR participa convertendo novamente a GSSG em GSH, renovando o ciclo. (Adaptado de PANDEY; RIZVI, 2010).

As defesas não enzimáticas incluem o ácido ascórbico (vitamina C) e α -tocoferol (vitamina E). Estes novamente agem em conjunto, sendo necessários ascorbato para regenerar α -tocoferol reduzido. Atuando em conjunto, podem inibir a peroxidação lipídica (PACKER; SLATER; WILLSON, 1979; BURTON et al., 1985; BUETTNER, 1993).

Ceruloplasmina e transferrina também desempenham papéis importantes sequestrando íons de ferro livres e assim inibindo reação de Fenton e produção de $\bullet\text{OH}$. Polimorfismos nas enzimas antioxidantes, ou restrição dietética de micronutrientes como o selênio podem portanto, desempenhar um papel importante na predisposição ao estresse oxidativo e complicações da gravidez (TEMPFER et al., 2001).

Durante a gravidez, alguns micronutrientes e vitaminas tem papel antioxidante ou agem como co-fatores para enzimas anti-oxidantes, tais como:

selênio, cobre, zinco, manganês e as vitaminas C e E. O cobre separadamente, parece agir como pró oxidante, enquanto associado a Cu/Zn SOD, funciona como antioxidante (BROPHY; HARRIS; CRAWFORD, 1985; VITORATOS et al., 1999; AKSOY et al., 2003). O selênio é incorporado a proteínas dando origem as selenoproteínas, incluindo a GPx entre enzimas antioxidantes (RAYMAN, 2009). O cobre é um co-fator essencial para enzimas envolvidas e, reações metabólicas e angiogênese, transporte de oxigênio, e proteção antioxidante, como: CAT, SOD e CYP (BROPHY; HARRIS; CRAWFORD, 1985; VITORATOS et al., 1999; AKSOY et al., 2003). O zinco é componente essencial de cerca de 200 metaloenzimas que participam do metabolismo de carboidratos e proteínas, síntese de ácido nucleico, função antioxidante, divisão e diferenciação celular, tornando-o essencial para uma embriogênese de sucesso (IZQUIERDO ÁLVAREZ et al., 2007). O manganês é livremente encontrado na natureza, geralmente ligado ao ferro e é um importante co-fator enzimático, como o Mn-SOD, previamente descrita (WOOD, 2009).

2.4.2 Estresse oxidativo e gestação

Sendo o tabaco uma fonte exógena de ERO, e sabidamente um agente prejudicial para o desenvolvimento fetal intrauterino, promove estresse oxidativo. Entretanto, existem outras condições que geram essa condição na gestação, como o diabetes tipo 2, resistência insulínica, pré eclampsia, restrição de crescimento intra uterino (VALKO et al., 2007; GUPTA et al., 2007; ASEMI et al., 2013).

Em 2005, Chelchowska, Laskowska-Klita e Niemiec mostraram em gestantes que a SOD tem sua atividade aumentada em 20% no terceiro trimestre, se comparada aos seus níveis no primeiro trimestre. Em grávidas fumantes, a atividade da SOD está aumentada quando comparado a não fumantes, porém com um decréscimo de 15% no terceiro trimestre em relação ao primeiro trimestre de gestação em gestantes tabagistas. Outros estudos revelaram que o cigarro aumenta a peroxidação lipídica e formação de malonaldeído (MDA), comprometendo a fisiologia da membrana celular (SERDAR et al., 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar possíveis alterações morfológicas e bioquímicas de cordão umbilical de puérperas expostas ao tabaco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conhecer o perfil antropométrico das usuárias de cigarro na Grande Vitória- ES, Brasil;
- Avaliar por parâmetros de estresse oxidativo o impacto do tabagismo em células mononucleares de sangue de cordão umbilical de recém nascidos de puérperas expostas e não expostas, utilizando-se de citometria de fluxo.
- Avaliar viabilidade celular de células mononucleares de cordão umbilical de recém nascidos de puérperas expostas e não expostas.
- Comparar possíveis prejuízos morfológicos e remodelamento vascular causados pelo cigarro em cordão umbilical de recém nascidos de puérperas expostas e não expostas.
- Avaliar dano proteico ao tecido de cordão umbilical de recém nascidos de puérperas expostas e não expostas.

4. MÉTODOS

4.1. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este estudo foi observacional, analítico do tipo caso controle. Foram coletadas amostras de cordão umbilical pelo pesquisador imediatamente após o parto de 31 recém-nascidos de pacientes expostas ao tabaco e 38 recém-nascidos de pacientes não expostas, que concordaram em participar do estudo de forma voluntária e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), ainda no pré-parto. O TCLE foi assinado após os esclarecimentos acerca da ausência de desconforto ou prejuízo para a parturiente e seu bebê além de ser um tecido que rotineiramente é descartado. Houve treinamento do pesquisador previamente à coleta das amostras, e ainda realização de projeto piloto. Todas as pacientes selecionadas preencheram os critérios de inclusão e nenhuma delas preencheu os critérios de exclusão. O protocolo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa e aprovado pelo mesmo em 12/12/2012, conforme parecer gerado na Plataforma Brasil (nº 06570012000005064).

O instrumento de coleta de dados constitui-se de um formulário de coleta de dados aplicado a todas 69 pacientes submetidas ao estudo (em apêndice). Esse questionário, composto por questões pertinentes à procedência, escolaridade, profissão, história patológica pregressa, história da gravidez atual, uso de drogas, sendo analisadas as relacionadas: à descrição da amostra, aos registros habituais realizados no consultório ou no pré-parto (fichas clínicas, prescrição em receituário, cartão de pré-natal e exames pré-natais).

Os critérios de inclusão utilizados foram: recém-nascidos de puérperas usuárias e não usuárias de cigarro, com idade superior a 18 anos; idade gestacional entre 37 e 40 semanas, peso fetal acima de 2.000g, amniorrexe inferior a 18 horas e ausência de processos infecciosos durante a gravidez. Os critérios de exclusão foram: gestantes hipertensas, diabéticas, portadoras de doenças cardiovascular e ou renal, com idade inferior que 18 anos, idade gestacional abaixo de 37 semanas, sofrimento fetal grave (mecônio acima de ++/4), e índice de Apgar menor que 7 no primeiro minuto).

As amostras de cordão umbilical de puérperas expostas (n=31) e não expostas ao tabaco (n=38) foram colhidas nas seguintes Maternidades públicas da grande Vitória que atendem usuárias do Sistema Único de Saúde no Estado do

Espírito Santo: Associação Beneficente Pró-Matre em Vitória, Maternidade Coronel Leôncio Vieira de Rezende, na Serra e no Hospital Estadual Infantil e Maternidade Alzir Bernardino Alves, em Vila Velha e Hospital da Mulher, em Vila Velha. Todas essas amostras foram colhidas imediatamente após o nascimento, clampeamento do cordão e o desprendimento da placenta. Após a lavagem de um segmento do cordão, as amostras foram subdivididas em duas porções:

- a primeira (mais próxima a placenta), imediatamente acondicionada em um tubo com solução de formaldeído a 10% em PBS 0,1 mol/L (pH 7,4) em proporção 1:9 (p/v), para avaliação morfológica do cordão umbilical de recém nascidos expostos e não expostos ao tabaco. Também foram tratadas para MEV na seguinte ordem: Fixação com glutaraldeído 2,5% + folmaldeído 2% em solução tamponada (Cacodilato 0,1mol/L) por 24h, lavagem com Tampão Cacodilato 0,1mol/L, pós fixação com ferrocianeto de potássio 2,5% por 1 hora; lavagem com Tampão Cacodilato 0,1mol/L e água “miliQ”, desidratação com soluções de etanol, secagem em ponto crítico, cobertura em ouro metalizador, visualização em MEV (Jeol, JEM6610 LV), registro da fotografia.

- a segunda - imediatamente armazenada em tubos acondicionados a - 196 °C em tambor de N₂ líquido, foi utilizada para quantificação de produtos avançados de oxidação protéica (AOPP).

Além das amostras de cordão, foi colhido sangue do cordão umbilical de 21 recém-nascidos expostos ao tabaco e 36 recém nascidos não expostos. Após a centrifugação do sangue coletado com solução de gradiente de densidade “ficoll-paque”, as células sanguíneas mononucleares do cordão umbilical foram isoladas para avaliação de estresse oxidativo pela citometria de fluxo.

4.2 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma ferramenta que proporciona a determinação das características físicas, biológicas e/ou químicas das células. Essa metodologia permite a análise de um grande número de células em um curto período de tempo. Todo material biológico, com tamanho entre 0,5 e 50µm, que contém células ou partículas em suspensão pode ser analisado por citometria de fluxo. A citometria de fluxo é uma tecnologia que mede simultaneamente e, em seguida, analisa várias características físicas das partículas individuais, geralmente células, à medida que

passam pela corrente fluida através do feixe de luz. As propriedades medidas incluem o tamanho relativo de uma partícula, granulosidade ou complexidade interna e intensidade de fluorescência (TONINI et al., 2013; DIAS et al., 2014).

Em nossos experimentos, foi utilizado o citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) acoplado a um computador. Foram adquiridos 30.000 eventos de cada amostra (10.000 eventos em triplicata) e os dados coletados foram analisados pelos *softwares* BDFACSDiva e FCSExpress (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA). As células são analisadas na citometria de acordo com suas propriedades físicas e químicas como tamanho e complexidade interna ou granulosidade, e intensidade de fluorescência que é proporcional à quantidade de marcação pela sonda fluorescente utilizada, diclorofluoresceína (DCFH-DA), dihidroetídeo (DHE), anexina V (FITC), iodeto de propídeo (PI).

Ao iniciar o citômetro, as bolhas de ar foram retiradas do sistema fluídico para evitar a aquisição de erros nas leituras das amostras. Antes de adquirir as amostras, foi utilizado o reagente CS&T (Cytometer Setup and Tracking; BD) para ajustar as voltagens dos tubos fotomultiplicadores e avaliar sua sensibilidade. Este reagente é utilizado para manutenção do padrão de qualidade das leituras e permite a reprodutibilidade dos resultados obtidos pelo citômetro. Além disso, após cada aquisição, foi feita a limpeza do tubo de injeção de amostra (SIT: Sample Injection Tube), pois pequenas quantidades de fragmentos residuais de células existentes no circuito poderiam contaminar a próxima amostra a ser processada.

Para todos os protocolos de citometria de fluxo, as células foram visualizadas em gráfico de pontos (dot plot) bidimensional onde foram analisados os parâmetros de tamanho ou volume relativo (FSC) e granulosidade ou complexidade interna (SSC), em escala linear, para identificação das populações celulares e exclusão de debris. Em seguida, realizou-se um *gate* eletrônico único em torno das células de interesse para excluir células inviáveis da região analisada. Além disso, foram feitos histogramas e *dot plots* para análise em escala logarítmica de cada marcador fluorescente utilizado em cada protocolo.

Para a avaliação de apoptose, utilizou-se a porcentagem de células positivas para a proteína Annexina V e o corante vital iodeto de propídeo (PI).

4.2.1 Funcionamento do citômetro de fluxo

Dados de fluorescência foram coletados em escala logarítmicas. As fluorescências do FITC e do DCFH-DA foram captadas pelo filtro de 530/30 (530±15) nm e medidas pelo detector E (octógono). Já as fluorescências do PI e do DHE foram captadas pelo filtro de 585/42 (585±21) nm e medidas pelo detector D (octógono). É importante frisar que nos protocolos em que foram utilizados dois marcadores simultaneamente (apoptose), foi realizada a compensação das fluorescências com o objetivo de minimizar a interferência da luz emitida e captada pelos tubos fotomultiplicadores (Campagnaro,2013).

4.2.2 Isolamento de células mononucleares do sangue do cordão umbilical

O sangue coletado foi acrescido de solução nutritiva (DMEM low-glucose, Sigma) e colocado em um tubo Falcon (BD) em um volume final de 6ml. Em seguida foi feita centrifugação (Equipamento – Eppendorf 5702) por 10 minutos a 1200rpm (rotações por minuto). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de células ressuspenso em 4mL de DMEM. Em outro tubo Falcon adicionou-se 4mL de gradiente de densidade Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare), que consiste em uma solução com densidade de 1,077 g/mL. A solução com 4mL de células foi pipetada e colocada pela parede sobre o gradiente de densidade Ficoll-Paque™ PLUS com cuidado para não misturar as duas fases. O tubo contendo 4mL de células + 4mL de Ficoll-Paque™ PLUS, totalizando um volume final de 8ml, foi levado para centrífuga (Eppendorf 5702) com rotor *swing-bucket*, sem freio, por 30 minutos a 1500rpm. Durante a centrifugação, os eritrócitos e leucócitos granulócitos atravessam a fase orgânica, que corresponde ao gradiente de densidade Ficoll-Paque™ PLUS, e sedimentam-se no fundo do tubo. A “nuvem” de CMN encontra-se na interface entre as duas soluções. Na fase superior, fase aquosa, encontra-se as plaquetas e proteínas plasmáticas.

