

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

**ANÁLISE DO PERFIL CLÍNICO E CARACTERIZAÇÃO DE FATORES
DE RISCO GESTACIONAL: IMPACTO NA SAÚDE MATERNA E
FETAL EM USUÁRIAS DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS) DO
MUNICÍPIO DE GUARAPARI (ES)**

ANA CLAUDIA TRAVASSOS PAIXÃO CALDERARO

VILA VELHA-ES
JUNHO / 2022

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

**ANÁLISE DO PERFIL CLÍNICO E CARACTERIZAÇÃO DE FATORES
DE RISCO GESTACIONAL: IMPACTO NA SAÚDE MATERNA E
FETAL EM USUÁRIAS DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS) DO
MUNICÍPIO DE GUARAPARI (ES)**

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.

ANA CLAUDIA TRAVASSOS PAIXÃO CALDERARO

VILA VELHA-ES
JUNHO / 2022

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C146 Calderaro, Ana Claudia Travassos Paixão.
Análise do perfil clínico e caracterização de fatores de risco gestacional :
impacto na saúde materna e fetal em usuárias do sistema único de saúde
(SUS) do Município de Guarapari (ES)/ Ana Claudia Travassos Paixão
Calderaro. – 2022.
57 f. : il.

Orientadora: Bianca Prandi Campagnaro.
Coorientadora: Rafaela Aires.
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Vila Velha, 2022.
Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Gravidez. 3. Estresse oxidativo.
I. Campagnaro, Bianca Prandi. II. Aires, Rafaela. III. Universidade Vila
Velha. IV. Título.

CDD 615

ANA CLAUDIA TRAVASSOS PAIXÃO CALDERARO

**ANÁLISE DO PERFIL CLÍNICO E CARACTERIZAÇÃO DE
FATORES DE RISCO GESTACIONAL: IMPACTO NA SAÚDE
MATERNA E FETAL EM USUÁRIAS DO SISTEMA ÚNICO DE
SAÚDE (SUS) DO MUNICÍPIO DE GUARAPARI (ES)**

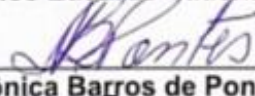
Dissertação apresentada à Universidade
Vila Velha como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas, para obtenção
do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Aprovada em 29 de junho de 2022.

Banca examinadora:



Prof. Dr. Carlos Eduardo Tadokoro (UVV-ES)



Prof. Dr. Mônica Barros de Pontes (UVV-ES)



Prof. Dr. Rafaela Aires (UFES)



Prof. Dr. Bianca Prandi Campagnaro (UVV-ES)
(Orientador)

Dedico esta pesquisa a Deus, por tudo que me permitiu vivenciar até aqui e por me capacitar. Aos meus pais, por estarem sempre comigo em todas as escolhas, independentemente do quão terão de trabalhar com elas. Aos meus filhos, Elisa e Arthur, por sempre renovarem minhas forças, por fazerem meus dias mais alegres, divertidos e me ensinarem o verdadeiro sentido do amor. Ao meu irmão Diego e meu esposo Alexandre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por cuidar de cada detalhe, me direcionar e guiar nas minhas escolhas e me agradecer com sua infinita bondade e misericórdia.

Agradeço à professora Dra Bianca Prandi Campagnaro pela oportunidade de me permitir vivenciar e conhecer o mundo da pesquisa. Pela humildade do ensinamento e por ter considerado minhas limitações e mesmo com elas, me permitiu explorar o meu potencial. Agradeço a sua forma de ensinar. Obrigada por todos ensinamentos e pelos momentos vividos nestes dois anos. Serei sempre grata.

Agradeço ao professor Dr. Thiago de Melo Costa Pereira por ter regado minha sementinha da pesquisa, que estava adormecida, me mostrando que quando temos vontade, o tempo e a capacidade pode ser encontrada. Obrigada pelas opiniões fundamentais e apoio constante.

Ao professor Dr. Elisardo Vasquez por ser fonte inesgotável de inspiração.

À Dra Rafaela Aires que fez parte do início deste projeto e que esteve presente em todas as etapas, me mostrando que sempre é possível aprimorar e buscar o melhor de nós.

Agradeço imensamente a Helena pela amizade e força desde o início, mantendo minha direção para esse projeto e minha fé de que tudo daria certo.

Agradeço a Larissa pelo apoio, ensinamento e paciência em cada protocolo executado, que foram tão importantes para a realização desta pesquisa.

Às companheiras de laboratório Glaucimeire e Sthephany pelo apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Vila Velha (PPGCF-UVV) pela oportunidade de estudo, e aos professores por todo ensinamento.

Agradeço a parceria do Laboratório Fisiologia da UFES e ao Edgar por me ajudar nas amostras de células mononucleares e ao Laboratório do professor Dr. Tadukoro, pela experiência oferecida com humildade e cordialidade, nunca esquecerei esses momentos.

À gerente Walkyria Procópio do Hospital Francisco de Assis de Guarapari, pela oportunidade de realizar essa pesquisa.

Agradeço aos colegas do Hospital Francisco de Assis por me ajudarem e me apoiarem nas coletas de amostras, sempre de bom grado, a todos o meu muito obrigada.

Agradeço em particular a cada paciente que contribuiu com esta pesquisa, minha sincera gratidão a cada um de vocês.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma tornaram essa pesquisa possível. O meu eterno agradecimento.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Gestação e sistema imunológico materno.....	14
1.2 Estresse oxidativo na Gestação.....	16
1.3 Ativação imunológica no feto.....	17
1.4 Estresse oxidativo no recém-nascido	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivos gerais.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Pacientes.....	22
3.2 Coleta de amostras	22
3.3 Produto proteico de oxidação avançada (AOPP)	22
3.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	23
3.5 Identificação e quantificação de células T-reguladoras.....	23
3.6 Características antropométricas e clínicas das gestantes.....	23
3.7 Características antropométricas dos recém-nascidos.....	24
3.8 Análise estatística.....	24
4. RESULTADOS	25
4.1 Características demográficas e clínicas das gestantes	25
4.2 Tipo de parto X Características clínicas e demográficas da gestante.....	28
4.3 Tipo de parto x estresse oxidativo.....	28
4.4 Tipo de parto X Células T reguladoras.....	29
4.5 Estresse oxidativo e comorbidades maternas.....	30
4.6 Células T reguladoras materna e Pressão Arterial.....	31
4.7 Estresse oxidativo materno e influência no Apgar 1' e 5'.....	32

4.8 Probiótico e risco de disbiose.....	32
4.9 Complicações maternas e reflexo nas células T reguladoras do Recém-nascido.....	33
5.0 Complicações materna e Influência no estresse oxidativo do Recém-nascido.....	34
5.1 Características gerais dos recém-nascidos.....	34
5.2 Estresse oxidativo em recém-nascidos.....	36
5.3 Risco Relativo.....	38
6. DISCUSSÃO.....	39
7. CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma com critérios de exclusão e amostra avaliada no estudo.

Figura 2: Níveis sistêmicos de AOPP em gestantes que tiveram via de parto vaginal e cesárea. Os valores indicam média±DP. * $p < 0,05$ vs. Vaginal.

Figura 3: Porcentagem de células T reguladoras em gestantes que tiveram via de parto vaginal e cesárea. Os valores indicam média±DP. * $p < 0,05$ vs. Vaginal.

Figura 4: Níveis de AOPP em gestantes eutróficas e com sobrepeso. Os valores indicam média±DP. * $p < 0,05$.

Figura 5: Níveis de AOPP em gestantes normotensas e hipertensas. Os valores indicam média±DP. * $p < 0,05$

Figura 6: Porcentagem de células T reguladoras em gestantes normotensas e hipertensas. Os valores indicam média±DP. * $p < 0,05$.

Figura 7: Correlação entre os níveis maternos de AOPP e o Apgar de 1' (A) e 5' (B) de seus recém-nascidos.

Figura 8. Níveis de AOPP em gestantes pré e pós utilização de probióticos. Os valores indicam média±DP. * $p < 0,05$.

Figura 9: Porcentagem de células T reguladoras em gestantes sem e com complicações. Os valores indicam média±DP. * $p < 0,05$.

Figura 10: Níveis de AOPP em RN de mães sem e com complicações. Os valores indicam média±DP. * $p < 0,05$.

Figura 11: Recém-nascido com internação normal e internação em UTIN. Os valores indicam média±DP. * $p < 0,05$

Figura 12: Correlação entre os níveis de TBARS e o Apgar de 1' (12A) e 5' (12B) dos recém-nascidos. Correlação entre os níveis de AOPP e o Apgar de 1' (12C) e 5' (12D) dos recém-nascidos. Correlação entre os níveis de AOPP e TBARS nos recém-nascidos (12E).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas e demográficas das gestantes.

Tabela 2. Características maternas e tipo de parto.

Tabela 3. Características dos recém-nascidos.

LISTA DE ABREVIATURAS

UVV- Universidade de Vila Velha

ROS – Espécie reativa de oxigênio

T reg - Células T reguladoras

FoxP3 - Fator de transcrição Forkhead box P3

AOPP - Produto proteico de oxidação avançada

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

MDA - Malondialdeído

CMN – Células mononucleares

RN – Recém-nascido

°C- Graus Celsius

DHEG – Doença hipertensiva específica da gestação

DMG – Diabetes mellitus gestacional

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

IMC- Índice massa corporal

ITU – Infecção do Trato urinário

PA- Pressão Arterial

g/ml – Gramas por mililitro

μL - Microlitro

μMol/mg – Micromol por miligrama

PET - Polietileno tereftalato

RESUMO

CALDERARO, Ana Claudia Travassos Paixão, M.Sc., Universidade Vila Velha-ES, junho de 2022. **ANÁLISE DO PERFIL CLÍNICO E CARACTERIZAÇÃO DE FATORES DE RISCO GESTACIONAL: IMPACTO NA SAÚDE MATERNA E FETAL EM USUÁRIAS DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS) DO MUNICÍPIO DE GUARAPARI (ES)**. Orientadora: Bianca Prandi Campagnaro. Co-orientadora: Rafaela Aires.