O anel de CMN formado entre o DMEM e o gradiente de densidade foi imediata e delicadamente recolhido com uma pipeta de vidro. O material aspirado foi colocado em um novo tubo Falcon. Como o gradiente de densidade Ficoll-Paque™ PLUS é altamente tóxico para as células, é necessário fazer lavagens seriadas a fim de eliminar possíveis resíduos remanescentes desse gradiente. Logo, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1200 rpm com uma solução salina tamponada (Phosphate Buffer Solution – PBS 10%) para lavar o excesso de gradiente. Essa lavagem é repetida três vezes para garantir a remoção completa do gradiente de

densidade. As células isoladas foram ressuspensas em PBS para posterior análise em citômetro de fluxo (Campagnaro, 2013).

4.2.3 Determinação da viabilidade e apoptose (anexina)

Para determinação de viabilidade celular foi utilizada marcação com anexina V e PI, seguida de análise em citômetro de fluxo. Este ensaio consiste na ligação eficiente da proteína anexina V aos resíduos do fosfolípido fosfatidilserina (FS). Na célula viável, estes resíduos se encontram na face interna da membrana plasmática. Entretanto, quando o processo de morte celular programada (apoptose) é iniciado, estes resíduos são rapidamente translocados para a face externa da membrana, permitindo a ligação da proteína anexina V conjugada a um fluorocromo. O PI, marcador padrão de viabilidade, é usado para distinguir células viáveis de não-viáveis, uma vez que células viáveis com membrana intacta são capazes de excluir o corante, enquanto que membranas de células mortas ou danificadas são permeáveis. Além disso, o PI é usado em conjunto com a anexina V para permitir a identificação de células em estágio inicial de apoptose. O PI penetra em células, nas quais há perda da integridade da membrana celular, enquanto que células marcadas apenas com Anexina V-FITC indicam morte apoptótica. Já as células marcadas com ambos os fluorocromos representam a porcentagem de células nos estágios finais de apoptose.

Foram retiradas alíquotas de 200µl de células e estas, centrifugadas por 10 minutos a 1200rpm. Em seguida, ressuspensas em 400µl de tampão *Binding Buffer* 10% (10mmol HEPES, NaOH, pH7,4, 140mmol NaCl, 2,5mmol CaCl₂) na concentração de 1x10⁶ células/ml. A seguir, 100µl desta solução (1x10⁵ células) foram transferidos para um novo tubo, onde receberam 2µl de anexina V-FITC e 2µl de PI. As células foram incubadas por 15 minutos, a temperatura ambiente (25°C), na ausência de luz. Para controle positivo foi utilizado H₂O₂. Posteriormente às marcações, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1200 rpm e por fim, 400µl de PBS com 10% Soro Fetal Bovino foram adicionados a cada tubo e as amostras analisadas no citômetro de fluxo. Este ensaio determina a proporção de células vivas (anexina V-/PI-); células em estágio inicial de apoptose onde ocorre apenas a exposição da FS na face externa da membrana plasmática com consequente marcação com a anexina V (anexina V+/PI-); células em estágio tardio de apoptose ou em necrose onde além da exposição da FS, a membrana plasmática sofre colapso e se torna permeável ao PI fazendo com que a célula possua dupla

marcação (anexina V+/PI+). O resultado é um gráfico de *dot plot* com quadrantes Q1, Q2, Q3, Q4 sendo, Q1: positiva apenas para PI – células com dano; Q2: Apoptose (positiva para Anexina e PI); Q3: células viáveis (negativa para Anexina e PI); Q4: apoptose precoce (Positiva para Anexina e negativa para PI). Para cálculo da taxa de apoptose total foram somados quadrantes Q2+Q4. A análise dos dados foi realizada com auxílio do software DIVA e FCS Express 4 Flow Research Edition.

4.2.4 Medida de estresse oxidativo pela determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (DHE E DCF)

As espécies reativas de oxigênio (ERO) foram medidas por citometria de fluxo através da fluorescência emitida pela diclorofluoresceína (DCF-DA) e pelo etídeo, que são produtos da oxidação do diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA) e do dihidroetídeo ou hidroetidina (DHE), compostos sensíveis, principalmente, ao H_2O_2 e ao $\bullet O_2^-$, respectivamente.

O H2DCFDA é um éster, não- fluorescente, internalizado pelas células e que se incorpora às regiões hidrofóbicas. Após entrar na célula, o H2DCFDA perde o grupo diacetato, pela ação de esterases intracelulares, resultando na formação de diclorodihidrofluoresceína (DCFH), que pode ser oxidado pelo H_2O_2 a diclorofluoresceína (DCF), composto altamente fluorescente (Figura 3). Convém salientar que outras ERO, como NO, $ONOO^-$ e radical peróxil (ROO^\bullet) podem também oxidar o DCFH. Dessa forma, o DCF não pode ser caracterizado como um marcador exclusivo para H_2O_2 .

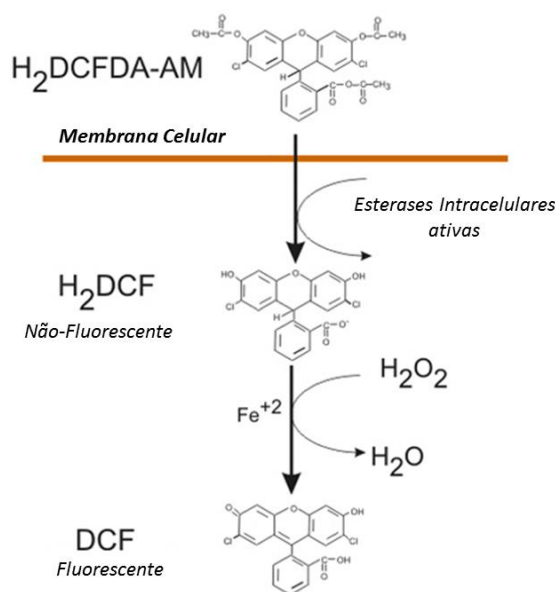


Figura 3 – Formação do DCF fluorescente para detecção indireta de H_2O_2 . (Adaptado de HELD, 2010).

O DHE, forma reduzida do brometo de etídeo, também entra livremente na célula e é relativamente mais sensível ao $\bullet O_2^-$, entretanto pode reagir com outras ERO, como o radical hidroxila ($\bullet OH$), para formar etídeo. No citoplasma, o DHE é um fluorocromo azul (420nm), entretanto quando oxidado à etídeo, este se liga ao DNA causando a amplificação da fluorescência vermelha (518-605nm).

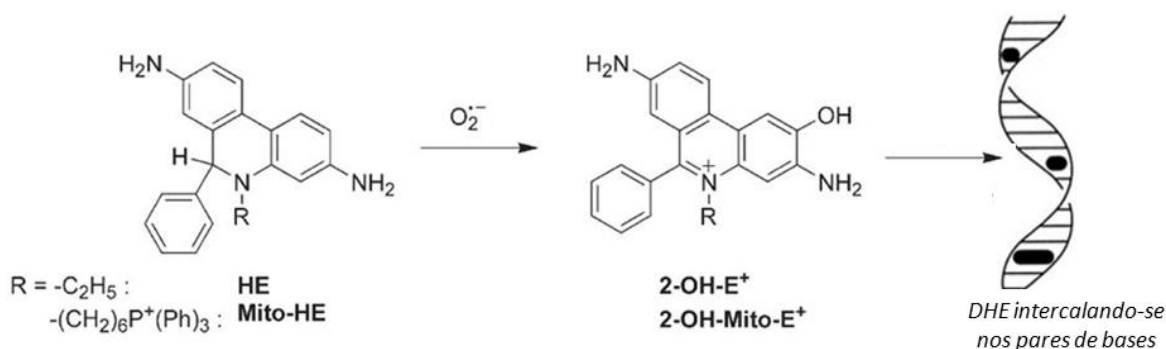


Figura 4 – Formação do DHE oxidado fluorescente para detecção indireta de $\bullet O_2^-$. (Adaptado de ZEILONKA; KALYANARAMAN, 2010)

Para este experimento as células foram ressuspensas em 1mL de PBS na concentração de 1×10^6 células/mL. As amostras foram incubadas, no escuro, com 20ul de solução de DCF-DA ($10 \mu M$) e 20 ul de DHE ($160 \mu M$), por 30 minutos à $37^\circ C$ e, em seguida centrifugadas por 10 minutos a 1200rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 400ul de PBS com 10% de SFB. A aquisição dos dados foi realizada com citômetro de fluxo FACSCanto II equipado com laser de 488nm. Os sinais foram obtidos utilizando filtros de 585nm para etídeo e 530nm para DCF-DA. Para o controle positivo do DCF-DA, as células foram incubadas com $50 \mu M$ H_2O_2 e para o controle positivo do DHE, as células foram incubadas com e $100 \mu M$ de doxorrubicina por 5 minutos. Para o controle negativo, as amostras celulares foram incubadas apenas em PBS. A análise dos dados foi realizada com auxílio do software DIVA, pela determinação da mediana de intensidade de fluorescência de 10.000 células.

Todos os protocolos de citometria de fluxo foram realizados no laboratório de Fisiologia Translacional da Universidade Federal do Espírito Santo(UFES).

4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os cordões foram colhidos logo após o secundamento da placenta, na sua porção mais proximal a esta, e fixados em solução de formol (4%) em tampão fosfato (PBS, pH = 7,4; 0,1M). Posteriormente a amostra foi preparada para inclusão em parafina para obtenção de cortes de 5 µm de espessura em micrótomo. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE para análise histológica e morfométrica. As lâminas foram analisadas em microscópio trinocular Olympus AX70 (Olympus Corporation, Japan) acoplado a câmera digital AxioCam ERC 5s (Carl Zeiss, Alemanha). Para análise morfométrica foi utilizado o software AxioVision Imaging System 4.8 (Carl Zeiss). Em estudo cego foram avaliados 3 cortes por cordão. Foram realizadas medidas de área da luz e área total dos três vasos umbilicais (duas artérias e uma veia). Utilizando uma objetiva de 4x, a área total de secção transversa e do próprio lúmen foram calculados e finalmente comparado entre os grupos. Com esses dados obtidos, também foi possível medir a área total de parede, subtraindo a área total de secção transversa da área luminal vascular. Essas análises foram realizadas no laboratório de ultraestrutura celular Carlos Alberto Redins, do Departamento de Morfologia da UFES.

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Amostras típicas do seguimento proximal dos cordões umbilicais de expostas e não expostas ao cigarro foram fixadas (glutaraldeído 2,5% + formaldeído 2%) em solução tamponada (Cacodilato 0,1mol/L) por 24 horas e posteriormente lavadas em tampão Cacodilato (0,1 mol/L; pH 7,2-7,4) para pós-fixação em solução de ferrocianeto de potássio 2,5% por uma hora. Seguido da lavagem com solução tampão cacodilato e água "miliQ", as amostras foram desidratadas em diferentes concentrações de etanol e levadas para secagem em ponto crítico (Autosandri-815, Tousimis) e posterior cobertura de ouro em metalizador (Desk V, Denton Vacuum) para visualização em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV). Essas análises foram realizadas no laboratório de ultraestrutura celular Carlos Alberto Redins, do Departamento de Morfologia da UFES.

4.5 AOPP

As ERO podem também oxidar proteínas formando resíduos de aminoácidos carbonilados ou de ditirosina (DiTyr). Com isso, os níveis de carbonilas proteicas e DiTyr podem representar marcadores úteis de oxidação protéica. O

método para avaliar o conteúdo de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) foi realizado de acordo com Witko-Sarsat e colaboradores (1996). As AOPP são criadas em situações de estresse oxidativo e analisadas em comparação às reações de agentes oxidantes clorinados como as cloraminas. Para tanto, foram utilizados 200µL de tecido macerado de cordão umbilical e diluído em 1:5 de PBS, 10 µL de 1,16 M KI foi adicionado em cada tubo. Logo após 20 µL de ácido acético foram adicionados por 2 minutos. A absorbância da reação foi imediatamente lida em 340 nm contra o branco contendo 200µL de PBS, 20µL de ácido acético e 10µL de KI. O conteúdo de AOPP foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 µM realizadas com equivalentes de cloramina T. Os resultados são expressos em µmol de equivalentes de cloramina T/mg proteína. A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Nessa medida, as amostras precisaram ser diluídas em 1:10.

Este protocolo foi realizado nos laboratórios do programa de pós graduação em ciências farmacêuticas da UVV.

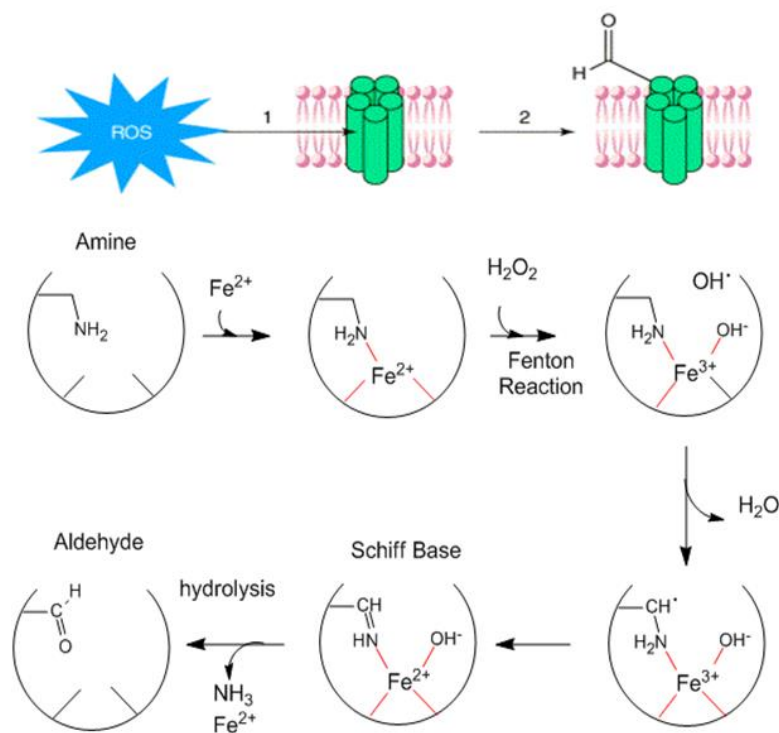


Figura 5- Esquema mostrando a oxidação protéica (formação dos grupos carbonilados). Essa imagem demonstra algumas fases para a formação de AOPP.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média ± EPM. As médias dos valores comparando os diferentes grupos foram analisadas estatisticamente por

teste *t* de *Student*, utilizando-se o *software* PRISMA (versão 6). As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 PARÂMETROS GERAIS DAS PACIENTES

A tabela 1 apresenta alguns parâmetros das mães e dos neonatos. Não foram observadas diferenças em variáveis de exames físicos, medidas antropométricas nem parâmetros hematológicos convencionais analisados. Entretanto, nós observamos uma queda de aproximadamente 10% ($p < 0,05$) na viabilidade de células mononucleares do sangue de neonatos de gestantes fumantes quando comparado ao grupo de pacientes não-expostas ao cigarro.

Tabela 1: Parâmetros das pacientes

Parâmetros	Não expostos (n=38)	Expostos (n=31)
Idade	25.8 ± 1	26.6 ± 0.9
Número de cigarros fumados por dia	-	8.5 ± 1.1
Pressão arterial média (mmHg)	81 ± 1.3	83.8 ± 1.5
Idade gestacional	39.8±0.3	39.3±0.3
Capurro (semanas)	39.8±0.14	39.6±0.14
Parto		
Vaginal	18/38 (47%)	27/31(87%)
Cesareana	20/38 (53%)	4/31(13%)
Peso de nascimento (g)	3248±83	3030±80
Apgar 1 minuto (mediana)	9 (8-9)	9 (8-9)
Apgar 5 minutos (mediana)	10 (9-10)	10 (9-10)
Perímetro cefálico (cm)	33.8±0.15	33.5±0.16
Hematócrito (%)	35.1±0.53	34.5±0.46
Hemoglobina (g/dL)	11.8±0.15	11.5±0.15
Viabilidade das células mononucleares sanguíneas de Cordão umbilical (%)	95.4 ± 1.1	86.1±2.0 *

5.2 ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO E ANÁLISE DE APOPTOSE EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE DE NEONATOS

A produção de ERO foi avaliada através de citometria de fluxo com DHE e DCF para quantificar a produção de $\cdot O_2^-$ e H_2O_2 , respectivamente. A presença de

ERO é indicado pela intensidade média geométrica da fluorescência (IMF, em unidades arbitrárias -ua). O histograma típico de análise por citometria de fluxo mostra um desvio à direita do gráfico de fluorescência de DHE e DCF (Figura 1A) do grupo de fumantes em comparação com o grupo não fumantes. Como esperado, observou-se na Figura 1B um aumento notável nos níveis de produção de ROS em pacientes fumantes (DHE: 1887 ± 189 ; DCF: 814 ± 66 au, $p < 0,05$) em comparação ao grupo de não fumantes (DHE: 987 ± 71 DCF: 532 ± 27 UA). Usando as mesmas amostras também foi avaliado o porcentagem de apoptose por citometria de fluxo utilizando anexina V-FITC e iodeto de propídio. A Figura 2 mostra gráficos representativos de pontos para cada um dos grupos, mostrando um aumento na porcentagem de apoptose (Q2 + Q4) no grupo de fumantes ($38 \pm 4,5\%$, $p < 0,05$) em comparação aos pacientes não fumantes ($19 \pm 3,7\%$).

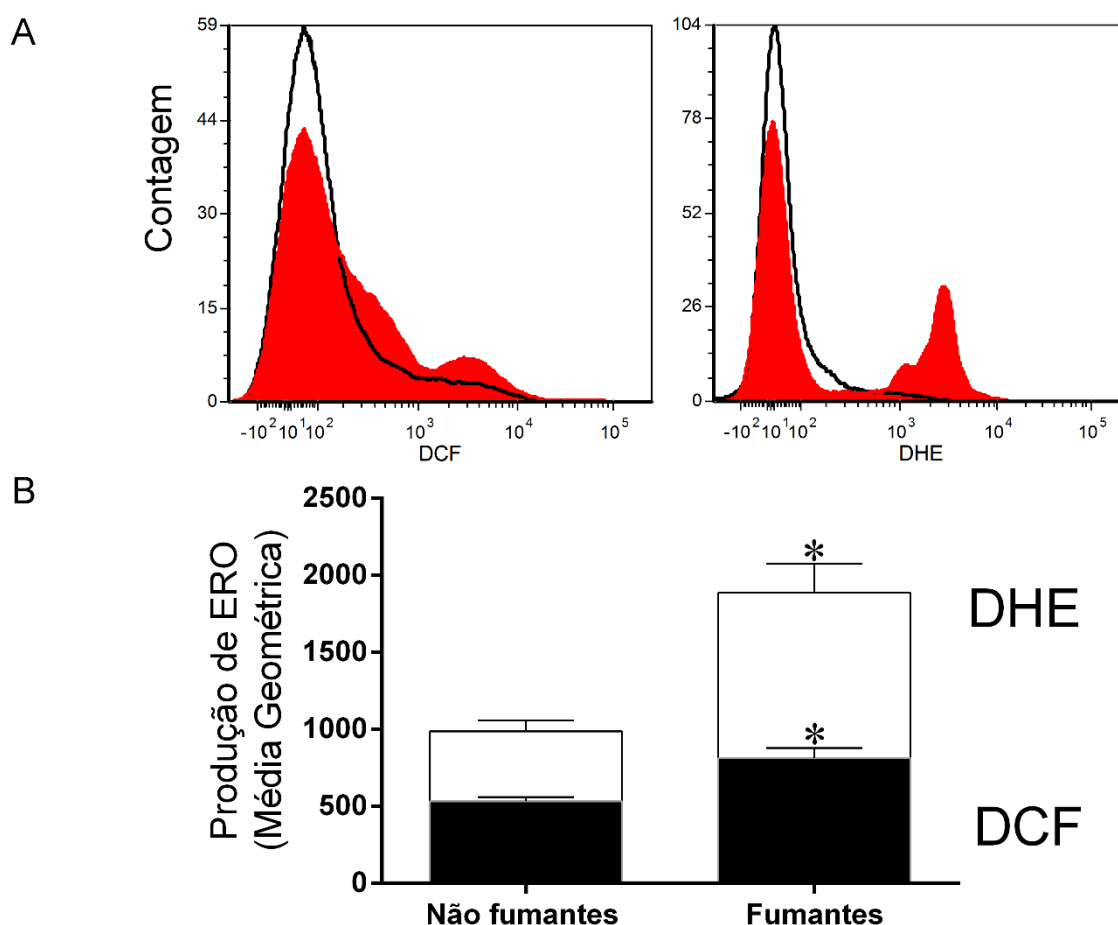
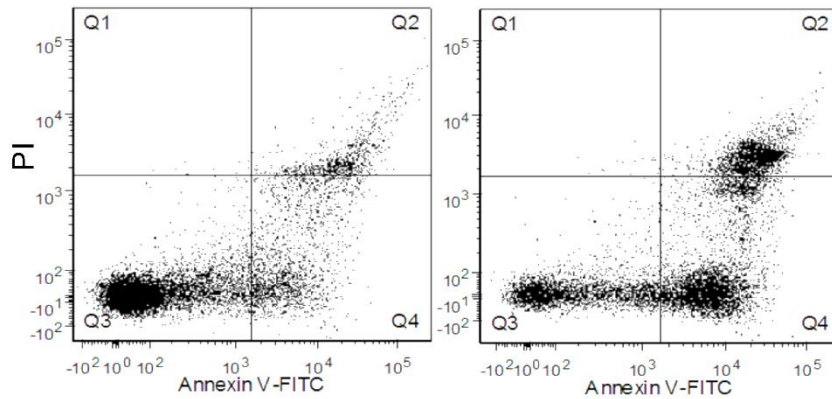


Figura 6- Produção de ERO. (a) Histogramas representativos de citometria de fluxo, usando dihidroetídeo (DHE) e diclorodihidrofluoresceína (DCF), em células mononucleares de sangue do cordão umbilical de expostos e não expostos ao cigarro. O log da fluorescência (eixo X) ilustra a intensidade de fluorescência de acordo com o número de células contadas. (b) Gráfico mostrando notável aumento do nível de ânion superóxido (por DHE) e peróxido de hidrogênio (por DCF) em sangue dos neonatos de mães fumantes ($n= 23$). Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

* $p < 0,05$ vs. não fumantes ($n=30$). Na figura A o traçado em preto corresponde a sangue recém nascidos de mães não fumantes, enquanto que o colorido em vermelho representa sangue de recém nascido de mães fumantes.

A



B

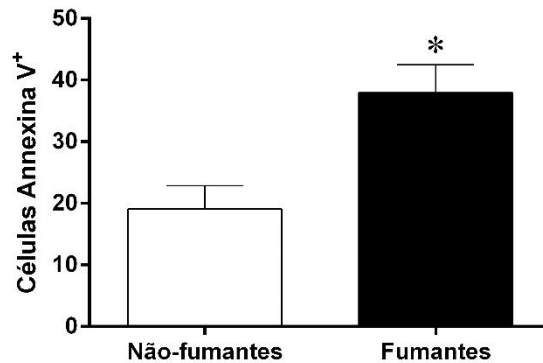


Figura 7- Análise apoptose por citometria de fluxo. Gráficos *dot plot* típicos, mostrando dados de apoptose comparando células mononucleares sanguíneas dos neonatos de mães (A) não- fumantes ($n= 13$, esquerda) e fumantes ($n=13$, direita), usando iodeto de propídeo (PI) e anexina V. Quadrante 1 (Q1) representa células inviáveis (PI positivo e anexina negativo). Quadrante 2 (Q2) representa as células em apoptose tardia, ou necrose (PI e anexina positivos). Quadrante 3 (Q3) representa as células viáveis, isto é estas células são PI e anexina negativas. Quadrante 4 (Q4) representa células em apoptose precoce (anexina positiva e PI negativa). Observe aumento notável no número de células apoptóticas (Q2+Q4) no grupo de fumantes ($n=13$). (B) Gráfico mostrando percentual médio de células apoptóticas(Q2+Q4). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. não fumantes.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE AOPP NO CORDÃO UMBILICAL

Para estimar o grau de dano mediado pela oxidação proteica no cordão umbilical, a presença de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) foi investigada. Neste tecido, a concentração de AOPP aumentou ($p < 0,05$) no grupo de fumantes em comparação com os pacientes não fumantes ($232,1 \pm 52,9$ versus $94,3 \pm 13,9$ $\mu\text{mol} / \text{mg}$ de proteína, respectivamente), tal como ilustrado na Figura 3.

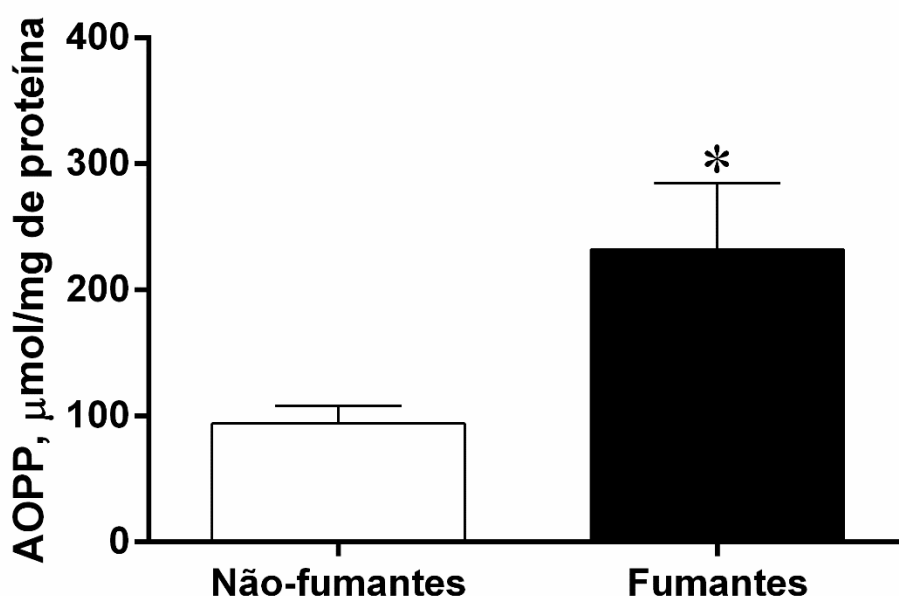


Figura 8- Quantificação de AOPP. Níveis de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) em cordão umbilical de gestantes fumantes ($n=8$) e não fumantes ($n=6$). Os valores estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. não fumantes.