A gestação é uma fase caracterizada por alterações fisiológicas importantes, com objetivo de proporcionar o desenvolvimento embrionário adequado e um ambiente fetal saudável, que garanta um nascimento a termo e sem complicações. São necessárias modulações no sistema imunológico e na regulação de ROS materno e fetal garantindo uma relação harmoniosa. Evidenciamos que alterações nestes sistemas interferem no curso da gestação e características maternas e neonatais corroboram para desfechos gestacionais. O objetivo desta pesquisa foi analisar o perfil clínico das gestantes atendidas no Sistema Único de Saúde e identificar os fatores de risco materno e fetal que influenciam nos resultados obstétricos. Analisamos biomarcadores de estresse oxidativo (AOPP e TBARS) e a resposta imunológica através das células T reguladoras CD3, CD4 e FoxP3⁺ materno e fetal. Nossos resultados demonstraram que características clínicas e demográficas podem influenciar diretamente nos desfechos. Observamos uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à idade materna e tipo de parto, visto que a idade materna foi maior no parto cesárea (31 ± 6 , anos), quando comparada ao parto vaginal (24 ± 6 , anos). As análises de marcadores de estresse oxidativo materno demonstraram relação direta entre AOPP e comorbidades na gestação, $p=0,0300$, foi possível observar também que o mesmo biomarcador influenciou no apgar de 1' ($p < 0,05$; $r = -0,67$) e 5' ($p < 0,05$; $r = -0,51$) minuto de vida do recém-nascido. As células T reguladoras FoxP3⁺, estavam mais elevadas nas gestantes hipertensas, $p=0,0014$. Os RNs cujas mães apresentaram complicações exibiram porcentagem < de células T- reguladoras ($2,44 \pm 1,14$) comparados aos RNs de mães sem complicações ($5,99 \pm 4,7$) mesmo resultado encontrado em valores de AOPP para RNs de mães com ($0,643 \pm 0,20$) e sem ($0,453 \pm 0,13$) complicações, $p < 0,05$. Concluímos que a identificação precoce de alterações no sistema imunológico e biomarcadores de estresse oxidativo poderá garantir ações que reflitam no melhor prognóstico e qualidade de vida dos recém-nascidos, prevenindo complicações futuras.

Palavras-chave: estresse oxidativo, células T reguladoras, gravidez, recém-nascido.

ABSTRACT

CALDERARO, Ana Claudia Travassos Paixão, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, June de 2022. **ANALYSIS OF THE CLINICAL PROFILE AND CHARACTERIZATION OF GESTATIONAL RISK FACTORS: IMPACT ON MATERNAL AND FETAL HEALTH IN USERS OF THE UNIFIED HEALTH SYSTEM (SUS) OF THE MUNICIPALITY OF GUARAPARI (ES).** Advisor: Bianca Prandi Campagnaro. Co-advisor: Rafaela Aires.

Pregnancy is a phase characterized by important physiological changes, with the objective of providing adequate embryonic development and a healthy fetal environment, which guarantees a full-term and uncomplicated birth. Modulations in the immune system and in the regulation of maternal and fetal ROS are necessary, ensuring a harmonious relationship. We evidenced that alterations in these systems interfere in the course of pregnancy and maternal and neonatal characteristics corroborate for gestational outcomes. The aim of this research was to analyze the clinical profile of pregnant women assisted in the Unified Health System and to identify maternal and fetal risk factors that influence obstetric outcomes. We analyzed oxidative stress biomarkers (AOPP and TBARS) and immune response through mother and fetal CD3, CD4 and FoxP3+ regulatory T cells. Our results showed that clinical and demographic characteristics can directly influence outcomes. We observed a significant difference ($p < 0.05$) in relation to maternal age and type of delivery, since maternal age was higher in cesarean delivery (31 ± 6 years) when compared to vaginal delivery (24 ± 6 , years). The analyses of markers of maternal oxidative stress showed a direct relationship between AOPP and comorbidities during pregnancy, $p = 0.0300$, it was also possible to observe that the same biomarker influenced the apgar of 1' ($p < 0.05$; $r = -0.67$) and 5' ($p < 0.05$; $r = -0.51$) minute of life of the newborn. FoxP3+ regulatory T + were higher in hypertensive pregnant women, $p = 0.0014$. The NBs whose mothers presented complications exhibited < percentage of T-regulatory cells (2.44 ± 1.14) compared to the NBs of mothers without complications (5.99 ± 4.7) same result found in AOPP values for NBs of mothers with (0.643 ± 0.20) and without (0.453 ± 0.13) complications, $p < 0.05$. We conclude that the early identification of changes in the immune system and biomarkers of oxidative destitis may guarantee actions that reflect the better prognosis and quality of life of newborns, preventing future complications.

Key words: oxidative stress, regulatory T cells, pregnancy, newborn.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Gestação e sistema imunológico materno*

A gestação é um evento fisiológico, seu progresso ocorre na maior parte dos casos sem intercorrências. Porém algumas gestantes podem desenvolver comorbidades que influenciem no desfecho da gestação. Doenças pré-existentes também podem facilitar uma evolução desfavorável para mãe e para o feto (Thiele 2019). Neste contexto alguns sistemas precisam se adaptar para a continuidade da gestação.

Sustentar a homeostase, a identidade bioquímica do indivíduo e estabelecer uma defesa efetiva, são funções essenciais do sistema imunológico (Sakaguchi et al., 1995, Abbas, 2019). Esse sistema de defesa é dividido em imunidade inata ou natural e imunidade adaptativa ou adquirida. A imunidade inata ou natural é caracterizada pela resposta rápida a agentes estranhos sendo as células dendríticas e fagócitos alguns de seus componentes. Em contrapartida, a imunidade adaptativa ou adquirida ocorre em resposta a ativação da imunidade inata e possui grande especificidade, mas essa ação pode levar alguns dias (Baecher-Allan & Hafler, 2006). Esta imunidade é composta por barreiras celulares adaptativas, representadas pelos linfócitos B e T, executando ação primordial para o estabelecimento dessas funções (Sakaguchi et al., 2008).

Os linfócitos T, são provenientes do timo, um órgão linfático primário. Quando ativados se diferenciam em linfócitos T CD4 e T CD8 (Sakaguchi et al., 2010). A ativação das células T é induzida por sinais gerados a partir de pelo menos três conjuntos de estímulos: antígeno, co-estimuladores e citocinas, impulsionando a geração de células T efetoras e de memória (Scharschmidt et al., 2015). As respostas das células T é acompanhada da presença das células T reguladoras, evitando uma ação exacerbada do sistema, evidenciando que alterações nesse equilíbrio possam gerar uma cascata de reações indesejáveis (Gratz, Rosenblum e Abbas 2013).

Desde o início da gestação até o nascimento ocorrem mudanças imunológicas e fisiológicas necessárias para garantir o desenvolvimento fetal saudável (Kaplan, Shi e Walker, 2011). A determinação dos componentes envolvidos nestas modificações e sua caracterização tem sido objeto de inúmeros estudos (Aluvihare et al., 2004; Trowsdale et al., 2006; Nancy et al., 2012; Jiang et al., 2014) sendo possível, com os avanços das pesquisas determinar que a ação das células T

reguladoras, fazem parte do contexto de modificações que devem ocorrer neste processo (Sakaguchi et al., 2008).

O sistema imunológico feminino se modula antes mesmo do período gestacional (Schumacher et al., 2007). É possível afirmar que durante o ciclo menstrual mulheres férteis apresentam aumento de células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ em fase folicular tardia e queda destas células na fase lútea (Arruvito et al., 2007). Em mulheres com abortos espontâneos recorrentes, se observa pequena presença destas células em ambos momentos do ciclo menstrual, corroborando com a explicação de que a tolerância imunológica é fator determinante para o avanço da gestação (Zhao, Zeng e Liu, 2007). O grande desafio do sistema imunológico da gestante é manter um ambiente que seja adequado, evitando a reação imunológica aos aloantígenos paternos presentes no embrião e ao mesmo tempo garantir defesa eficiente contra patógenos (Williams et al., 2009). Neste contexto, as células T reguladoras são primordiais para condução de uma gestação saudável, sua elevação no período gravídico é característica deste ciclo (Somerset et al., 2004), atuando como células imunotolerantes (Huang Q, et. al., 2021).

Como já foi mencionado, as células T reguladoras são provenientes naturalmente do timo, porém existe uma ativação periférica que é importante na resposta imunológica (Lohr et al, 2009). Ainda no timo as células T CD4⁺FoxP3⁻ sofrem diferenciação devido: estimulação de receptores de células T, sinalização de CD28 e receptores de IL 2. Após esses mecanismos as células T reguladoras se transportam para periferia (Bluestone & Abbas, 2003). A indução de T reguladoras na periferia ocorre devido contato permanente com antígenos alimentares e microbiota comensal (Lohr, Knoechel & Abbas 2006). Na gestação a sua diferenciação é importante e ocorre durante o contato com o fluido seminal na concepção e durante a fase de implantação (Schumacher et al., 2007; Teles et al., 2013).

Os níveis de células T reguladoras são mais elevados na invasão da decídua de células trofoblásticas e diminuem a medida que a gravidez se aproxima da fase termo (Mold et al., 2008). Fato que pode ser explicado pela necessidade de regular a resposta pró-inflamatória intensa, característica do período de implantação do blastocisto (Polanczyk et al., 2004; Teles et al., 2013). A remodelação anormal de artéria espiral e inflamação local está associado a uma possível indução deficiente das células T reguladoras periféricas, prejudicando sua ação (Avagliano et al., 2011, Renaud et al., 2011).

As características das células T reguladoras são de responsabilidade do fator de transcrição Forkhead box P3 (FoxP3), que está diretamente envolvido na regulação, desenvolvimento e função dessas células reguladoras (Fontenot, 2003; Hori et al., 2003). A diminuição deste fator resulta em diferenciação prejudicada das células T uterinas em células T reguladoras, contribuindo para ocorrência de complicações e gestações com desfechos ruins (Sasaki et al., 2004). A existência de uma tolerância materna fetal alterada é ocasionada principalmente pela frequência e funcionalidade das células T reguladoras (Jasper et al., 2006). Outro fator que pode alterar a resposta imunológica durante a gestação, são as infecções (Oldenhove, et al., 2009). Pois influenciam na diminuição do número de células T reguladoras FoxP3 e incapacitam essas células de suprimir respostas efetoras, ocasionando abortos espontâneos ou partos prematuros (Gao et al., 2021).

1.2 Estresse oxidativo na gestação

As influências de fatores extrínsecos, como alimentação e hábitos de vida, estão diretamente relacionadas a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e conseqüentemente ao surgimento de inúmeras doenças (Longini et al., 2017). Pesquisas tem demonstrado que o estresse oxidativo é evidenciado em doenças como hipertensão, diabetes mellitus, doenças isquêmicas, Alzheimer, Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (Van et al., 2002; Khansari et al. 2009).

Na gestação a investigação sobre a repercussão e efeitos que estresse oxidativo tem causado proporcionou até o momento descobertas importantes. A gestação é marcada pelo aumento biológico e necessário das ROS, especialmente na placenta (Lu et al. 2018). Frente ao aumento das ROS, o sistema antioxidante é prontamente ativado. Em uma gestação saudável ocorre o equilíbrio entre as ações pró e antioxidantes (Poston et al., 2011), o que não é observado em uma gestação com complicações ou comorbidades. Esse desequilíbrio resulta em estresse oxidativo (Schoots et al, 2018) e pode influenciar no desenvolvimento fetal. Algumas doenças específicas do período reprodutivo feminino e da gestação como a pré-eclâmpsia (Pereira et al., 2014; Pereira et al., 2015; Mentese et al., 2018) evidenciam aumento significativo de estresse oxidativo.