5.4 AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS

A Figura 4 resume os dados da área da secção transversal da veia e artérias do cordão umbilical, que mostra a área do lúmen semelhante nos pacientes fumantes em comparação com o grupo de não fumantes, tanto na veia ($37,5 \pm 4,5$ vs. $33,85 \pm 4,9$ μm^2 , respectivamente) quanto em artérias ($7,3 \pm 0,96$ vs $6,1 \pm 0,92$ μm^2 , respectivamente). Além disso, não mostram alteração significativa da área total do vaso (dados não mostrados), indicando ausência de remodelamento positivo vascular. A Figura 5 mostra fotomicrografias típicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do endotélio vascular de artérias umbilicais de gestantes, exibindo áreas difusas de espessamento endotelial com perda da arquitetura e disposição das células endoteliais no grupo das fumantes.

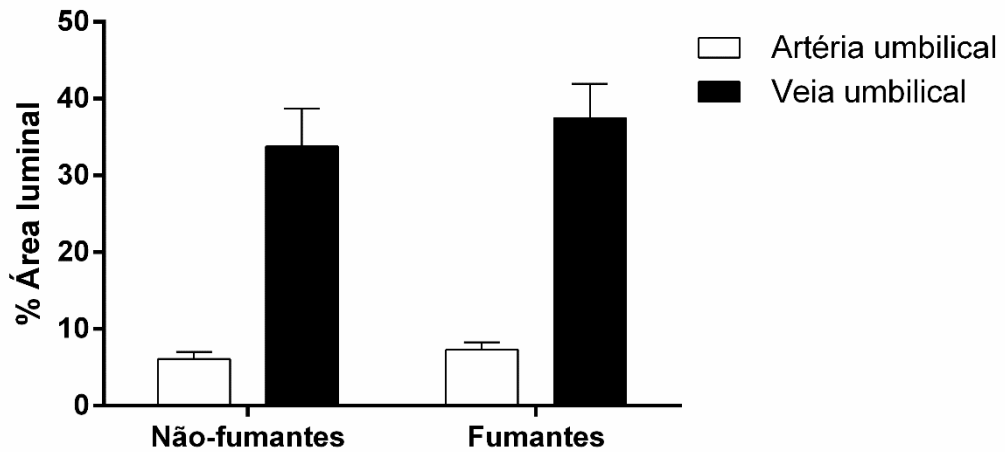


Figura 9- Análise de área luminal. Gráficos de barras mostrando porcentagem da área luminal obtidas por secção transversal das artérias (barras brancas) e veias (barras pretas) de cordão umbilical de neonatos do grupo de não fumantes (n=10) e fumantes (n=12). Os resultados estão expressos como média ± EPM.

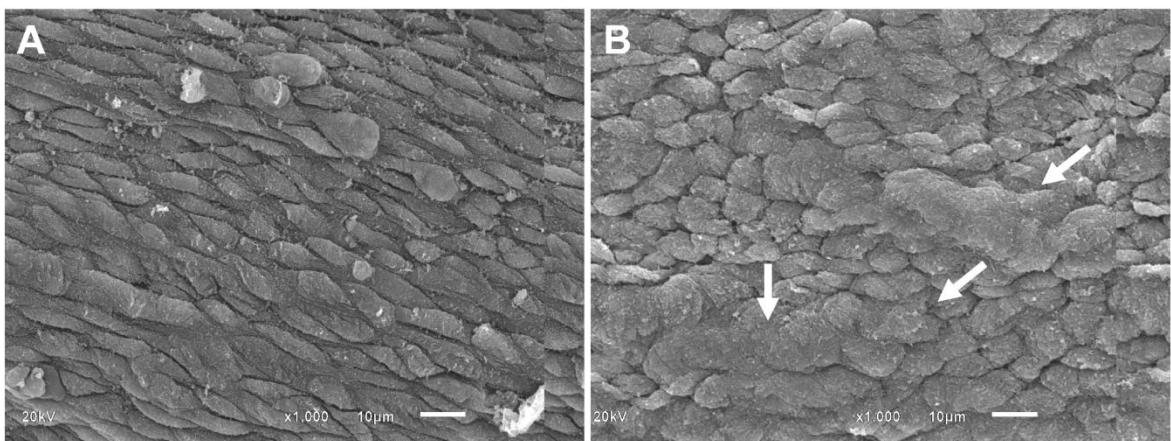


Figura 10- Micrografia eletrônica de varredura (MEV) do endotélio vascular de artérias umbilicais de pacientes gestantes. A) Imagem típica de uma paciente não fumante, que mostra uma superfície regular que acompanha a direção longitudinal do vaso. B) Imagem típica de um paciente fumante, exibindo áreas difusas de espessamento endotelial com perda da arquitetura típica e disposição de células endoteliais (setas brancas). Barra de escala: 10 μm.

6 DISCUSSÃO

Existem abundantes evidências na literatura mostrando substanciais prejuízos tanto em gestantes como nos fetos expostos ao cigarro (ROGERS, 2008; AYDOGAN et al., 2013). Sabe-se que os efeitos no crescimento e diferenciação placentária podem afetar o desenvolvimento do concepto. Isquemia uterina e formação de carboxihemoglobina contribuem também para a hipóxia fetal. Entretanto, os efeitos do tabagismo sobre células sanguíneas do neonato bem como a integridade do cordão umbilical não estão adequadamente entendidos (CHELCHOWSKA; LASKOWSKA-KLITA; NIEMIEC, 2005; ROGERS, 2008; FAUX et al., 2009). Pesquisas nessa área são fundamentais para melhorar o entendimento do impacto e etiologia dos efeitos relacionados ao cigarro na interface materno-fetal durante a gestação. Nosso estudo apresenta pela primeira vez que a exposição ao cigarro pode comprometer a viabilidade de células mononucleares de cordão umbilical, bem como prejudicar a estrutura normal do cordão umbilical de gestantes expostas.

Como pode ser visto na Tabela 1, não houve diferenças significativas entre os dois grupos estudados. Ambos os grupos apresentaram gestações de baixo risco e recém-nascidos sem sofrimento fetal clinicamente detectável. Com esse dado, podemos apresentar duas linhas de observação: 1) todas as alterações bioquímicas/morfológicas detectadas nesse estudo não foram influenciadas diretamente por fatores extra-tabagismo (tais como hipertensão arterial, desnutrição grave, anemia), mas sim provavelmente advindas majoritariamente da própria exposição ao cigarro; 2) nossos dados mostram que o tabagismo (ainda que sob baixas quantidades) pode comprometer o neonato por parâmetros convencionalmente não-analisados na área clínica.

O prejuízo na viabilidade celular observado em gestantes expostas ao cigarro poderia ser justificado por importantes fatores como o efeito intrínseco genotóxico do cigarro (WILLIS et al., 2012) e/ou pela elevada indução de produção de ERO já descrita na literatura (AYCICEK & IPEK, 2008; AYDOGAN et al., 2013; JI et al., 2013). Todavia, não há prévias evidências de tais avaliações em células sanguíneas humanas de cordão umbilical, demonstrando assim o pioneirismo da investigação do nosso estudo.

Esse prejuízo de viabilidade celular pode ser proveniente do elevado índice de estresse oxidativo, visto que encontramos elevados níveis de ERO em

células mononucleares do sangue do cordão umbilical humano. Esse dado foi demonstrado pelo aumento do nível de ânion superóxido (via DHE) e peróxido de hidrogênio (via DCF), pela citometria de fluxo, sendo uma técnica amplamente utilizada na investigação contemporânea dessas ERO (TONINI et al., 2013; DIAS et al., 2014). Como o aumento de ERO pode resultar na oxidação de lipídeos, proteínas e DNA, suas funcionalidades são prejudicadas e conseqüentemente muitas vias de controle metabólico e expressão gênica podem ficar comprometidas, contribuindo assim para prejuízos na viabilidade celular (AYDOGAN et al., 2013). Como exemplo, as ERO promovem danos ao DNA por meio de adição de duplas ligações ou a remoção de átomos de hidrogênio a partir de bases de DNA, formando uma série de aductos, tais como 8-oxo-L, uma forma oxidada de guanina que indica lesões oxidativas do DNA. Além disso, as ERO são ativadores potentes de poli (ADP-ribose), polimerase (PARP), em conseqüência do dano do DNA. Estes eventos prejudiciais ocorrem em regiões teloméricas e não teloméricas, em DNA mitocondrial de vários tecidos, tais como queratinócitos (PIAO et al., 2012), células mononucleares (PARAVICINI & TOUYZ, 2008; TONINI et al., 2013) leucócitos, hepatócitos (KIM et al., 2009), entre outros tecidos (MEYRELLES et al., 2011). Além dos mecanismos pró-oxidantes do tabagismo, sua exposição também pode comprometer as atividades das principais enzimas antioxidantes no plasma, catalase, GPX e SOD (LI et al., 2007; ARJA et al., 2013), contribuindo ainda mais para o estresse oxidativo. Todavia, a alteração de expressão de tais enzimas ainda não foram demonstradas em células mononucleares nem em cordão umbilical. Diante da oferta de material biológico para futuros estudos, desde já propomos também a investigação de atividades enzimáticas nesses tecidos tais como CAT, SOD, GPx, para observar se acompanham o perfil plasmático já descrito na literatura.

Além do prejuízo na viabilidade celular, encontramos elevado índice de apoptose recente e tardia (necrose), nas mesmas células de gestantes fumantes, por meio da citometria de fluxo com aplicação de iodeto de coloração de anexina V / propídio. Enquanto a proteína anexina se liga à fosfatidilserina sobre a superfície das células apoptóticas o iodeto de propídeo é mais permeável nessas células (DEVLIN et al., 2000; TONINI et al., 2013), sendo uma importante estratégia bioquímica para determinação de porcentagem de apoptose. A apoptose, ou morte celular programada, é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos. Nesse processo, ocorrem alterações celulares como retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células

vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica, do DNA e formação de corpos apoptóticos (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). A apoptose pode ser programada ou induzida como resposta a estímulos intracelulares e extracelulares (HENGARTNER, 2000). Já a necrose é um tipo de morte onde as células sofrem um dano que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. Na necrose, a célula tem seu conteúdo liberado, causando danos às células vizinhas e uma reação inflamatória local (ZIEGLER & GROSCURTH, 2004). Estudos mostram que a modificação oxidativa através de ERO, acontece em lipídeos, proteínas e DNA (EVANS; DIZDAROGLU; COOKE, 2004). Defesas são adquiridas pelas células vivas no intuito de diminuir os efeitos deletérios das ERO, porém quando a produção de ERO é elevada, os sistemas de reparação não conseguem diminuir os danos gerando a fragmentação do DNA (HARMAN et al., 1955; BERLETT & STADTMAN, 1997; SIMON; HAJ-YEHIA; LEVI-SCHAFFER, 2000). Além de danos ao DNA possivelmente outros danos intracelulares tal como degradação de lipídios (peroxidação lipídica), oxidação de cadeias laterais de aminoácidos, fragmentação de proteínas e perda da homeostase do cálcio intracelular, podem ocorrer (SLATER, 1987; SPITELLER, 2005).

A importância de se avaliar as células mononucleares nesse estudo se deve ao fato de que em um subgrupo dessas células encontram-se as células tronco (CT). As CT ainda não se encontram diferenciadas, nem especializadas e podem se dividir simetricamente e assimetricamente por longos períodos (PORTO et al., 2011; LIMA et al., 2012). São responsáveis por controlar o reparo tecidual sendo amplamente discutida na atualidade sua utilização na terapia de muitas doenças crônicas como na aterosclerose (PORTO et al., 2011; LIMA et al., 2012), insuficiência renal e até câncer (LIERSCH et al., 2014). Como encontramos prejuízos na qualidade desse grupo celular, podemos questionar sobre estratégias em potencial de transplantes autólogos (SONI et al., 2014), e até do próprio serviço de congelamento de cordão umbilical (BITSIKA; VLAHOU; ROUBELAKIS, 2013), uma vez que estes não garantem a qualidade da amostra, mas apenas do armazenamento da mesma. Provavelmente, insucessos futuros com essa estratégia poderá se justificar pela perda da qualidade das células obtidas. Tendo em vista que filhos de mães fumantes podem desenvolver neoplasias e outras doenças ligadas ao dano oxidativo precocemente, com os nossos dados nós podemos levantar o

questionamento sobre as transfusões de células tronco e a utilização de tecidos fetais, porventura inviáveis.

Em recém-nascidos de mães fumantes, o estresse oxidativo não parece estar restrito às células mononucleares. Por métodos indiretos também encontramos aumento de ROS no cordão umbilical de neonatos de gestantes fumantes, através da determinação de AOPP. As concentrações de AOPP podem ser usadas para marcar dano oxidativo a proteínas, medindo alto dano oxidativo, em plasma e em outros tecidos (WITKO-SARSAT et al., 1996; MATTEUCCI; BIASCI; GIAMPIETRO, 2001; PANDEY & RIZVI, 2010). Por exemplo, a mensuração plasmática de AOPP já se mostra como um marcador importante de dano oxidativo clinicamente relevante em pacientes renais crônicos (WITKO-SARSAT et al., 1996). Uma vantagem dessa medida é que sua mensuração pode ser realizada em grande número de amostras em curtos períodos. Assim, nosso trabalho abre uma nova perspectiva para análises futuras rotineiras de um teste rápido que pode ser feito em amostras de cordão para avaliação do índice de estresse oxidativo, abrindo perspectivas para avaliações de tratamentos ou controles de doenças intimamente ligadas ao estresse oxidativo.

A principal característica molecular do estresse oxidativo é o acúmulo progressivo de danos em macromoléculas. Normalmente, as proteínas são alvos principais devido sua abundância em células (abrangendo cerca de 70 % da massa seca da maioria das células) e a maior parte dos tecidos, e as suas rápidas taxas de reação com ERO. O ataque de ERO contra as proteínas podem modificar aminoácidos prolina e resíduos básicos que geram radicais carbonilo, a formação ligações cruzadas de proteína, e da oxidação do esqueleto da proteína, resultando na fragmentação de proteínas e da perda da função específica (PANDEY & RIZVI, 2010). Portanto, a medida da oxidação de proteínas é um fator clinicamente importante para a predição do processo de estresse / lesão e disfunção morfológica e fisiológica relacionada à idade (PANDEY & RIZVI, 2010). Produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) são considerados como biomarcadores para estimar o grau de modificações oxidativas das proteínas e são amplamente utilizados como uma medida de danos à proteína (WITKO-SARSAT et al., 1996; MATTEUCCI; BIASCI; GIAMPIETRO, 2001; PANDEY & RIZVI, 2010). Uma vantagem da análise de oxidação de proteínas é devido à meia-vida relativamente longa de tais proteínas oxidadas (PANDEY & RIZVI, 2010), que pode demonstrar melhor o efeito cumulativo de estresse oxidativo.

A exposição crônica ao cigarro influencia negativamente os sistemas orgânicos bem como a saúde vascular, induzindo à inflamação e quebra da homeostase do colágeno e das fibras elásticas (LECUREUR et al., 2005). A ativação de proteases pela fumaça do cigarro além de promover a degradação excessiva dos componentes da matriz extracelular, pode contribuir para o remodelamento vascular (GALIS & KHATRI, 2002). O remodelamento vascular é uma resposta adaptativa a estímulos específicos participando da fisiopatologia de diversas doenças cardiovasculares (PEREIRA et al., 2009). Baseando-se em inúmeros estudos em modelos experimentais, pode-se afirmar que existem 3 principais estímulos para o desencadeamento do remodelamento vascular: 1) “shear stress” ou estresse de encisalamento; 2) inflamação e 3) hipóxia (AGGARWAL et al., 2013). Todavia, os precisos mecanismos que possam alterar a estrutura e função vasculares ainda não são totalmente conhecidos. Interessantemente, o estresse oxidativo parece participar ativamente desse importante papel, independentemente da via estudada. Dessa forma, justifica-se o interesse em analisarmos possíveis alterações de remodelamento em artérias e veia de cordão umbilical dos grupos estudados.

Apesar do estresse oxidativo observado no cordão umbilical, não foi demonstrado remodelamento vascular nem de artérias e ou veia umbilicais. Esse dado pode ser explicado por que nesse tecido geralmente o remodelamento na gravidez de risco habitual ocorre nas primeiras 12 semanas de gestação, sob controle da geléia de Wharton (CAVALLI et al., 2009; YOUNG; LEVINE; KARUMANCHI, 2010).. A geléia de Wharton tanto controla o tônus dos vasos do cordão umbilical, quanto os protege de possíveis torções (HILL; KISLAK; RUNCO, 1987; ZIMMERMANN et al., 2012). Ainda não se sabe se o estresse oxidativo pode causar danos diretos à geléia de Wharton, sendo necessários estudos complementares que demonstrem eventuais danos. De qualquer forma, podemos inferir com nossos resultados que a geléia de Wharton pode resistir mais às influências das ERO, justificado pela ausência de remodelamento tanto em artérias quanto em veias.

A literatura também apresenta uma inter-relação entre estresse oxidativo e disfunção endotelial (PEREIRA et al., 2009; MEYRELLES et al., 2011; BALARINI et al., 2013). Por isso, submetemos algumas amostras à análise típica de alteração estrutural na primeira camada de artérias de gestantes expostas e não-expostas ao cigarro. Os estudos de microscopia eletrônica dos vasos do cordão umbilical demonstraram alterações estruturais do endotélio arterial. Essa modificação da

arquitetura endotelial arterial pode ser justificada diretamente pelo aumento das ROS. O incremento do estresse oxidativo prejudica a função endotelial e é tido como mediador de doenças vasculares (OGITA & LIAO, 2004; GUTTERMAN; MIURA; LIU, 2005; BALARINI et al., 2013). As ERO desempenham um papel crucial na função endotelial, bem como no tônus vascular. As células endoteliais sintetizam e liberam moléculas diferentes que orquestram respostas metabólica, vascular e celular. Entre eles, o óxido nítrico (NO) é uma molécula-chave reguladora de suma importância para a função endotelial e tonus de relaxamento vascular (DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007; NAPOLI & IGNARRO, 2009). Notavelmente, redução da expressão ou biodisponibilidade de NO pela sintase endotelial (eNOS) estão associados com a diminuição da sobrevivência das células endoteliais e com a disfunção endotelial (MAGENTA et al., 2013). Um endotélio disfuncional não é capaz de se opor a estímulos vasoconstritores, causando o aumento do tônus arterial e *shear stress*. (MULLER et al., 2002). Outro fator a ser analisado são as substâncias contidas no cigarro, como a nicotina que agem no sistema cardiovascular através de estimulação de receptores nicotínicos localizados nos gânglios do sistema nervoso autônomo e medula adrenal, aumentando a resposta simpática com a liberação de catecolaminas, contribuindo assim para a lesão endotelial (MULLER et al., 2002).

Além do prejuízo direto pelo estresse oxidativo vascular, podemos justificar também a alteração da arquitetura endotelial pelo possível comprometimento das células de reparo observado no grupo das gestantes expostas ao cigarro. Células progenitoras endoteliais são derivadas da medula óssea e são mobilizadas para o sangue periférico em resposta a isquemia ou lesão tecidual sendo diferenciadas finalmente em células endoteliais (SZMITKO et al., 2003; ANDREOU et al., 2006). Muitos estudos da área básica têm relatado que a propriedade protetora vascular da medula óssea pode ser "exaurida" com o envelhecimento ou exposição prolongada fatores pró-oxidantes (PORTO et al., 2011; TONINI et al., 2013). A exposição decorrente de toxicidade de componentes do cigarro, como hidrocarbonetos policíclicos, monóxido de carbono, benzenos e outras substâncias tóxicas poderiam comprometer a viabilidade de um subgrupo de células reparadoras, denominadas células progenitoras endoteliais ou EPC (PORTO et al., 2011). Dessa forma, podemos inferir que com o aumento do estresse oxidativo em células mononucleares no grupo de fumantes houve um desequilíbrio entre as células endoteliais progenitoras e leucócitos inflamatórios, comprometendo o os

mecanismos de reparo vascular (RAUSCHER et al., 2003; GOLDSCHMIDT-CLERMONT et al., 2010). Inúmeros autores já demonstraram que a viabilidade e quantidade de células progenitoras endoteliais são inversamente proporcionais ao risco de doenças cardiovasculares com características ideais para reparo tecidual e futuras propostas de terapias celular (VAN CRAENENBROECK & CONRAADS, 2010; PORTO et al., 2011; LIMA et al., 2012; TONINI et al., 2013). Dessa forma, nossos dados contribuem para inferirmos que a exposição ao cigarro pode acometer diretamente a estrutura normal tecidual bem como pode comprometer mecanismos de reparo tecidual mediadas por moléculas (proteínas, enzimas) e/ou células (ex: EPC), contribuindo assim para o incremento no aparecimento de doenças neoplásicas e cardiovasculares precoces.

Em nosso trabalho, avaliamos somente o comprometimento do sangue de cordão umbilical de recém-nascidos a termo, onde nos expostos ao fumo, encontramos um nível de ERO e de células apoptóticas elevados, danos a proteínas e ao endotélio. Tais dados também abrem a possibilidade para outros questionamentos como: 1) Como seria o resultado se fossem incluído o grupo de fetos pré termo, cujas defesas antioxidantes não se encontram bem estabelecidas? (CHELCHOWSKA, LASKOWSKA-KLITA; NIEMIEC, 2005; VAN LEEUWEN et al., 2008) 2) Como seria o resultado do sangue das mães? Essa última pergunta poderia ajudar a responder o papel da placenta no controle do estresse oxidativo já que a mesma não é meramente uma barreira passiva entre mãe e feto. Apesar de muitas funções da placenta serem exaustivamente conhecidas (troca dos gases respiratórios, metabólitos, nutrientes e produtos residuais, produção de hormônios e o metabolismo de xenobióticos) (MARIN et al., 2004; MYLLYNEN et al., 2005), não há clara evidências ainda na literatura de seu papel no estresse oxidativo.

Nosso trabalho também apresenta uma limitação. Lamentavelmente, não tivemos uma prova de classificação de “expostas” e “não expostas” além do auto relato das pacientes. Para tanto, um método que poderia ser utilizado para se determinar o tabagismo e seu respectivo grau seria a quantificação de cotinina na urina da estimativa de exposição (DUKIC et al., 2007; ROGERS, 2008). A cotinina é um metabólito da nicotina com um tempo de meia-vida mais longo do que a nicotina. Além disso, as concentrações de cotinina no soro, urina, cabelo, e saliva são amplamente utilizados como biomarcadores de exposição recente do tabaco em estudos epidemiológicos (JARVIS et al., 2003). Alguns autores que pesquisaram

cotina no sangue materno e fetal, encontraram-na até 3 vezes aumentada no sangue do cordão em relação ao sangue materno, sugerindo que a placenta é limitada enquanto filtro dessa substância (TOPINKA et al., 2009). Apesar de não termos mensurado a cotina, a quantificação desse metabólito seria indispensável se não tivéssemos observado diferenças entre os grupos. Como obtivemos dados irrefutáveis tanto em células sanguíneas quanto no cordão umbilical, apenas o auto-relato parece ser suficiente.

7. CONCLUSÃO

Esse estudo concluiu que a exposição ao cigarro é capaz de prejudicar a viabilidade das células mononucleares oriundas do cordão umbilical e a própria integridade do cordão umbilical de mulheres expostas ao cigarro, provavelmente pelo aumento do estresse oxidativo observado indiretamente pela produção de espécies reativas de oxigênio e pela formação de produtos de oxidação proteica. Estes resultados através da citometria de fluxo, bioquímicos e histológicos fornecem novos rumos de investigações do impacto do tabagismo em neonatos.

8 REFERENCIAS

AGGARWAL, S.; GROSS, C. M.; SHARMA, S.; FINEMAN, J. R.; BLACK, S. M. Reactive Oxygen Species in Pulmonary Vascular Remodeling. **Comprehensive Physiology**, 2013.

AKSOY, H.; TAYSI, S.; ALTINKAYNAK, K.; BAKAN, E.; BAKAN, N.; KUMTEPE, Y. Antioxidant potential and transferrin, ceruloplasmin, and lipid peroxidation levels in women with preeclampsia. **Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research**, v. 51, n. 5, p. 284-287, 2003.

AL-SAHAB, B.; SAQIB, M.; HAUSER, G.; TAMIM, H. Prevalence of smoking during pregnancy and associated risk factors among Canadian women: a national survey. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 10, n. 1, p. 24, 2010.

ANDREOU, L.; TOUSOULIS, D.; TENTOLOURIS, C.; ANTONIADES, C.; STEFANADIS, C. Potential role of endothelial progenitor cells in the pathophysiology of heart failure: clinical implications and perspectives. **Atherosclerosis**, v. 189, n. 2, p. 247-254, 2006.

ANDERSON, L. M.; DIWAN, B. A.; FEAR, N. T.; ROMAN, E. Critical windows of exposure for children's health: cancer in human epidemiological studies and neoplasms in experimental animal models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 3, p. 573, 2000.

ANKARBERG, Emma; FREDRIKSSON, Anders; ERIKSSON, Per. **Neurobehavioural defects in adult mice neonatally exposed to nicotine: changes in nicotine-induced behaviour and maze learning performance.** Behavioural brain research, v. 123, n. 2, p. 185-192, 2001.