A possível repercussão negativa na saúde materna e neonatal (Perrone et al., 2019), gerada pelas ROS têm suscitado a investigação de biomarcadores diretos e indiretos de estresse oxidativo. A análise destes biomarcadores em gestantes, com

complicações na gestação e parto, tem demonstrado que sua alteração é fator presente nestas condições (Hussain et al., 2021). Cabe ressaltar assim, a importância da utilização destes como exames complementares para prevenção de complicações.

1.3 Ativação imunológica no feto

É sabido que a gestação requer uma modulação materna ao antígeno fetal ao qual é exposta, para condução de uma gestação saudável e a termo. A relação inversa é ponto importante de discussão para entendermos as respostas fetais quando exposta aos antígenos maternos (Burt, 2013). Os estudos sobre sistema imune fetal remontam de anos, pesquisas voltadas para a investigação sobre o comportamento e início da resposta imunológica do feto há muito demonstram um desenvolvimento precoce do sistema imune adaptativo (Key et al., 1970; Friedberg et al., 1974; Haynes et al., 1988).

Crescentes investigações sobre tolerância materno fetal intraútero e a participação das células T reguladoras nesse conjunto, tem revelado descobertas interessantes (Teles et al., 2013). As células T reguladoras são responsáveis pela homeostase e regulação de inúmeras células imunes, a ausência ou deficiência nessas células é capaz de gerar alterações significativas na resposta imune inata e adquirida (Mold et al., 2008; Sakaguchi et al., 2008). Dada a importância de tais células, é imprescindível compreendermos o seu papel e sua funcionalidade já no período fetal.

A presença de células precursoras linfoides foi observada em órgãos fetais como baço, medula e fígado a partir da oitava semana de gestação (Asma, Van den Bergh e Vossen, 1986). Com os avanços das investigações podemos afirmar que a partir da 13ª semana de gestação as células T maduras estão presentes no feto e que na 14ª semana os órgãos fetais estão colonizados por células T reguladoras FoxP3⁺ (Sakaguchi et al., 2010). A ativação das células T reguladoras no feto ocorre devido a capacidade do sistema imunológico fetal em gerar tolerância aos aloantígenos maternos e paternos. Essa ação contribui para uma harmonização e evita uma rejeição (Krop et al., 2020; Motwani et al., 2022). Sendo assim, quanto maior a frequência e funcionalidade de células T reguladoras, maiores são as chances de uma gravidez chegar ao desfecho favorável (Liu et al., 2014; Malchow et al., 2016). As

células T reguladoras fetais podem sofrer influência materna na gestação. Exposição no período gravídico a infecções, alimentação, doenças crônicas e comorbidades, regulam de forma benéfica ou não essas células no feto (Gao et al., 2021), essa tolerância iniciada no útero, persiste após o nascimento (Mold et al., 2008).

1.4 Estresse oxidativo no recém-nascido

A placenta é responsável pelo suprimento adequado de oxigênio no período intra-útero, alterações na sua funcionalidade causam hipóxia crônica, ou aguda (Vento et al., 2013) e resultam em desequilíbrio entre as ROS e o sistema antioxidante, gerando riscos ao feto e recém-nascidos (Torres-Cuevas et al., 2017). O estresse oxidativo é produto gerado em resposta ao dano tecidual que ocorre devido ao aumento de ROS e a incapacidade em manter um meio equilibrado (Perrone et al., 2014). O feto e o recém-nascido são mais suscetíveis aos danos causados pelo estresse oxidativo (Perrone, Laschi e Buonocore, 2020). As ROS estão presentes em diversas doenças neonatais do recém-nascido pré-termo, como retinopatia da prematuridade, displasia bronco pulmonar, enterocolite necrosante, persistência do canal arterial, entre outras (Echeverri et al., 2015).

O comprometimento gerado pela ROS é através de análise dos biomarcadores de estresse oxidativo, assim como sucesso de tratamentos específicos (Perrone, Laschi e Buonocore, 2020). Seus resultados podem ser utilizados para o diagnóstico precoce, antecipando resultados desfavoráveis (Perrone, Laschi e Buonocore 2019), e desta forma garantir maior sobrevida e um desenvolvimento neonatal saudável. Os danos causados pelo estresse oxidativo em lipídios e proteínas são quantificados por biomarcadores específicos como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o produto proteico de oxidação avançada (AOPP) também em recém-nascidos (Longini et al., 2017; Perrone, Laschi e Buonocore, 2020).

Os valores alterados dos biomarcadores de estresse oxidativo estão presentes em inúmeros contextos de saúde e doença perinatal, indicando um potencial dano ao tecido, observado primariamente em recém-nascidos hipóxicos e prematuros (Perrone et al., 2014). A utilização clínica deste dado será um importante preditivo de doenças, auxiliando em condutas específicas (Millán et al., 2018). Evidências demonstram também que doenças vivenciadas pela gestante, assim como obesidade na gestação podem gerar estresse oxidativo na prole (Negro et al., 2017).

A gestação é uma fase caracterizada por modificações importantes para sua manutenção. É possível observar que as gestantes e a prole, estão expostas a modulações imunológicas e fisiológicas indispensáveis para este período. Porém existem fatores que podem influenciar no desenvolvimento fetal, no surgimento de complicações materna e doenças características do período gravídico. Portanto, este estudo teve por objetivo analisar o perfil clínico das gestantes, caracterizar os fatores de risco gestacional e identificar o impacto destes na saúde materna e fetal das usuárias do Sistema Único de Saúde (SUS) do município de Guarapari – ES.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Analisar o perfil clínico das gestantes do município de Guarapari que realizam pré-natal e parto no Sistema Único de Saúde.

2.2 Objetivos Específicos:

- Identificar fatores de risco que influenciem nos desfechos da gestação;
- Avaliar a influência dos fatores de risco gestacional no feto;
- Analisar a resposta imunológica da gestante durante período gestacional e sua repercussão na resposta imunológica do feto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Neste estudo transversal e descritivo, foram selecionadas gestantes que estavam no 3º trimestre gestacional (entre 28 e 41 semanas), que realizaram pré-natal nas Unidades Básicas de Saúde do Município de Guarapari – ES, cujo parto foi realizado no Hospital Materno Infantil Francisco de Assis da mesma cidade. Após assinatura de Termo de Consentimento Livre Esclarecido pelas gestantes, foi agendado coleta de amostras para análises. Foram incluídas gestantes maiores de 18 anos, saudáveis, com gestação única, no final do terceiro trimestre, com gravidez de baixo ou médio risco obstétrico, foram excluídas do estudo as gestantes menores de 18 anos, gestação gemelar, que utilizaram droga de abuso durante a gestação, tratamento psiquiátrico, e cujo parto não ocorreu no Hospital Materno Infantil Francisco de Assis. A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética da Universidade de Vila Velha (CEUA-UVV n°37938620400005064).

Das 25 gestantes selecionadas que atendiam a critérios de inclusão, cinco não completaram as etapas de coleta de amostras e uma realizou parto em outro nosocômio, sendo excluídas do estudo. Após aplicação de critérios de exclusão, foram mantidas dezenove gestantes, como demonstrado na figura 1.

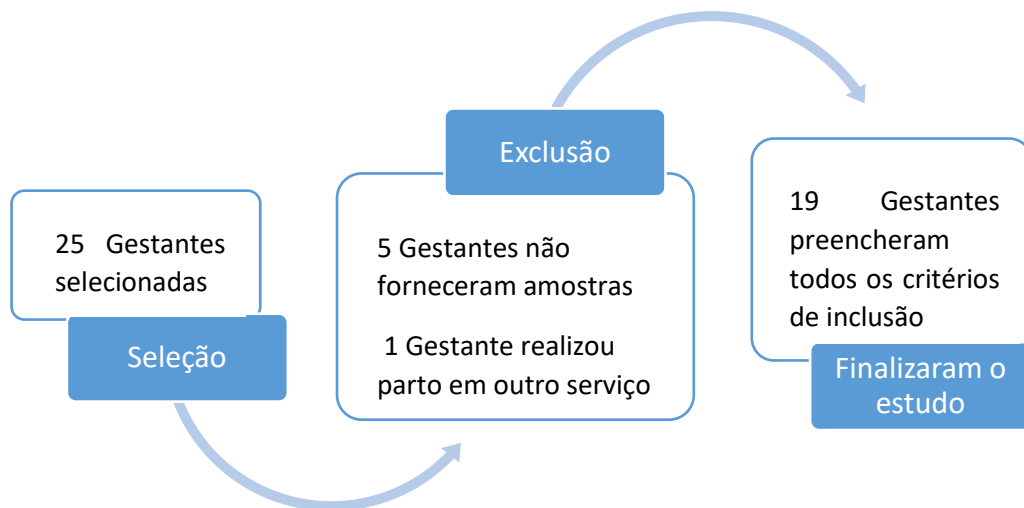


Figura 1. Fluxograma com critérios de exclusão e amostra avaliada no estudo.

3.2 Coleta de amostras

As amostras das gestantes foram obtidas através de sangue periférico e as amostras dos recém-nascidos foram coletadas do cordão umbilical imediatamente após o parto, ambas em tubo de EDTA 4 ml K3E VACUETTE®, feitos de plástico PET. A coleta de sangue do cordão umbilical foi realizada conforme rotina pré-estabelecida no setor para tipagem sanguínea do recém-nascido, cabe salientar que o clampeamento oportuno do cordão é uma rotina implementada neste serviço e não foi influenciada pelo estudo. O sangue foi armazenado em temperatura de 4°C e encaminhado ao Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Translacional (UVV) em até 4 horas após a coleta. A amostra foi fracionada para obtenção de células mononucleares (CMN) e plasma. A separação das células mononucleares foi realizada por gradiente de densidade, através da diluição em meio de cultura (DMEM) na proporção de 1:4 (v/v) de uma alíquota sanguínea. Essa diluição foi vertida sobre uma solução de igual volume de Histopaque®-1077 de densidade 1,077 g/mL. Após a centrifugação com rotação 450g a 18° C por 45 minutos, as diferentes fases foram coletadas e separadas em tubos. A fase contendo monócitos e linfócitos foi lavada e ressuspensa por duas vezes em solução de PBS e novamente centrifugadas a 450g a 18°C por 10 minutos, como descrito por Kampke et al. (2018) Para separação do plasma, alíquotas de sangue total foram centrifugadas a 3500 g por 10 minutos. As CMN foram utilizadas para imunofenotipagem e o plasma para análise de oxidação de proteínas e lipídios. As amostras foram mantidas a -80°C.

3.3 Produto proteico de oxidação avançada (AOPP)

Para determinar os produtos de proteína de oxidação avançada (AOPP), 40 μ L de plasma diluído em PBS (1,5) foi adicionado a 10 μ L de KI (1,16 mol/L) e 20 μ L de ácido acético glacial e a absorbância foi lida a 340 nm em um leitor de microplacas (Spectra-MAX-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). A formação do íon triiodeto através da oxidação do KI com cloramina-T foi utilizada para quantificar os níveis de AOPP e os dados foram expressos em μ mol /mg de cloramina-T por mg de proteínas como descrito por Witko-Sarsat et al. (1996) e Ton et al. (2020).