ARJA, C.; SURAPANENI, K. M.; RAYA, P.; ADIMOOLAM, C.; BALISETTY, B.; KANALA, K. R. Oxidative stress and antioxidant enzyme activity in South Indian male smokers with chronic obstructive pulmonary disease. **Respirology: Official Journal of the Asian Pacific Society of Respirology**, v. 18, n. 7, p. 1069-1075, 2013.

ASEMI, Z.; JAZAYERI, S.; NAJAFI, M.; SAMIMI, M.; SHIDFAR, F.; TABASSI, Z.; SHAHABODDIN, M.; ESMAILZADEH, A. Association between markers of systemic inflammation, oxidative stress, lipid profiles, and insulin resistance in pregnant women. **ARYA Atherosclerosis**, v. 9, n. 3, p. 172, 2013.

AUGOOD, C.; DUCKITT, K.; TEMPLETON, A. A. Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction**, v. 13, n. 6, p. 1532-1539, 1998.

AYCICEK, A.; IPEK, A. Maternal active or passive smoking causes oxidative stress in cord blood. **European Journal of Pediatrics**, v. 167, n. 1, p. 81-85, 2008.

AYDOGAN, U.; DURMAZ, E.; ERCAN, C. M.; EKEN, A.; ULUTAS, O. K.; KAVUK, S.; GURSEL, O.; ALANBAY, I.; AKAY, C.; KUREKCI, A. E.; AYDIN, A.; SAYAL, A.; SAGLAM, K.; COK, I. Effects of Smoking during Pregnancy on DNA Damage and

ROS Level Consequences in Maternal and Newborns' Blood. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 64, n. 1, p. 35-46, 2013.

BALARINI, C. M.; LEAL, M. A.; GOMES, I. B.; PEREIRA, T. M.; GAVA, A. L.; MEYRELLES, S. S.; VASQUEZ, E. C. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, n. 3, 2013.

BAŃKOWSKI, E.; SOBOLEWSKI, K.; ROMANOWICZ, L.; CHYCZEWSKI, L.; JAWORSKI, S. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly and their alterations in EPH-gestosis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 66, n. 2, p. 109-117, 1996.

BENIRSCHKE, K.; DRISCOLL, S. G. **The Pathology of the Human Placenta**. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1967.

BERGMANN, R.; BERGMANN, K.; DUDENHAUSEN, J. Undernutrition and Growth Restriction in Pregnancy. **Nestle Nutrition Workshop Series. Paediatric Programme**, v. 61, p. 103-121, 2008.

BENOWITZ, N.; DEMPSEY, D. Pharmacotherapy for smoking cessation during pregnancy. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 6, n. 2, p. S189-S202, 2004.

BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 33, p. 20313-20316, 1997.

BITSIKA, V.; VLAHOU, A.; ROUBELAKIS, M. G. Fetal Mesenchymal Stem Cells in Cancer Therapy. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 2, p. 133-143, 2013.

BORRALHO, P.; CUNHA, F.; PINTO, M.; DA SILVA, A. T.; MEIRINHO, M. Morbilidade e mortalidade perinatal relacionadas com a infecção na gestação. Identificação histológica da corioamnionite e sua incidência na população estudada. **Acta Medica Portuguesa**, v. 9, n. 10-12, p. 319-23, 1996.

BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. **The Biochemical Journal**, v. 128, n. 3, p. 617-630, 1972.

BRACCI, R.; BUONOCORE, G. The antioxidant status of erythrocytes in preterm and term infants. **Seminars in Neonatology**, v. 3, n. 3, p. 191-197, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 7, n. 72, p. 248-254, 1976.

BROPHY, M. H.; HARRIS, N. F.; CRAWFORD, I. L. Elevated copper and lowered zinc in the placentae of pre-eclampsics. **International Journal of Clinical Chemistry**, v. 145, n. 1, p. 107-111, 1985.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 2, p. 535-543, 1993.

BURTON, G.; FOSTER, D. O.; PERLY, B.; SLATER, T. F.; SMITH, I. C.; INGOLD, K. U. Biological Antioxidants. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 311, n. 1152, p. 565-578, 1985.

BURTON, G. J.; JONES, C. J. Syncytial knots, sprouts, apoptosis, and trophoblast deportation from the human placenta. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 48, n. 1, p. 28-37, 2009.

BROSENS, I.; ROBERTSON, W. B.; DIXON, H. G. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 93, n. 2, p. 569-579, 1967.

CAMPAGNARO, Bianca Prandi et al. Aging augments apoptosis of endothelial cells in mice. **The FASEB Journal**, v. 2013, n. 27, 2013.

CASTELAO, J. E.; GAGO-DOMINGUEZ, M. Risk factors for cardiovascular disease in women: relationship to lipid peroxidation and oxidative stress. **Medical Hypotheses**, v. 71, n. 1, p. 39-44, 2008.

CAVALLI, R. C.; SANDRIM, V. C.; DOS SANTOS, J. E.; DUARTE, G. Predição de pré-eclâmpsia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 1, p. 1-4, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION NATIONAL (United States). How tobacco smoke causes disease: The biology and behavioral basis for smoking-attributable disease: A report of the Surgeon General. **CENTER FOR CHRONIC DISEASE PREVENTION AND HEALTH PROMOTION (US); OFFICE ON SMOKING AND HEALTH (US)**, Atlanta, GA. 2010. Disponível em: << <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53017/>>> acesso em 16 de maio de 2014.

CHAOUACHI, K.; SAJID, K. M. A critique of recent hypotheses on oral (and lung) cancer induced by water pipe (hookah, shisha, narghile) tobacco smoking. **Medical Hypotheses**, v. 74, n. 5, p. 843-846, 2010.

CLEMPUS, R. E.; GRIENDLING, K. K. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. **Cardiovascular Research**, v. 71, n. 2, p. 216-25, 2006.

CHELCHOWSKA, M.; LASKOWSKA-KLITA, T.; NIEMIEC, K. T. Activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in erythrocytes of women smoking during pregnancy. **Przegląd Lekarski**, v. 62, n. 10, p. 1039, 2005.

COBB, C.; WARD, K. D.; MAZIAK, W.; SHIHADDEH, A. L.; EISSENBERG, T. Waterpipe tobacco smoking: An emerging health crisis in the United States. **American Journal of Health Behavior**, v. 34, n. 3, p. 275-285, 2010.

DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. Endothelial function and dysfunction testing and clinical relevance. **Circulation**, v. 115, n. 10, p. 1285-1295, 2007.

DEJMEK, J.; SOLANSK, Y. I.; PODRAZILOVÁ, K.; SRÁM, R. J. The exposure of nonsmoking and smoking mothers to environmental tobacco smoke during different gestational phases and fetal growth. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 6, p. 601, 2002.

DEKKER, G. A.; SIBAI, B. M. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 179, n. 5, p. 1359-1375, 1998.

DEMIR, R.; DEMIR, A. Y.; YINANC, M. Structural changes in placental barrier of smoking mother a quantitative and ultrastructural study. **Pathology, Research and Practice**, v. 190, n. 7, p. 656-667, 1994.

DEVLIN, A. M.; CLARK, J. S.; REID, J. L.; DOMINICZAK, A. F. DNA synthesis and apoptosis in smooth muscle cells from a model of genetic hypertension. **Hypertension**, v. 36, n. 1, p. 110-115, 2000.

DIAS, A. T.; RODRIGUES, B. P.; PORTO, M. L.; GAVA, A. L.; BALARINI, C. M.; FREITAS, F. P.; PALOMINO, Z.; CASARINI, D. E.; CAMPAGNARO, B. P.; PEREIRA, T. M.; MEYRELLES, S. S.; VASQUEZ, E. C. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 1, p. 35, 2014.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUKIC, V. M.; NIESSNER, M.; BENOWITZ, N.; HANS, S.; WAKSCHLAG, L. Modeling the relationship of cotinine and self-reported measures of maternal smoking during pregnancy: a deterministic approach. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 9, n. 4, p. 453-465, 2007.

ENGLAND, L. J.; LEVINE, R. J.; MILLS, J. L.; KLEBANOFF, M. A.; YU, K. F.; CNATTINGIUS, S. Adverse pregnancy outcomes in snuff users. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 189, n. 4, p. 939-943, 2003.

EVANS, Mark D.; DIZDAROGLU, Miral; COOKE, Marcus S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. **Mutation Research**, v. 567, n. 1, p. 1-61, 2004.

FAUX, S. P.; TAI, T.; THRONE, D.; XU, Y.; BREHENY, D.; GACA, M. The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke. **Biomarkers**, v. 14, p. 90-6, 2009.

FELTES, B. C.; FARIA, P. J.; NOTARI, D. L.; BONATTO, D. Toxicological effects of the different substances in tobacco smoke on human embryonic development by a systems chemo-biology approach. **PloS One**, v. 8, n. 4, p. e61743, 2013.

FILIPPINI, G.; FARINOTTI, M.; FERRARINI, M. Active and passive smoking during pregnancy and risk of central nervous system tumours in children. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 14, n. 1, p. 78-84, 2000.

GALIS, Z. S.; KHATRI, J. J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis the good, the bad, and the ugly. **Circulation Research**, v. 90, n. 3, p. 251-262, 2002.

GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J.; SEO, D. M.; WANG, L.; BEECHAM, G. W.; LIU, Z. J.; VAZQUEZ-PADRON, R. I.; DONG, C.; HARE, J. M.; KAPILOFF, M. S.; BISHOPRIC, N. H.; PERICAK-VANCE, M.; VANCE, J. M.; VELAZQUEZ, O. C. Inflammation, stem cells and atherosclerosis genetics. **Current Opinion in Molecular Therapeutics**, v. 12, n. 6, p. 712-723, 2010.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-43, 2007.

GUPTA, S.; AGARWAL, A.; BANERJEE, J.; ALVAREZ, J. G. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 62, n. 5, p. 335-347, 2007.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Antioxidants: molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 561-564, 2010.

GUTTERMAN, D. D.; MIURA, H.; LIU, Y. Redox modulation of vascular tone focus of potassium channel mechanisms of dilation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 4, p. 671-678, 2005.

HACKSHAW, A.; RODECK, C.; BONIFACE, S. Maternal smoking in pregnancy and birth defects: a systematic review based on 173 687 malformed cases and 11.7 million controls. **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 5, p. 589-604, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free radicals in biology and medicine. Ed. England (UK). **Oxford University Press**, 1999.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, v. 11, n. 3, 1955.

HEAZELL, A. E.; MOLL, S. J.; JONES, C. J.; BAKER, P. N.; CROCKER, I. P. Formation of syncytial knots is increased by hyperoxia, hypoxia and reactive oxygen species. **Placenta**, v. 28, p. S33-S40, 2007.

HEIMLI, H.; KÄHLER, H.; ENDRESEN, M. J.; HENRIKSEN, T.; LYBERG, T. A new method for isolation of smooth muscle cells from human umbilical cord arteries. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 57, n. 1, p. 21-29, 1997.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HILL, L. M.; KISLAK, S.; RUNCO, C. An ultrasonic view of the umbilical cord. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 42, n. 2, p. 82-88, 1987.

IZQUIERDO ÁLVAREZ, S.; CASTAÑÓN, S. G.; RUATA, M. L.; ARAGÜÉS, E. F.; TERRAZ, P. B.; IRAZABAL, Y. G.; GONZÁLEZ, E. G.; RODRÍGUEZ, B. G. Updating

- of normal levels of copper, zinc and selenium in serum of pregnant women. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 21, p. 49-52, 2007.
- JACOB, C.; WINYARD, P. G. Redox signaling and regulation in biology and medicine, Germany, Ed. John Wiley & Sons, 2009.
- JARVIS, M. J.; PRIMATESTA, P.; ERENS, B.; FEYERABEND, C.; BRYANT, A. Measuring nicotine intake in population surveys: comparability of saliva cotinine and plasma cotinine estimates. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 5, n. 3, p. 349-355, 2003.
- JAUNIAUX, E.; BURTON, G. J. The effect of smoking in pregnancy on early placental morphology. **Obstetrics and Gynecology**, v. 79, n. 5, p. 645-648, 1992.
- JAUNIAUX, E.; BURTON, G. J. Morphological and biological effects of maternal exposure to tobacco smoke on the fetoplacental unit. **Early Human Development**, v. 83, n. 11, p. 699-706, 2007.
- JI, K.; XING, C.; JIANG, F.; WANG, X.; GUO, H.; NAN, J.; QIAN, L.; YANG, P.; LIN, J.; LI, M.; LI, J.; LIAO, L.; TANG, J. Benzo [a] pyrene induces oxidative stress and endothelial progenitor cell dysfunction via the activation of the NF- κ B pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 31, n. 4, p. 922-930, 2013.
- JONES, C. J.; FOX, H. Syncytial knots and intervillous bridges in the human placenta: an ultrastructural study. **Journal of Anatomy**, v. 124, n. Pt 2, p. 275, 1977.
- KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 244-257, 2013.
- KIM, B. M.; CHOI, Y. J.; HAN, Y.; YUN, Y. S.; HONG, S. H. N,N-dimethyl phytosphingosine induces caspase-8-dependent cytochrome c release and apoptosis through ROS generation in human leukemia cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 239, n. 1, p. 87-97, 2009.
- KJELLEN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: structures and interactions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 443-475, 1991.
- KOBAYASHI, K.; KUBOTA, T.; ASO, T. Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton's jelly: Expression and localization of α -smooth muscle actin. **Early Human Development**, v. 51, n. 3, p. 223-233, 1998.
- LAMBERS, D. S.; CLARK, K. E. The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. **Seminars in Perinatology**, v. 20, n. 2, p. 115-126, 1996.
- LECUREUR, V.; FERREC, E. L.; N'DIAYE, M.; VEE, M. L.; GARDYN, C.; GILOT, D.; FARDEL, O. ERK-dependent induction of TNF α expression by the environmental contaminant benzo (a) pyrene in primary human macrophages. **FEBS Letters**, v. 579, n. 9, p. 1904-1910.
- LI, N.; JIA, X.; CHEN, C. Y.; BLUMBERG, J. B.; SONG, Y.; ZHANG, W.; ZHANG, X.; MA, G.; CHEN, J. Almond consumption reduces oxidative DNA damage and lipid