3.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi determinada através da quantificação de malondialdeído (MDA) após reação deste com ácido tiobarbitúrico (TBARS), 77µl de ácido perclórico à 7% foi adicionado 15µl de plasma, centrifugado por 10 minutos à 7.400rpm, retirado 47µl de sobrenadante, adicionado 53µl de TBA 0,06% e levado ao banho-maria por 1 hora à 95°C e procedido à leitura de absorbância em 532nm no leitor de microplacas (Spectra-MAX-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), conforme HANASAND et al., (2012). Os dados foram expressos em µMol MDA/mg de proteínas. A quantificação de malondialdeído foi feita a partir de curvas de calibração construídas com concentrações conhecidas de MDA.

3.5 Identificação e quantificação de células T- reguladoras

As células T reguladoras foram identificadas a partir de CMN das gestantes e recém-nascidos. Para isso, as amostras foram incubadas com anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-FoxP3 conjugados as fluorocromos APC, FITC e PE.

As CMN foram permeabilizadas com 50 µl de FcBlock em cada amostra, após este processo foram armazenadas a 8°C por 20 min sendo adicionado após este período 50µl CD3 e CD4 em cada amostra e procedido a incubação por mais 30 minutos a 8°C e adicionado 100 µl de PBS ao término desta etapa. Centrifugado por 10 minutos a 3500 rpm, retirado sobrenadante e adicionado 100µl citofix/citoperm (BD), foram incubadas por 30 minutos protegido da luz e em temperatura ambiente, após centrifugação por 10 minutos a 3500rpm, retirado 100µl, adicionado mesma quantidade de PFA1% Twen 20 0,5% e repetido a etapa anterior de incubação. Posterior ao processo de centrifugação de 10 minutos em 3500rpm foi retirado sobrenadante e adicionado 1µl FoxP3, incubação nesta etapa se deu por 1 hora nas mesmas condições anteriores, protegido da luz e em temperatura ambiente. Na etapa final ocorreu adição de 200µl de PBS, procedido à centrifugação por 10 minutos a 3500rpm e procedido à leitura em citômetro 150µl, de acordo com Roncador et al (2005).

3.6 Características antropométricas e clínicas das gestantes

Para quantificação de índice de massa corporal (IMC) utilizamos a divisão do peso corporal (kg) pelo valor da altura ao quadrado (kg/m^2), seguimos a classificação do estado nutricional determinada pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2000): < 16 (abaixo do peso), 18,5 a 24,9 (eutrofia), 25,0 a 29,9 (sobrepeso) e > 30 (obesidade). Para

avaliação do risco de disbiose, utilizamos o questionário de risco de disbiose– DYS- FQM, que classifica quanto ao risco de disbiose de acordo com somatória de pontos do questionário, 0 a 10 pontos (baixo risco de disbiose), 11 a 21 pontos (médio risco de disbiose), 22 a 32 pontos (alto risco de disbiose) e 33 a 43 pontos (muito alto risco de disbiose).

3.7 Características antropométricas dos recém-nascidos

Foram realizadas medidas de todos os recém-nascidos imediatamente após o nascimento, para verificação de perímetro cefálico (PC), perímetro torácico (PT), perímetro abdominal (PA), peso e altura. Os RN estavam em posição dorsal, em berço aquecido, para verificação dos perímetros foi utilizado fita métrica, para altura utilizado régua específica para RN e o peso foi mensurado através de balança com calibração dentro das normativas do INMETRO.

3.8 Análise estatística

Os dados estão expressos como média \pm DP. A normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Considerando a distribuição Gaussiana dos dados, o Teste t-Student foi realizado para a análise de amostras independentes. Além disso, avaliamos o coeficiente de correlação de Pearson para medir a relação estatística entre duas variáveis contínuas. Usamos a análise de risco relativo para medir o excesso de risco para um determinado desfecho desfavorável nos indivíduos expostos, comparado com os que não estão expostos. Os dados de risco relativo foram avaliados através do teste de χ^2 . Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism, versão 8.0.

4. RESULTADOS

4.1 Características demográficas e clínicas das gestantes

As características demográficas e clínicas das gestantes são apresentadas na Tabela 1. Podemos observar que a idade de maior prevalência foi a faixa etária de 30 a 41 anos (47%) e escolaridade foi o ensino médio (53%). Quanto a raça 53% se declararam brancas, 37% pardas e 10% negras.

A nomenclatura utilizada para gestantes com gestação anterior é multípara, a gestante que se encontra em sua primeira gestação é classificada como nulípara. As multíparas, gestantes estavam em sua segunda ou mais gestações, totalizaram 63%, sendo os desfechos gestacionais anteriores divididos em: 9 partos cesáreas e 8 partos vaginais, 2 relataram aborto espontâneo anterior e 1 relatou a ocorrência de óbito fetal, caracterizando natimorto (nascimento de feto morto). As que relataram ser a primeira gestação, as nulíparas totalizaram 37%. Todas as gestantes deste estudo evoluíram para parto, não houve aborto, óbito fetal ou óbito ao nascimento, sendo a via de parto da gestação atual predominantemente a cesárea, apresentando 58% do total de partos realizados.

Em relação ao índice de massa corporal (IMC), 26% foram classificadas com sobrepeso (IMC>25) e 74% com eutrofia (IMC até 24,9), dentre as sobrepeso, apenas 1 apresentou via de parto foi vaginal, todas as outras apresentaram via de parto cesárea. As comorbidades identificadas foram: hipertensão arterial sistêmica (HAS) 11%, doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG) 11%, diabetes mellitus gestacional (DMG) 11% e epilepsia 6%. As pacientes com diagnóstico de diabetes mellitus gestacional, não fizeram uso de hipoglicemiantes, ambas mantiveram controle glicêmico com dieta, e uma apresentava sobrepeso. As pacientes com alterações na pressão arterial utilizaram medicamentos de controle pressórico após diagnóstico, as que já possuíam diagnóstico prévio de HAS fizeram ajustes para utilização de anti-hipertensivo ideal para período gravídico.

Quanto às infecções adquiridas na gestação ocorreram: infecção do trato urinário (26%), Covid-19 (21%) e 6% de infecção por *Treponema pallidum* (sífilis). As gestantes com diagnóstico de infecção do trato urinário (ITU) apresentaram confirmação de cura após tratamento com antibiótico, e uma apresentou necessidade

de internação devido a ITU recorrente. Das pacientes que foram diagnosticadas com Covid-19, apenas 1 contraiu a infecção antes da gestação, em ambos os casos os sintomas da doença foram leves, sem necessidade de hospitalização. A infecção de sífilis na gestação gerou internação do recém-nascido após o nascimento para tratamento de sífilis congênita, devido esquema de tratamento incompleto da mãe na gestação. Foi utilizado corticóide para inibição de trabalho de parto em 21% das gestantes e, dentre estas, apenas uma entrou em trabalho de parto antes das 39 semanas de gestação, com 37 semanas. 32% utilizaram antibiótico pré-natal e 26% fizeram ingestão de probiótico durante algum período na gestação.

Tabela 1 Características clínicas e demográficas das gestantes

Parâmetros		N° Gestantes (n=19)	%
Raça		Branca	10 (53%)
		Parda	7 (37%)
		Negra	2 (10%)
Escolaridade		Fundamental	6 (32%)
		Médio	10 (53%)
		Superior	3 (15%)
Grupos por Faixa etária		18 a 23 anos	5 (26%)
		25 a 29 anos	5 (26%)
		30 a 41 anos	9 (47%)
Gestações anteriores	NÃO	Nulíparas	7 (37%)
	SIM	Múltiparas	12 (63%)
Tipo de partos anteriores das múltiparas		Parto cesárea	9 (53%)
		Parto Vaginal	8 (47%)
		Aborto espontâneo	2 (11%)
		Natimorto	1 (5%)
Via de Parto		Cesárea	11 (58%)
		Vaginal	8 (42%)
IMC		> ou = 25 - Sobrepeso	5 (26%)
		Até 24,9 - Eutrofia	14 (74%)
Comorbidades antes e durante a gestação		DMG	2 (11%)
		HAS	2 (11%)
		DHEG	2 (11%)
		EPILEPSIA	1 (6%)
Infecções adquiridas na gestação		Covid-19	4 (21%)
		Sífilis na gestação	1 (6%)
		ITU	5 (26%)
Utilização corticóide pré-natal	SIM	4 (21%)	
	NÃO	15 (79%)	
Utilização de antibiótico pré-natal	SIM	6 (32%)	
	NÃO	13 (68%)	
Utilização de Probiótico	SIM	5 (26%)	
	NÃO	14 (74%)	

4.2 Tipo de parto X Características clínicas e demográficas da gestante

Algumas características clínicas e demográficas são predominantes em determinado tipo de parto. Realizamos análise dessas características, conforme demonstrado na tabela 2.

Observamos uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à idade materna e tipo de parto, visto que a idade materna foi maior no parto cesárea (31 ± 6 , anos), quando comparada ao parto vaginal (24 ± 6 , anos). Idade gestacional no momento do parto, IMC e pressão arterial não influenciaram no tipo de parto ($p > 0,05$).

Tabela 2. Características maternas e tipo de parto

	Parto Vaginal (N=8)	Parto Cesárea (N=11)
Idade materna	24,8 \pm 6,01	31,7 \pm 6,03*
Idade gestacional no parto	39,3 \pm 0,91	38,8 \pm 0,60
IMC	23,3 \pm 1,94	23,6 \pm 2,82
Pressão Sistólica (mmHg)	110 \pm 13,09	116,3 \pm 5,04
Pressão Diastólica (mmHg)	72,5 \pm 11,6	72,7 \pm 10,09

Os valores são expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$. Utilizado Teste t de Student para análise de amostras independentes.

4.3 Tipo de parto x estresse oxidativo

Investigamos os níveis de AOPP no sangue de gestantes e avaliamos se o tipo de parto (vaginal ou cesárea) influenciam no estresse oxidativo materno (Figura 2). Nossos dados mostram que os níveis de AOPP são maiores em gestantes submetidas à cesariana ($0,59 \pm 0,1$ μ Mol/mg de proteína) quando comparadas às gestantes que tiveram seus bebês por via vaginal ($0,48 \pm 0,07$ μ Mol/mg de proteína).

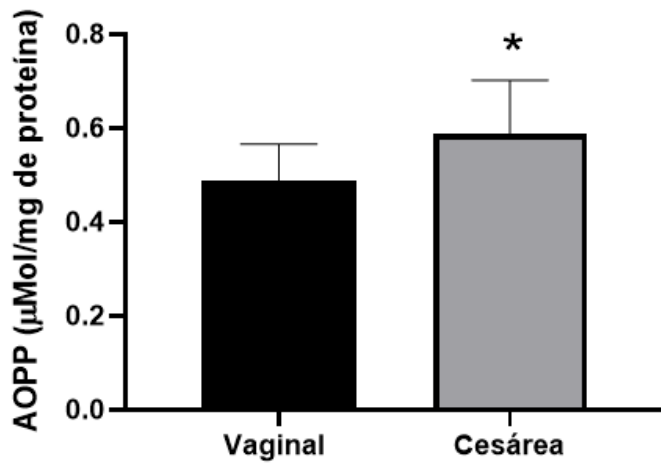


Figura 2: Níveis sistêmicos de AOPP em gestantes que tiveram via de parto vaginal e cesárea. Os valores indicam média±DP. * $p < 0,05$ vs. Vaginal.

4.4 Tipo de parto X Células T reguladoras

Avaliamos também se o número de células T reguladoras no sangue das gestantes é influenciado pelo tipo de parto (Figura 3). Identificamos que gestantes que tiveram parto cesárea ($4,8 \pm 1,3$ % de células) apresentam menor número de células T reguladoras quando comparadas com gestantes que tiveram seus bebês por parto vaginal ($7,4 \pm 2,6$ % de células).

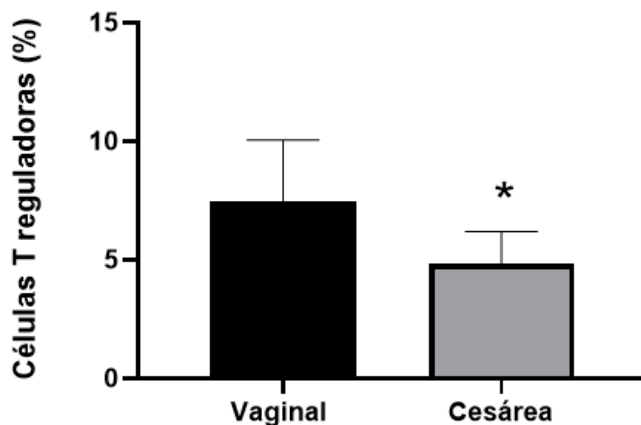


Figura 3: Porcentagem de células T reguladoras em gestantes que tiveram via de parto vaginal e cesárea. Os valores indicam média±DP. * $p < 0,05$ vs. Vaginal.

4.5 Estresse oxidativo e comorbidades maternas

Na avaliação da relação entre os níveis de AOPP e o IMC das gestantes (Figura 4), foi possível observar que as mulheres com sobrepeso (IMC >24,9) apresentavam valores de AOPP maiores ($0,61\pm 0,04$ $\mu\text{Mol/mg}$ de proteína) quando comparadas com as mulheres com IMC até 24,9 ($0,52\pm 0,1$ $\mu\text{Mol/mg}$ de proteína).

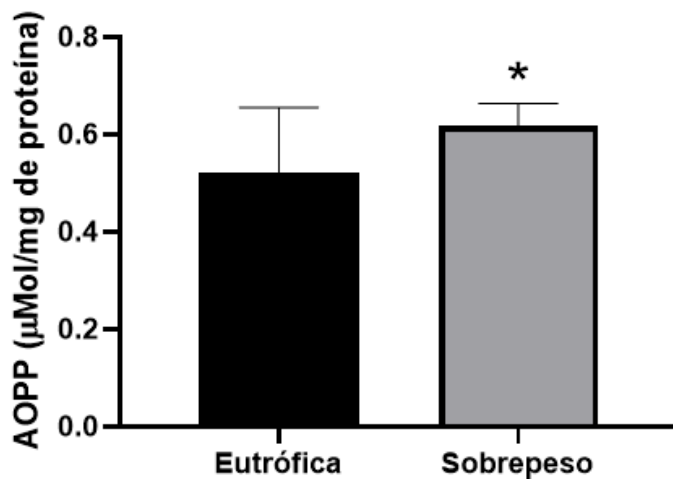


Figura 4: Níveis de AOPP em gestantes eutróficas e com sobrepeso. Os valores indicam média \pm DP. * $p<0,05$.

Avaliamos também se os níveis de AOPP estariam relacionados à hipertensão arterial. Como demonstrado no gráfico (Figura 5), ao analisarmos o impacto da alteração de pressão arterial durante a gestação, seja por HAS ou DHEG, fica evidente que esta comorbidade está intimamente ligada ao estresse oxidativo, visto que os valores de AOPP se apresentaram aumentados nas gestantes hipertensas ($0,64\pm 0,08$ $\mu\text{Mol/mg}$ de proteína), quando comparado com as normotensas ($0,51\pm 0,1$ $\mu\text{Mol/mg}$ de proteína).

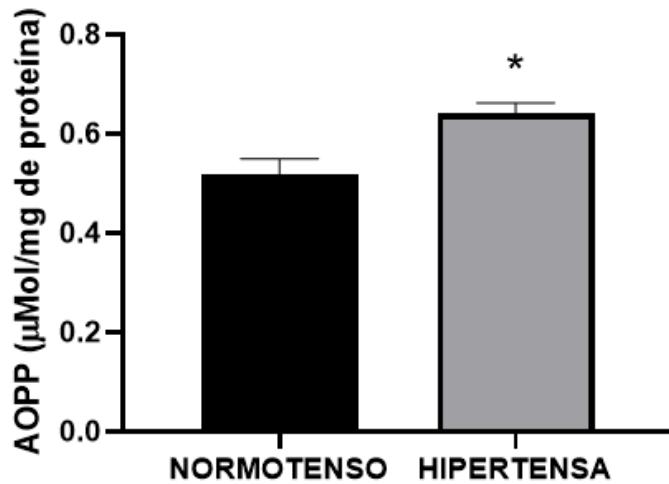


Figura 5: Níveis de AOPP em gestantes normotensas e hipertensas. Os valores indicam média±DP. * $p < 0,05$

4.6 Células T reguladoras materna e Pressão Arterial

Ao avaliar a quantidade de células T reguladoras em gestantes normotensas e hipertensas (Figura 6), observamos que as hipertensas ($8,6 \pm 2,8$ %) apresentam número maior destas células, quando comparadas às gestantes normotensas ($5,0 \pm 1,8$ %).

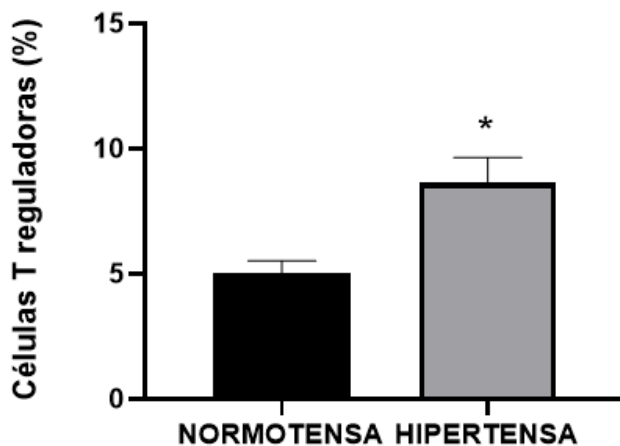


Figura 6: Porcentagem de células T reguladoras em gestantes normotensas e hipertensas. Os valores indicam média±DP. * $p < 0,05$.

4.7 Estresse oxidativo materno e influência no Apgar 1' e 5'

A geração de ROS durante período gestacional, pode refletir no parto e nos desfechos da gestação, identificamos que as alterações de AOPP maternas influenciaram no 1' (Figura 7A) e 5' (Figura 7B) minuto de vida do recém-nascido, visto que o Apgar realizado em ambos momentos foi diretamente afetado pelos valores de AOPP materno. Observamos que quanto maiores os níveis de AOPP, menor o Apgar dos recém-nascidos (1': $r = -0,7$; 5': $r = -0,51$).

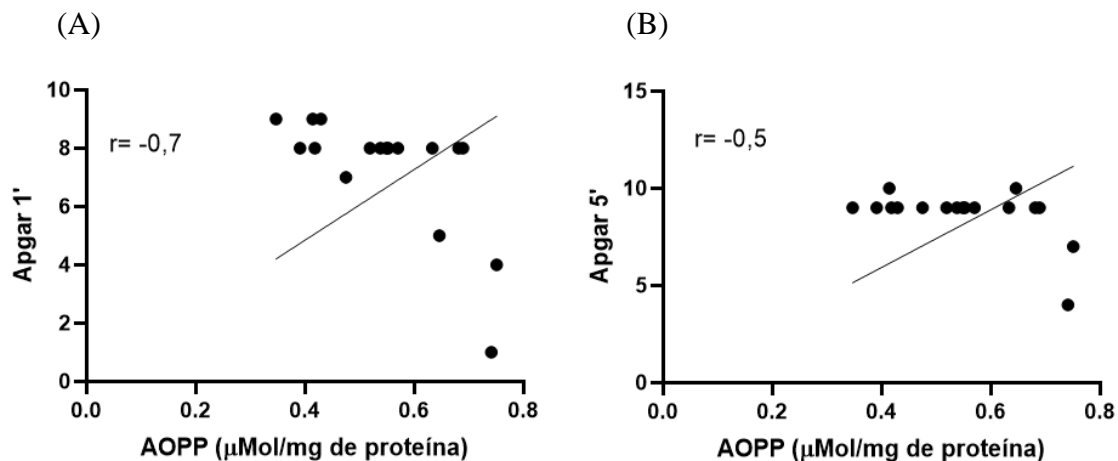


Figura 7: Correlação entre os níveis maternos de AOPP e o Apgar de 1' (A) e 5' (B) de seus recém-nascidos.

4.8 Probiótico e risco de disbiose

No pequeno grupo de mulheres que fizeram uso de probiótico durante a gestação (N=5), observamos um aumento nos níveis de AOPP (figura 8) quando comparado com os dados coletados antes do início da suplementação (Pré: $0,5 \pm 0,1$ vs Pós: $0,6 \pm 0,05$ $\mu\text{Mol/mg}$ de proteína).

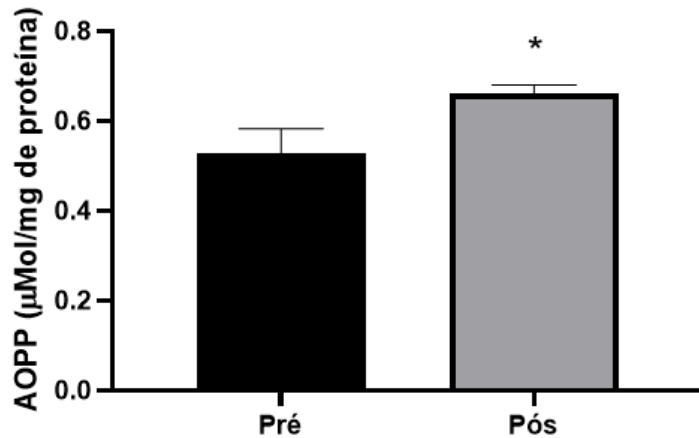


Figura 8. Níveis de AOPP em gestantes pré e pós utilização de probióticos. Os valores indicam média±DP. * $p < 0,05$.