- peroxidation in male smokers. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 12, p. 2717-2722, 2007.
- LIERSCH, R.; MÜLLER-TIDOW, C.; BERDEL, W. E.; KRUG, U. Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults—biological significance and clinical use. **British Journal of Haematology**, v. 165, n. 1, p. 17-38, 2014.
- LIMA, L. C.; PORTO, M. L.; CAMPAGNARO, B. P.; TONINI, C. L.; NOGUEIRA, B. V.; PEREIRA, T. M.; VASQUEZ, E. C.; MEYRELLES, S. S. Mononuclear cell therapy reverts cuff-induced thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 96, p. 1-9, 2012.
- LOSCALZO, J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. **Circulation Research**, v. 88, n. 8, p.756-62, 2001.
- LÖNN, M. E.; DENNIS, J. M.; STOCKER, R. Actions of "antioxidants" in the protection against atherosclerosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 53, n. 4, p. 863-84, 2012.
- LÓPEZ-JARAMILLO, P.; CASAS, J. P.; SERRANO, N. Preeclampsia: from epidemiological observations to molecular mechanisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 1227-1235, 2001.
- LUCK, W.; NAU, H.; HANSEN, R.; STELDINGER, R. Extent of nicotine and cotinine transfer to the human fetus, placenta and amniotic fluid of smoking mothers. **Developmental Pharmacology and Therapeutics**, v. 8, n. 6, p. 384-395, 1984.
- MAGENTA, A.; GRECO, S.; GAETANO, C.; MARTELLI, F. Oxidative stress and microRNAs in vascular diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 9, p. 17319-17346, 2013.
- MARIN, J. J.; BRIZ, O.; SERRANO, M. A. A review on the molecular mechanisms involved in the placental barrier for drugs. **Current Drug Delivery**, v. 1, n. 3, p. 275-289, 2004.
- MATTEUCCI, E.; BIASCI, E.; GIAMPIETRO, O. Advanced oxidation protein products in plasma: stability during storage and correlation with other clinical characteristics. **Acta Diabetologica Latina**, v. 38, n. 4, p. 187-189, 2001.
- MAZIAK, W.; WARD, K. D.; EISSENBERG, T. Interventions for waterpipe smoking cessation. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 17, n. 4, 2007.
- MEYRELLES, S. S.; PEOTTA, V. A. PEREIRA, T. M.; VASQUEZ, E. C. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 211, p. 1-18, 2011.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Pesquisa nacional por amostra de domicílios: Tabagismo. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, Rio de Janeiro, 2009.
- MISTRY, H. D.; WILSON, V.; RAMSAY, M. M.; SYMONDS, M. E.; BROUGHTON

- PIPKIN, F. Reduced selenium concentrations and glutathione peroxidase activity in preeclamptic pregnancies. **Hypertension**, v. 52, n. 5, p. 881-888, 2008.
- MISTRY, H. D.; WILLIAMS, P. J. The importance of antioxidant micronutrients in pregnancy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2011, p. 1-12, 2011.
- MORROW, J. D.; FREI, B.; LONGMIRE, A. W.; GAZIANO, J. M.; LYNCH, S. M.; SHYR, Y.; STRAUSS, W. E.; OATES, J. A.; ROBERTS, L. J. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers—smoking as a cause of oxidative damage. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 18, p. 1198-1203, 1995.
- MORTENSEN, J. T.; THULSTRUP, A. M.; LARSEN, H.; MØLLER, M.; SØRENSEN, H. T. Smoking, sex of the offspring, and risk of placental abruption, placenta previa, and preeclampsia: a population-based cohort study. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 80, n. 10, p. 894-898, 2001.
- MOLL, W.; NIENARTOWICZ, A.; HEES, H.; WROBEL, K.; LENZ, A. Blood flow regulation in the uteroplacental arteries. In: MILLER, R. K.; THIEDE, H. A. **Placental Vascularization and Blood Flow: Basic research and clinical applications**. Ed. Springer US, p. 83-96, 1988.
- MUCCI, L. A.; GRANATH, F.; CNATTINGIUS, S. Maternal smoking and childhood leukemia and lymphoma risk among 1,440,542 Swedish children. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 13, n. 9, p. 1528-1533, 2004.
- MÜLLER, J. S.; ANTUNES, M.; BEHLE, I.; TEIXEIRA, L.; ZIELINSKY, P. Efeitos agudos do fumo sobre a hemodinâmica da circulação feto-materno-placentária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 78, n. 2, p. 148-51, 2002.
- MYLLYNEN, P.; PASANEN, M.; PELKONEN, O. Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. **Placenta**, v. 26, n. 5, p. 361-371, 2005.
- NAPOLI, C.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 8, p. 1103-1108, 2009.
- NEVITT, T.; RODRIGUES-POUSADA, C. The Stress Response in the Budding Yeast In: RADONS, J.; Multhoff, G. **Stress Response in Biology and Medicine**, Ed. Research Signpost, p. 39- 58, 2007.
- NICOL, C. J.; ZIELENSKI, J.; TSUI, L. C.; WELLS, P.G. An embryoprotective role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in developmental oxidative stress and chemical teratogenesis. **FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 14, n. 1, p. 111-127, 2000.
- NORIS, M.; TODESCHINI, M.; CASSIS, P.; PASTA, F.; CAPPELLINI, A.; BONAZZOLA, S.; MACCONI, D.; MAUCCI, R.; PORRATI, F.; BENIGNI, A.; PICCIOLO, C.; REMUZZI, G. L-arginine depletion in preeclampsia orients nitric oxide

synthase toward oxidant species. **Hypertension**, v. 43, n. 3, p. 614-622, 2004.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu ed., p.37-54, 2003.

OGITA, H.; LIAO, J. K. Endothelial function and oxidative stress. **Endothelium**, v. 11, n. 2, p. 123-132, 2004.

OKUMURA, M.; BARROS, V. V. Placenta e cordão umbilical. In: OKUMURA, M.; ZUGAIB, M. **Ultra-sonografia em obstetricia**. 1ª ed., Ed. Sarvier, São Paulo, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Estatísticas sobre saúde Mundial de 2012**. Genebra (SWZ). Disponível em: <www.who.int/healthinfo/EN_WHS2013_Full.pdf> Acesso em: 15 de abril de 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Situação da saúde nas Américas: Panorama regional e perfis de países**. Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Washington (DC), 2011. Disponível em: <ais.paho.org/chi/brochures/.../BI_2011_ENG.pdf> Acesso em 05 de maio de 2014.

PACKER, J. E.; SLATER, T. F.; WILLSON, R. L. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. **Nature**, v. 278, n. 5706, p. 737-738, 1979.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 1, p. 2-12, 2010.

PASTORE, A. R.; PASTORE, D.; PASTORE, A. R. Sistematização do exame obstétrico. In: PASTORE, A. R. **Ultra-sonografia em Ginecologia e Obstetrícia**. 2ª ed. São Paulo: Revinter, p. 31-38, 2003.

PAPAHARALAMBUS, C. A.; GRIENDLING, K. K. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 17, n. 2, p. 48-54, 2007.

PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**, v. 31, p. S170-S180, 2008.

PEREIRA, T. M. C.; BALARINI, C. M.; SILVA, I. V.; CABRAL, A. M.; VASQUEZ, E. C.; MEYRELLES, S. S. Endogenous angiotensin II modulates nNOS expression in renovascular hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 7, p. 685-691, 2009.

PIAO, M. J.; LEE, N. H.; CHAE, S. HYUN, J. W. Eckol inhibits ultraviolet B-induced cell damage in human keratinocytes via a decrease in oxidative stress. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 6, p. 873-880, 2012.

PIASEK, M.; BLANUSA, M.; KOSTIAL, K.; LASKEY, J. W. Placental cadmium and progesterone concentrations in cigarette smokers. **Reproductive Toxicology**, v. 15, n. 6, p. 673-681, 2001.

PERERA, F. P.; TANGO, D.; TU, Y. H.; CRUZ, L. A.; BORJAS, M.; BERNET, T.; WHYATT, R. M. Biomarkers in maternal and newborn blood indicate heightened fetal susceptibility to procarcinogenic DNA damage. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, p. 1133-1136, 2004.

PFEIFER, G. P.; DENISSENKO, M. F.; OLIVER, M.; TRETYAKOVA, N.; HECHT, S. S.; HAINAUT, P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p 53 mutations in smoking-associated cancers. **Oncogene**, v. 21, n. 48, p. 7435-7451, 2002.

PORTO, M. L.; LIMA, L. C. F.; PEREIRA, T. M. C.; NOGUEIRA, B. V.; TONINI, C. L.; CAMPAGNARO, B. P.; MEYRELLES, S. S.; VASQUEZ, E. C. Mononuclear cell therapy attenuates atherosclerosis in apoE KO mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, 2011.

PRATINIDHI, A.; GANDHAM, S.; SHROTRI, A.P; PATIL, A.; PARDESHI, S. Use of 'mishri'a smokeless form of tobacco during pregnancy and its perinatal outcome. **Indian Journal of Community Medicine: Official Publication of Indian Association of Preventive & Social Medicine**, v. 35, n. 1, p. 14-18, 2010.

PRESTON, A. M. Cigarette smoking-nutritional implications. **Progress in Food & Nutrition Science**, v. 15, n. 4, p. 183-217, 1991.

QUIGLEY, M. E.; SHEEHAN, K. L.; WILKES, M. M.; YEN, S. S. Effects of maternal smoking on circulating catecholamine levels and fetal heart rates. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 133, n. 6, p. 685-690, 1979.

RAUSCHER, F. M.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J.; DAVIS, B. H.; WANG, T.; GREGG, D.; RAMASWAMI, P.; PIPPEN, A. M.; ANNEX, B. H.; DONG, C.; TAYLOR, D. A. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. **Circulation**, v. 108, n. 4, p. 457-463, 2003.

RAY, P. D.; HUANG, B.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 5, p. 981-990, 2012.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2006.

ROGERS, J. M. Tobacco and pregnancy: overview of exposures and effects. **Birth Defects Research part C: Embryo Today: Reviews**, v. 84, n. 1, p. 1-15, 2008.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, v. 362, n. 6423, p. 801-809, 1993.

RUDOLPH, A. M.; HEYMANN, M. A. The circulation of the fetus in utero methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. **Circulation Research**, v. 21, n. 2, p. 163-184, 1967.

SALPIETRO, C. D.; GANGEMI, S.; MINCIULLO, P. L.; BRIUGLIA, S.; MERLINO, M. V.; STELITANO, A.; CRISTANI, M.; TROMBETTA, D.; SAIJA, A. Cadmium concentration in maternal and cord blood and infant birth weight: a study on healthy non-smoking women. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 30, n. 5, p. 395-399, 2002.

SBRANA, E.; SUTER, M. A.; ABRAMOVICI, A. R.; HAWKINS, H. K.; MOSS, J. E.; PATTERSON, L.; SHOPE, C.; AAGAARD-TILLERY, K. Maternal tobacco use is associated with increased markers of oxidative stress in the placenta. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 205, n. 3, p. 246e1-246e7, 2011.

SCHERER, G.; CONZE, C.; VON MEYERINCK, L.; SORSA, M.; ADLKOFER, F. Importance of exposure to gaseous and particulate phase components of tobacco smoke in active and passive smokers. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 62, n. 6, p. 459-466, 1990.

SERDAR, Z.; ASLAN, K.; DIRICAN, M.; SARANDÖL, E.; YEŞILBURSA, D.; SERDAR, A. Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease. **Clinical Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 794-803, 2006.

SEPETDJIAN, E.; SHIHADDEH, A.; SALIBA, N. A. Measurement of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in narghile waterpipe tobacco smoke. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 5, p. 1582-1590, 2008.

SIEMINSKA, A.; JASSEM, E. The many faces of tobacco use among women. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 20, p. 153-162, 2014.

SINGH, P. N.; YEL, D.; SIN, S.; KHIENG, S.; LOPEZ, J.; JOB, J.; FERRY, L.; KNUTSEN, S. Tobacco use among adults in Cambodia: evidence for a tobacco epidemic among women. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 87, n. 12, p. 905-912, 2009.