4.9 Complicações maternas e reflexo nas células T reguladoras do Recém-nascido

Foi possível observar, como demonstrado na figura 9, que a quantidade de células T reguladoras dos recém-nascidos sofreram alterações quando avaliamos a presença de complicações maternas na gestação ou parto. Os RNs cujas mães apresentaram complicações exibiram números menores de células T reguladoras ($2,4 \pm 1,1$ %) quando comparados aos RNs de mães sem complicações ($6,0 \pm 4,7$ %). Outra característica observada no estudo foi que quanto maior a idade gestacional menor o valor de células T reguladoras encontrado nos recém-nascidos ($r = -0,6$).

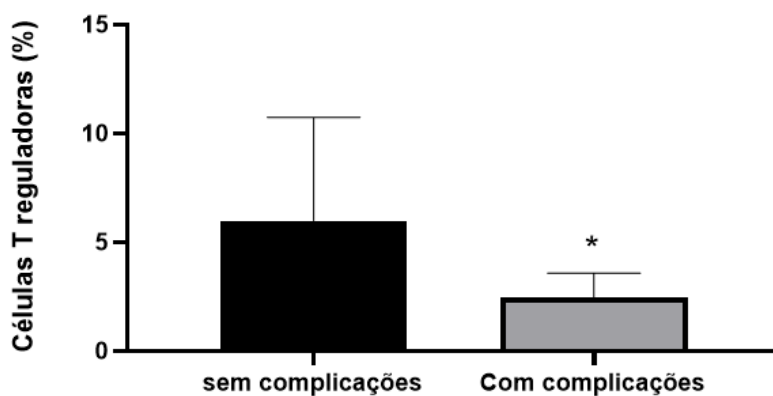


Figura 9: Porcentagem de células T reguladoras em gestantes sem e com complicações. Os valores indicam média±DP. * $p < 0,05$.

5.0 Complicações materna e Influência no estresse oxidativo do Recém-nascido

As complicações maternas vivenciadas na gestação ou parto, repercutem no estresse oxidativo observado nos recém-nascidos (Figura 10), visto que bebês de mães que passaram por complicações ($0,64 \pm 0,2 \mu\text{Mol/mg}$ de proteína) tem níveis elevados de AOPP quando comparados com bebês de mães sem complicações ($0,45 \pm 0,13 \mu\text{Mol/mg}$ de proteína).

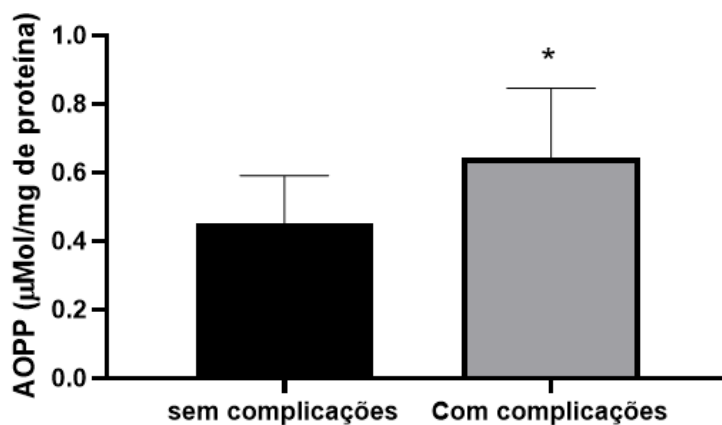


Figura 10: Níveis de AOPP em RN de mães sem e com complicações. Os valores indicam média±DP. * $p < 0,05$.

5.1 Características gerais dos recém-nascidos

A Tabela 3. Descreve as características gerais dos recém-nascidos. Podemos ressaltar ao analisarmos a idade gestacional no dia do parto, que não foi realizado parto prematuro (<37 semanas) assim como não ocorreu nascimento após 41 semanas de gestação, os nascimentos ficaram compreendidos entre 37 e 40 semanas de idade gestacional (IG). As medidas antropométricas aferidas ao nascimento, não apresentaram valores discrepantes, apenas 1 RN apresentou perímetro cefálico (PC) menor de 32cm, o mesmo foi diagnosticado posteriormente com microcefalia, 53% apresentaram comprimento (cm) entre 48,5 –50,5 cm, quanto ao peso de nascimento todos os RNs apresentavam-se adequados para idade gestacional (AIG), não houve classificação de pequeno para idade gestacional (PIG) ou grande para idade gestacional (GIG). Em relação ao gênero, o sexo masculino apresentou nascimento de 10 crianças e no sexo feminino 9. Todos os recém-nascidos que apresentaram apgar 1' entre 1 – 5 foram internados na UTIN, correspondendo a 16% dos nascimentos.

Tabela 3. Características dos recém-nascidos.

Parâmetros	N° de Recém Nascidos (n=19)		%
Idade Gestacional no parto (IG)	37 – 38	3	(16%)
	39	11	(58%)
	40	5	(26%)
Peso ao nascimento (g)	2700 – 3000	4	(21%)
	>3000 < 4000g	15	(79%)
Perímetro Cefálico (cm)	<32	1	(5%)
	32,5 - 33	3	(16%)
	33,5 – 35	9	(47%)
	36 – 37	6	(32%)
Comprimento (cm)	46,5 – 48	5	(26%)
	48,5 –50,5	10	(53%)
	> 50,5 < 52,6	4	(21%)
Sexo	Masculino	10	(53%)
	Feminino	9	(47%)
Apgar Score 1'	1-5	3	(16%)
	7-9	16	(84%)
Apgar Score 5'	4-7	2	(11%)
	9-10	17	(89%)
Internação UTIN	SIM	3	(16%)
	NÃO	16	(84%)

5.2 Estresse oxidativo em recém-nascidos

As análises de estresse oxidativo nos RNs foram realizadas utilizando sangue do cordão umbilical, coletado após clampeamento oportuno. Os biomarcadores utilizados foram os mesmos das gestantes, TBARS e AOPP. Ao analisarmos os valores de TBARS dos recém-nascidos com necessidade de internação na UTIN (Figura 11) encontramos níveis maiores em bebês que precisaram ficar na UTIN ($0,03 \pm 0,001$ $\mu\text{Mol MDA/mg}$ de proteína), quando comparados àqueles que não passaram por este tipo de internação ($0,02 \pm 0,003$ $\mu\text{Mol MDA/mg}$ de proteína).

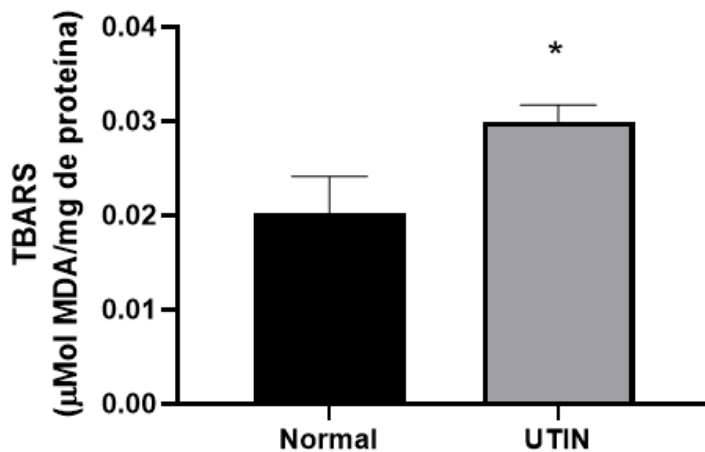


Figura 11: Recém-nascido com internação normal e internação em UTIN. Os valores indicam média±DP. * $p < 0,05$.

Outro dado interessante foi a correlação que observamos entre os níveis dos biomarcadores de estresse oxidativo e o Apgar 1' e 5'. Com relação dos níveis de TBARS, observamos correlação negativa com o Apgar 1' ($r = -0,63$, Figura 12A) e 5' ($r = -0,76$, Figura 12B). Seguindo o mesmo padrão, observamos correlação negativa entre os níveis de AOPP e o Apgar 1' ($r = -0,5$, Figura 12C) e 5' ($r = -0,63$, Figura 12D). A partir desses dados, decidimos avaliar a correlação entre os níveis de AOPP e TBARS nos recém-nascidos e observamos correlação positiva entre estes parâmetros ($r = -0,50$, Figura 12E). Não observamos diferenças nos biomarcadores de estresse oxidativo entre os RNs nascidos de parto vaginal e parto cesáreo.

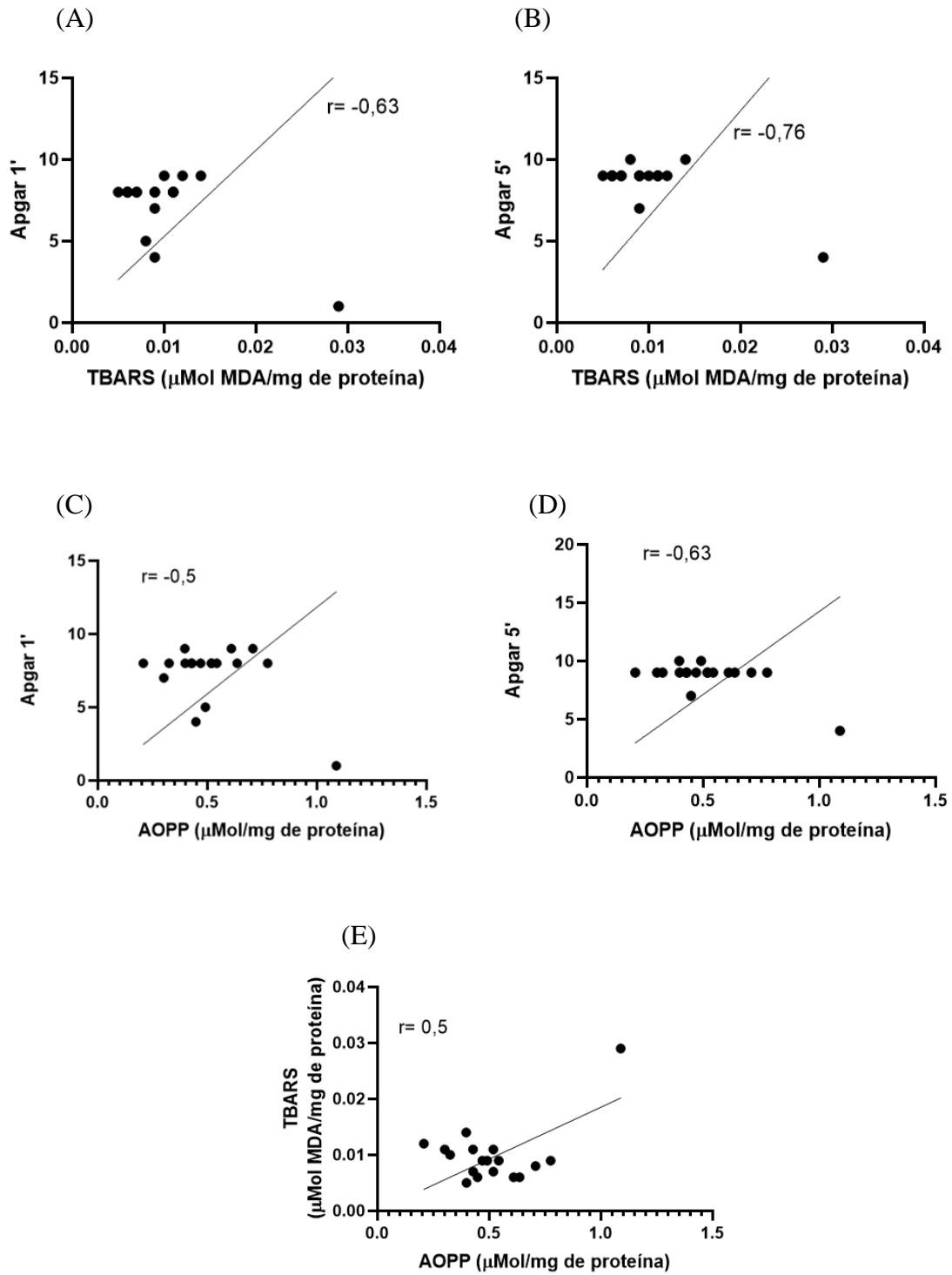


Figura 12: Correlação entre os níveis de TBARS e o Apgar de 1' (12A) e 5' (12B) dos recém-nascidos. Correlação entre os níveis de AOPP e o Apgar de 1' (12C) e 5' (12D) dos recém-nascidos. Correlação entre os níveis de AOPP e TBARS nos recém-nascidos (12E).

5.3 *Risco Relativo*

Com relação a análise de risco relativo, observamos que gestantes com níveis de AOPP superiores a 0,53 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína apresentam risco 3,9 vezes maior de terem filhos por parto via cesárea do que por via vaginal ($p < 0,05$). De maneira complementar, gestantes com níveis de TBARS maiores que 0,024 $\mu\text{mol MDA/mg}$ de proteína apresentam risco 5,6 vezes maior de terem parto cesárea ($p < 0,05$). Quando avaliamos o risco relativo de biomarcadores de estresse oxidativo nas gestantes influenciarem o Apgar 1' dos recém-nascidos, verificamos que gestantes com níveis elevados de TBARS e AOPP apresentam risco 1,8 e 1,5 vezes maior ($p < 0,05$), respectivamente, de que seus bebês apresentem Apgar 1' menor que 7. Por fim, avaliamos se o número de células T reguladoras na gestante afetam o valor do Apgar 1' e vimos que quanto maiores os valores dessas células no sangue das gestantes, maior os riscos de que seus recém-nascidos apresentem Apgar 1' menor que 7 (RR: 2,8, $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

As mudanças que ocorrem na gestante durante o período gravídico a fim de se manter uma gestação viável até o nascimento ainda são alvo constante de estudos. Caracterizamos alguns fatores que influenciam na viabilidade fetal e desfechos gestacionais. Foi possível identificar com nossos resultados que a idade materna influencia a via de parto, sendo a idade avançada mais predisposta ao parto cesáreo. As alterações dos biomarcadores de estresse oxidativo se mostrou evidente quando relacionado a comorbidades na gestação, incluindo sobrepeso, DMG, HAS e DHEG. A geração de ROS durante período gestacional, pode refletir também no parto e no RN, identificamos que as alterações de AOPP maternas influenciaram no Apgar de 1' e 5' minuto de vida do RN, sendo proporcionalmente inverso, quanto maior valor de AOPP menor o valor do apgar. Notavelmente verificamos uma alteração de T reguladoras FoxP3⁺ nas gestantes com HAS e DHEG, caracterizando um aumento percentual destas células nesse grupo. A influência das condições maternas também foi observada quando comparamos as células T reguladoras FoxP3⁺ e a AOPP da prole cuja a mãe apresentou complicações na gestação ou no parto. Quando avaliamos o risco relativo de biomarcadores de estresse oxidativo nas gestantes influenciarem o Apgar 1' dos recém-nascidos, verificamos que gestantes com níveis elevados de TBARS e AOPP apresentam risco 1,8 e 1,5 vezes maior ($p < 0,05$), respectivamente, de que seus bebês apresentem Apgar 1' menor que 7. Cabe ressaltar que constatamos aumento de estresse oxidativo nos RN com necessidade de internação na UTI, mesmo fato notado ao comparar esse biomarcador com os valores de Apgar 1' e 5'.

Realizamos comparação da via de parto realizada e as características maternas, identificamos que existem fatores que influenciam ou são influenciados pelas vias distintas de parto realizado. Evidenciamos em nosso estudo que a média da idade materna foi maior em relação ao parto cesárea. Resultados semelhantes foram relatados em estudos que avaliaram os desfechos obstétricos em gestações de mulheres com idade avançada, onde foi possível observar associação de idade materna avançada ao parto cesáreo (Chan, B.C. e Lao, T.T. 2008; Odame Anto et al., 2018). Odome Anto et al., (2018) também relataram desequilíbrio ocasionado pela idade materna avançada nos biomarcadores diretos de estresse oxidativo analisados

em seu estudo, evidenciamos através da análise de risco relativo que as gestantes com níveis de AOPP superiores a 0,53 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína apresentam risco 3,9 vezes maior de terem filhos por parto via cesárea do que por via vaginal ($p < 0,05$). Ao analisarmos o tipo de parto e a geração de ROS, nossos resultados mostraram aumento de AOPP para o parto cesáreo, resultados semelhantes foram encontrados por Mutlu et al. (2011) e Noh et al. (2014) ao comparar via de parto e estresse oxidativo, porém em ambos estudos foi verificada alteração de TBARS, esse biomarcador não apresentou diferença significativa em nossa análise de via de parto, mas verificamos que as gestantes que apresentaram TBARS maiores que 0,024 $\mu\text{mol MDA}/\text{mg}$ de proteína apresentam risco 5,6 vezes maior de terem parto cesáreo ($p < 0,05$). Os dados relatados no estudo de Vakilian et al. (2009), conflitam com os nossos resultados e com os demais, pois menciona a alteração de biomarcador de estresse oxidativo em parto vaginal. Ainda sobre a análise de tipo de parto e influência nas células T, foi possível verificar que o parto cesáreo apresentou aumento de células T CD 4, o que não foi verificado com as demais T reguladoras FoxP3⁺ e CD3, diferente do que foi observado por Santner-Nanan et al. (2009) ao testar se o tipo de parto poderia explicar diferença no número de células T CD4 que expressam IL17, e verificaram que o efeito de tipo de parto não foi significativo.

É sabido que fatores intrínsecos e extrínsecos estão presentes nas respostas ao estresse oxidativo e que a geração de radicais livres pode ser influenciada diretamente pela alimentação (Mentese et al., 2018; Al-Gubory, Fowler, Garrel, 2010; Luo et al., 2006). Desta forma, as questões nutricionais compreendem uma interface importante, nesse contexto, identificamos em nosso estudo que todas as gestantes sobrepeso (IMC $> 24,9$), apresentavam valores de AOPP elevados, o que nos permite sugerir que nossos achados correspondem as evidências relatadas. O estresse oxidativo está presente nos processos reprodutivos femininos e pode agravar a Restrição de Crescimento Intrauterino (CIUR) e endometriose (Hussain et al., 2021), verificamos que as 2 pacientes que apresentaram tais condições obtiveram os valores de AOPP alterados, contribuindo para afirmação encontrada no estudo citado. Ao realizarmos associação das complicações na gestação e AOPP, nossos resultados mostraram-se similares às análises encontradas por Turpin et al., (2015), confirmando que o equilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes estão alterados durante este período gerando altos níveis de ROS (Mentese, et al., 2018). Outro interessante achado é o impacto da alteração de pressão durante a gestação, seja por HAS, ou DHEG, fica evidente que esta comorbidade está intimamente ligada à geração de

estresse oxidativo, uma vez que os valores de TBARS e AOPP se apresentaram aumentados em todas as gestantes hipertensas, o que não foi verificado nas gestantes normotensas. As evidências remontam também uma relação importante entre os radicais livres aumentados neste período, devido necessidade placentária e a adequação dos antioxidantes, reafirmando que o equilíbrio dos componentes oxidantes e antioxidantes são indispensáveis para uma gestação saudável (Peuchant et al., 2004; Mundal et al., 2022).

A fim de reafirmar a importância da análise do estresse oxidativo na gestação, torna-se primordial identificar o impacto deste no feto (Perrone et al., 2016). Foi evidenciado em nosso estudo, através da associação de biomarcadores indiretos maternos e os RNs, uma influência significativa quando correlacionamos AOPP materno e o Apgar 1' e 5', quanto maior o valor de AOPP materno menor o apgar. Além desse dado, verificamos que gestantes com níveis elevados de TBARS e AOPP apresentam risco 1,8 e 1,5 vezes maior ($p < 0,05$), respectivamente, de que seus bebês apresentem Apgar 1' menor que 7.

As descobertas sobre a regulação imunológica no período gestacional demonstram evoluções frequentes e estão concentradas nas primícias da resposta imunológica materna específica, frente a exposição a um antígeno fetal (Huang et al., 2021; Shahet al., 2020). Caracterizado pela implantação do embrião, período crucial para desenvolvimento fetal e adaptação materna ao novo conceito (Tilburgs et al., 2009; Powell et al., 2017). Encontramos em nossos resultados uma influência na porcentagem de células T reguladoras FoxP3⁺ maternas quando estas apresentam hipertensão, estando elevadas nas pacientes do nosso estudo, este resultado é oposto ao encontrado por Sasaki et al., (2007) ao analisarem amostras de sangue periférico de gestantes sem alteração de pressão arterial, gestantes com pré-eclâmpsia e não gestantes, onde os valores de T reguladoras das pacientes com pré-eclâmpsia apresentavam-se diminuídos quando comparado aos outros dois grupos.

Outro resultado materno significativo, foi a correlação entre AOPP vs risco de disbiose ($p = 0,0118$ e $r = - 0,95$) e AOPP vs probiótico ($p = 0,0308$). A análise da microbiota intestinal e interferência desta para saúde materna e neonatal é alvo de crescentes estudos (Russell et al., 2013; Collado et al., 2016; Chu et al. 2017). A procura por tratamentos que colaborem para desenvolvimento de uma microbiota saudável tem despertado um interesse crescente em relação ao uso de probióticos para este fim (de Oliveria et al., 2013; Friques et al., 2015; Prado et al., 2015; Ton et al., 2020), porém diferente dos resultados apontados nesses estudos, identificamos

que a utilização do probiótico aumentou os valores de AOPP após sua utilização, este dado pode ter sofrido influência da coleta de amostra pós probiótico ter ocorrido próximo ao parto, sendo necessários mais estudos para afirmação desta questão. Entretanto os resultados identificados neste estudo revelam uma relação do estresse oxidativo com alteração da microbiota intestinal.