SIMON, H. U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis**, v. 5, n. 5, p. 415-418, 2000.

SLATER, T. F. Free radicals and tissue injury: fact and fiction. **The British Journal of Cancer Supplement**, v. 8, p. 5-10, 1987.

SPITELLER, G. The relation of lipid peroxidation processes with atherogenesis: a new theory on atherogenesis. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, n. 11, p. 999-1013, 2005.

SONI, S.; BOULAD, F.; COWAN, M. J.; SCARADAVOU, A.; DAHAKE, J.; EDWARDS, S.; WALTERS, M. C. Combined umbilical cord blood and bone marrow from HLA-identical sibling donors for hematopoietic stem cell transplantation in children with hemoglobinopathies. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 42, n. 1, 2014.

SZMITKO, P. E.; WANG, C. H.; WEISEL, R. D.; JEFFRIES, G. A.; ANDERSON, T. J.; VERMA, S. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation Part II. **Circulation**, v. 108, n. 17, p. 2041-2048, 2003.

TAKECHI, K.; KUWABARA, Y.; MIZUNO, M. Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells. **Placenta**, v. 14, n. 2, p. 235-245, 1993.

TEMPFER, C.; UNFRIED, G.; ZEILLINGER, R.; HEFLER, L.; NAGELE, F.; HUBER, J. C. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in women with idiopathic recurrent miscarriage. **Human Reproduction**, v. 16, n. 8, p. 1644-1647, 2001.

TONG, V. T.; JONES, J. R.; DIETZ, P. M.; D'ANGELO, D.; BOMBARD, J. M.; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Trends in smoking before, during, and after pregnancy: pregnancy risk assessment monitoring system (PRAMS), United States, 31 sites, 2000-2005. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, **MMWR. Surveillance Summaries: Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 58, n.4, p. 1-29, 2009.

TOPINKA, J.; MILCOVA, A.; LIBALOVA, H.; NOVAKOVA, Z.; ROSSNER JR, P.; BALASCAK, I.; SRAM, R. J. Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the foetus. Part I: bulky DNA adducts. **Mutation Research**, v. 669, n. 1, p. 13-19, 2009.

TONINI, C. L.; CAMPAGNARO, B.; LOURO, L. P. S.; PEREIRA, T. M. C.; VASQUEZ, E. C.; MEYRELLES, S. S. Effects of aging and hypercholesterolemia on oxidative stress and DNA damage in bone marrow mononuclear cells in apolipoprotein E-deficient mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3325-3342, 2013.

TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **The Biochemical Journal**, v. 191, n. 2, p. 421-427, 1980.

TURRENS, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Bioscience Reports**, v. 17, n. 1, p. 3-8, 1997.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (Estados Unidos da América). The health consequences of smoking—50 years of progress: A report of the Surgeon General. **US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health**, Atlanta, GA. 2014. Disponível em: <<http://www.surgeongeneral.gov/library/reports/50-years-of-progress/exec-summary.pdf>> acesso em: 05 de abril de 2014

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-38, 2007.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.

- The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VAN CRAENENBROECK, E. M.; CONRAADS, V. M. Endothelial progenitor cells in vascular health: focus on lifestyle. **Microvascular Research**, v. 79, n. 3, p. 184-192, 2010.
- VAN LEEUWEN, D. M.; PEDERSEN, M.; HENDRIKSEN, P. J.; BOORSMA, A.; VAN HERWIJNEN, M. H.; GOTTSCHALK, R. W.; KIRSCH-VOLDERS, M.; KNUDSEN, L. E.; SRÁM, R. J.; BAKAK, E.; VAN DELFT, J. H.; KLEINJANS, J. C. Genomic analysis suggests higher susceptibility of children to air pollution. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 5, p. 977-983, 2008.
- VITORATOS, N.; SALAMALEIKIS, E.; DALAMAGA, N.; KASSANOS, D.; CREATSAS, G. Defective antioxidant mechanisms via changes in serum ceruloplasmin and total iron binding capacity of serum in women with pre-eclampsia. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 84, n. 1, p. 63-67, 1999.
- VIZZA, E.; CORRER, S.; GORANOVA, V.; HEYN, R.; ANGELUCCI, P. A.; FORLEO, R.; MOTTA, P. M. The collagen skeleton of the human umbilical cord at term. A scanning electron microscopy study after 2N-NaOH maceration. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, n. 5, p. 885-894, 1996.
- WEISS, S. T.; TAGER, I. B.; SCHENKER, M.; SPEIZER, F. E. The health effects of involuntary smoking. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 128, n. 5, p. 933-942, 1983.
- WILLIS, D.; POPOVECH, M.; GANY, F.; ZELIKOFF, J. Toxicology of smokeless tobacco: Implications for immune, reproductive, and cardiovascular systems. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews**, v. 15, n. 5, p. 317-331, 2012.
- WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; CAPELLÉRE-BLANDIN, C.; NGUYEN-KHOA, T.; ZINGRAFF, J.; JUNGERS, P.; DESCAPS-LATSCHA, B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney International**, v. 49, n. 5, 1996.
- WHITLEY, G. J.; CARTWRIGHT, J. E. Trophoblast-mediated spiral artery remodelling: a role for apoptosis. **Journal of Anatomy**, v. 215, n. 1, p. 21-26, 2009.
- WOOD, R. J. Manganese and birth outcome. **Nutrition Reviews**, v. 67, n. 7, p. 416-420, 2009.
- YANG, K.; JULAN, L.; RUBIO, F.; SHARMA, A.; GUAN, H. Cadmium reduces 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity and expression in human placental trophoblast cells. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 290, n. 1, p. E135-E142, 2006.
- YOUNG, B. C.; LEVINE, R. J.; KARUMANCHI, S. A. Pathogenesis of preeclampsia. **Annual Review of Pathological Mechanical Disease**, v. 5, p. 173-192, 2010.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences: an International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v. 19, n. 3, p. 124-128, 2004.

ZIMMERMANN, J. B.; SIRIMARCO, M. P.; NUNES, T. R.; SILVEIRA, D. S.; PEREIRA, M. P. Espiralização, estenose e trombose do cordão umbilical e morte fetal. **Revista HCPA**, v. 32, n. 1, 2012.

ZHANG, J.; RATCLIFFE, J. M. Paternal smoking and birthweight in Shanghai. **American Journal of Public Health**, v. 83, n. 2, p. 207-210, 1993.

ZDRAVKOVIC, T.; GENBACEV, O.; McMASTER, M. T.; FISHER, S. J. The adverse effects of maternal smoking on the human placenta: a review. **Placenta**, v. 26, p. S81-S86, 2005.

APÊNDICE



Termo de consentimento Livre e Esclarecido –TCLE

Eu, -----
RG nº ----- ou CPF nº-----, concordo em participar do estudo **Efeitos do tabagismo em sangue de neonatos e cordão umbilical**. Este estudo tem como objetivo verificar se os cordões umbilicais de puérperas usuárias e não usuárias de crack e/ou cocaína, diferem do ponto de vista estrutural e bioquímico. Para tanto, concordo em fornecer parte do cordão umbilical de meu recém-nascido para pesquisa. Através desses dados obtidos, poderão ser elaboradas políticas públicas e protocolos que visem reduzir eventuais danos ao conceito.

Dessa forma, concordo em fornecer informações para o(a) aluno(a) Ednildes de Almeida Olympio Rua, telefone para contato: (27)999730661. Os dados anônimos obtidos serão armazenados através de planilhas de Excel para posterior análise.

Em qualquer etapa do estudo, terei acesso à pesquisadora responsável, Ednildes de Almeida Olympio Rua, que pode ser encontrada na UVV, localizado à rua Comissário José Dantas de Melo, 21, CEP 29102770, Vila Velha, ES. Tel 34212000, onde também se situa o Comitê de Ética e Pesquisa em Humanos, cujo telefone é 32412080, que poderá ser usado em caso de dúvidas ou questionamentos sobre esta pesquisa. Como voluntário, durante ou depois da pesquisa é garantido o anonimato das informações que eu fornecer.

Li ou foi lido para minha pessoa as informações sobre o estudo e estou claramente informado(a) sobre minha participação no mesmo.

Ficou claro para mim quais são as finalidades do estudo, os riscos e benefícios para minha pessoa, a forma como a pesquisa será aplicada e a garantia da confidencialidade e privacidade de minhas informações, estando ciente do desconforto que estas informações e procedimentos possam me causar.

Concordo em participar voluntariamente deste estudo e, se for de meu interesse, poderei deixar de participar em qualquer momento, durante ou após a entrevista, sem penalidades, perdas ou prejuízos para minha pessoa ou de qualquer equipamento ou benefício que possa ter adquirido.

Esse TCLE está sendo assinado em duas (2) vias, sendo que uma ficará comigo e a outra sob a guarda da pesquisadora responsável. As informações que eu fornecer para o pesquisador serão arquivadas em meio digital e não serão utilizadas em meu prejuízo ou de outras pessoas, inclusive na forma de danos à estima, prestígio e prejuízo econômico ou financeiro.

Vitória, _____ de _____ de _____.

Vitória, ____ de _____ de 201__.

Assinatura do responsável pelo participante

Assinatura do Pesquisador



**FORMULÁRIO DE AVALIAÇÃO DE EFEITOS DO TABAGISMO DURANTE A
GESTAÇÃO EM SANGUE DE NEONATOS E CORDÃO UMBILICAL**

CÓDIGO: _____ PRONTUÁRIO: _____

NATURALIDADE: _____ PROCEDÊNCIA: _____

IDADE: _____ PROFISSÃO: _____ OCUPAÇÃO ATUAL: _____

ALFABETIZADA: _____ ANOS COMPLETADOS: _____ ESTADO CIVIL: _____

ANTECEDENTES FAMILIARES:

ANTECEDENTES PESSOAIS:

GRAVIDEZ ATUAL: PLANEJADA () SIM () NÃO DUM: _____ IG: _____ G P A

DATA DO TÉRMINO DA ÚLTIMA GESTAÇÃO: _____

ALGUM RN ABAIXO DE 2.500g? () SIM () NÃO

USO DE ANTI TETÂNICA? PRÉVIA: () SIM () NÃO

HOSPITALIZAÇÃO NA GRAVIDEZ? () SIM () NÃO

MOTIVO: _____

MEDICAMENTOS DE USO CONTÍNUO? () SIM () NÃO

USO DE: _____

CIGARROS: () SIM () NÃO QUANTOS AO DIA: _____

HÁ QUANTO TEMPO: _____

COCAÍNA/CRACK: () SIM () NÃO QUANTOS AO DIA: _____

HÁ QUANTO TEMPO: _____

QUANTO TEMPO DESDE O USO ATÉ O PARTO? _____

ALCOOL: () SIM () NÃO Tipo? _____ QUANTO POR DIA:

HÁ QUANTO TEMPO: _____

OUTRAS DROGAS: () SIM ()NÃO QUAL? _____ QUANTOS POR DIA: _____
 HÁ QUANTO TEMPO: _____

PRÉ NATAL () SIM ()NÃO QUANTAS CONSULTAS: _____

EXAMES DE PRÉ NATAL: () 1 TRIMESTRE () 2 TRIMESTRE () 3 TRIMESTRE

RESULTADOS: _____

Exames laboratoriais	Resultados	Observações
Hematócrito e Hemoglobina		
TS		
VDRL		
HBSAg		
Anti HIV (ELISA)		
Toxoplasmose		
Rubéola		
Teste rápido (internação)		

INTERCORRÊNCIAS: _____

PARTO

INÍCIO ESPONTÂNEO: () SIM ()NÃO

MEMBRANAS ÍNTEGRAS: () SIM ()NÃO

DATA DA ROTURA: _____

HORA DA ROTURA: _____ USO DE OCITÓCITOS: () SIM ()NÃO

USO DE MEDICAÇÕES DURANTE O TRABALHO DE PARTO: () SIM ()NÃO QUAIS?

APRESENTAÇÃO: _____

TERMINAÇÃO DO PARTO:

() ESPONTÂNEA () CESÁREA () FÓRCEPS

HORA: _____ DATA: _____

EPISIOTOMIA: () SIM ()NÃO LACERAÇÃO: () SIM ()NÃO

DEQUITAÇÃO COMPLETA: () SIM ()NÃO PLACENTA COMPLETA: () SIM ()NÃO

MORTE FETAL: () SIM ()NÃO

MOMENTO EM RELAÇÃO AO PARTO:

() ANTES () DURANTE () APÓS () IGN

RECÉM NASCIDO: _____ **SEXO:** _____

Dados

RESULTADOS

Dados

RESULTADOS

PUERPÉRIO

() FISIOLÓGICO

VDRL

() PATOLÓGICO

APGAR
PESO AO NASCER
PER. CEFÀLICO

CAPURRO

PESO/IG

()AIG ()PIG ()GIG

INTERCORRÊNCIAS
EXAME FÍSICO
AFU
BCF
COLO NA
INTERNAÇÃO
TEMPO DE
EVOLUÇÃO DO
PARTO
P.A
PULSO