As consequências para o feto, como reflexo da gestação, foram evidenciadas por Loewendorf et al., (2015) ao relatar a ocorrência de diminuição nos valores de células T reguladoras e T CD4 de recém-nascidos de mães com pré-eclâmpsia, os recém-nascidos de mães hipertensas do nosso estudo não demonstraram tais alterações, porém quando analisamos a associação de complicações vivenciadas na gestação ou parto, encontramos uma resposta imune compatível com o estudo acima mencionado. Sinalizando influência na resposta imunológica do recém-nascido frente a exposição durante período gestacional. Podemos observar através da análise de risco relativo que quanto maiores os valores de células T reguladoras no sangue das gestantes, maior os riscos de que seus recém-nascidos apresentem Apgar 1' menor que 7 (RR: 2,8, $p < 0,05$). Porém, poucas análises até o momento foram realizadas sobre o alcance das complicações ou doenças maternas na gestação, na resposta imune do recém-nascido.

Identificamos também, que as complicações maternas durante a gestação ou parto, resultaram em aumento de estresse oxidativo na prole, essa repercussão sistêmica, evidencia uma relação importante entre a influência materna sobre ela. Quanto às análises dos dados dos recém-nascidos, observamos alterações de AOPP e TBARS em RN com necessidade de internação em UTIN e com valores de apgar alterados no 1' e 5'. Esses dados são compatíveis com estudos realizados nessa mesma temática por Buonocore et al., (2000), Buonocore et al., (2002), Perrone et al., (2016) e Negro et al., (2018), onde evidenciaram que a AOPP está aumentada no sangue de cordão umbilical de recém-nascidos com hipóxia e/ou complicações maternas na gestação ou parto. Diferente do observado nas gestantes, não evidenciamos nos biomarcadores dos RNs significância em relação a análise de tipo de parto e estresse oxidativo, relação inversa foi relatada por Hracsko et al., (2007), Mutlu (2011) e Noh (2014), onde os resultados apontam estresse oxidativo aumentado em recém-nascidos de parto cesáreo.

7. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nesse estudo, nos apresentam alguns fatores de risco vivenciados na gestação que podem influenciar em seus desfechos. Foi possível identificar que a idade, obesidade, diabetes mellitus, hipertensão e complicações vivenciadas na gestação podem refletir no estresse oxidativo materno e fetal. A utilização clínica de biomarcadores, como os que empregamos neste estudo pode ser um facilitador na tomada de decisão e condutas a serem adotadas. Intervenções precoces podem garantir melhor qualidade de vida dos recém-nascidos, prevenindo complicações futuras. As investigações aqui iniciadas nos remetem à importantes medidas de controle para melhor condução de uma gestação saudável e com medidas efetivas. Estudos adicionais com análise imunológica associadas a análises de citocinas em gestantes, poderá adicionar maiores esclarecimentos quanto as alterações das células T reguladoras. Assim como a investigação em gestantes com resultado desfavorável, como aborto espontâneo e óbito fetal, somando a este estudo uma análise completa sobre todos os desfechos gestacionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A. K. (2019). HARNESSING THE IMMUNE RESPONSE: BASIC PRINCIPLES AND THERAPEUTIC APPLICATIONS. Transactions of the American Clinical and Climatological Association, 130, 24–32.

Asma, G. E., van den Bergh, R. L., & Vossen, J. M. (1986). Characterization of early lymphoid precursor cells in the human fetus using monoclonal antibodies and anti-terminal deoxynucleotidyl transferase. Clinical and experimental immunology, 64(2), 356–363.

Avagliano, L., Bulfamante, G. P., Morabito, A., & Marconi, A. M. (2011). Abnormal spiral artery remodelling in the decidual segment during pregnancy: from histology to clinical correlation. Journal of clinical pathology, 64(12), 1064–1068. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2011-200092>

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*. 2004;5(3):266-271. doi:10.1038/ni1037

Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(10):1634-1650. doi:10.1016/j.biocel.2010.06.001

Ander SE, Diamond MS, Coyne CB. Immune responses at the maternal-fetal interface. *Sci Immunol*. 2019 Jan 11;4(31):eaat6114. doi: 10.1126/sciimmunol.aat6114. PMID: 30635356; PMCID: PMC6744611.

Arruvito L, Sanz M, Banham AH, Fainboim L. Expansion of CD4+CD25+ and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J Immunol*. 2007;178(4):2572-2578. doi:10.4049/jimmunol.178.4.2572

Assumpção D, Senicato C, Fisberg RM, Canesqui AM, Barros MBA. Are there differences in the quality of the diet of working and stay-at-home women? *Rev Saude Publica*. 2018;52:47. doi: 10.11606/s1518-8787.2018052000104. Epub 2018 May 3. PMID: 29723387; PMCID: PMC5933944.

Austin PC, Merlo J. Intermediate and advanced topics in multilevel logistic regression analysis. *Stat Med*. 2017 Sep 10;36(20):3257-3277. doi: 10.1002/sim.7336. Epub 2017 May 23. PMID: 28543517; PMCID: PMC5575471.

Baecher-Allan, C., & Hafler, D. A. (2006). Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunological reviews*, 212, 203–216. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00417.x>

Barboza K. R. M., Coco L. Z., Alves G. M., et al. Gastroprotective effect of oral kefir on indomethacin-induced acute gastric lesions in mice: impact on oxidative stress. *Life Sciences*. 2018;209:370–376. doi: 10.1016/j.lfs.2018.08.035

Bailey MT.; Lubach GR.; Coe CL. Prenatal Stress Alters Bacterial Colonization of the Gut in Infant Monkeys, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*: abril de 2004 - Volume 38 - Edição 4 - p 414-421

Bluestone, J. A., & Abbas, A. K. (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature reviews. Immunology*, 3(3), 253–257. <https://doi.org/10.1038/nri1032>.

Bourrie BC, Willing BP, Cotter PD. The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. *Front Microbiol*. 2016 May 4;7:647. doi: 10.3389/fmicb.2016.00647. PMID: 27199969; PMCID: PMC4854945.

Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001 Jan;27(1):68-73. doi: 10.1038/83784. PMID: 11138001.

Buonocore, G., Perrone, S., Longini, M., Terzuoli, L., & Bracci, R. (2000). Total hydroperoxide and advanced oxidation protein products in preterm hypoxic babies. *Pediatric research*, 47(2), 221–224. <https://doi.org/10.1203/00006450-200002000-00012>

Buonocore, G., Perrone, S., Longini, M., Vezzosi, P., Marzocchi, B., Paffetti, P., & Bracci, R. (2002). Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life. *Pediatric research*, 52(1), 46–49. <https://doi.org/10.1203/00006450-200207000-00010>.

Burt T. D. (2013). Fetal regulatory T cells and peripheral immune tolerance in utero: implications for development and disease. *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y. : 1989), 69(4), 346–358. <https://doi.org/10.1111/aji.12083>.

Chan, B. C., & Lao, T. T. (2008). Effect of parity and advanced maternal age on obstetric outcome. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 102(3), 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2008.05.004>

Christian LM, Franco A, Glaser R, Iams JD. Depressive symptoms are associated with elevated serum proinflammatory cytokines among pregnant women. *Brain Behav Immun*. 2009;23(6):750-754. doi:10.1016/j.bbi.2009.02.012

Chu DM, Meyer KM, Prince AL, Aagaard KM. Impact of maternal nutrition in pregnancy and lactation on offspring gut microbial composition and function [published correction appears in *Gut Microbes*. 2017 Apr 6;8(2):457-470]. *Gut Microbes*. 2016;7(6):459-470. doi:10.1080/19490976.2016.1241357

Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep*. 2016;6:23129. Published 2016 Mar 22. doi:10.1038/srep23129

Cunningham-Burley S, Backett-Milburn K, Kemmer D. Constructing health and sickness in the context of motherhood and paid work. *Sociol Health Illn*. 2006 May;28(4):385-409. doi: 10.1111/j.1467-9566.2006.00498.x. PMID: 16669805.

de Oliveira AML, Miguel MA, Peixoto RS, Rosado AS, Silva JT, Paschoalin VM. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Braz J Microbiol*. 2013 Oct 30;44(2):341-9. doi: 10.1590/S1517-83822013000200001. PMID: 24294220; PMCID: PMC3833126.

Del Chierico F, Vernocchi P, Petrucca A, Paci P, Fuentes S, Praticò G, Capuani G, Masotti A, Reddel S, Russo A, Vallone C, Salvatori G, Buffone E, Signore F, Rigon G, Dotta A, Miccheli A, de Vos WM, Dallapiccola B, Putignani L. Phylogenetic and Metabolic Tracking of Gut Microbiota during Perinatal Development. *PLoS One*. 2015 Sep 2;10(9):e0137347. doi: 10.1371/journal.pone.0137347. PMID: 26332837; PMCID: PMC4557834.

Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):811-8. doi: 10.1038/nature06245. PMID: 17943117.

Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol*. 2008 Nov 18;6(11):e280. doi: 10.1371/journal.pbio.0060280. PMID: 19018661; PMCID: PMC2586385.

Douwes J, Cheng S, Travier N, et al. Farm exposure in utero may protect against asthma, hay fever and eczema. *Eur Respir J*. 2008;32(3):603-611. doi:10.1183/09031936.00033707

Ebringer L, Ferencík M, Krajčovic J. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products--review. *Folia Microbiol (Praha)*. 2008;53(5):378-394. doi:10.1007/s12223-008-0059-1

Echeverri, I., Ortega-Ávila, J. G., Mosquera, M., Castillo, A., Jiménez, E., Suárez-Ortegon, M. F., Mateus, J. C., & Aguilar-de Plata, C. (2015). Relationship between maternal and newborn endothelial function and oxidative stress. *American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council*, 27(6), 822–831. <https://doi.org/10.1002/ajhb.22733>

Ege MJ, Bieli C, Frei R, et al. Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(4):817-823. doi:10.1016/j.jaci.2005.12.1307

Escherich T. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1885. *RevInfectDis*. 1989;11(2):352-356. doi:10.1093/clinids/11.2.352

Fontenot, J., Gavin, M. & Rudensky, A. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330–336 (2003). <https://doi.org/10.1038/ni904>

Frigues AG, Arpini CM, Kalil IC, Gava AL, Leal MA, Porto ML, Nogueira BV, Dias AT, Andrade TU, Pereira TM, Meyrelles SS, Campagnaro BP, Vasquez EC. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Transl Med*. 2015 Dec 30;13:390. doi: 10.1186/s12967-015-0759-7. PMID: 26715471; PMCID: PMC4696190.

Friedberg SH, Weissman IL. Lymphoid tissue architecture. II. Ontogeny of peripheral T and B cells in mice: evidence against Peyer's patches as the site of generation of B cells. *J Immunol*. 1974 Nov;113(5):1477-92. PMID: 4608249.

Gao, X., Zhong, Y., Liu, Y., Ding, R., & Chen, J. (2021). The Role and Function of Regulatory T Cells in Toxoplasma gondii-Induced Adverse Pregnancy Outcomes. *Journal of immunology research*, 2021, 8782672. <https://doi.org/10.1155/2021/8782672>

Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, de Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr*. 2011;6(3):209-240. doi:10.1007/s12263-011-0229-7

Giovanna Roncador, Philip J. Brown, Lorena Mestre, Sophie Hue, Jorge L. Martínez-Torre Cuadrada, Khoon Lin Ling, Sarah Pratap, Christy Toms, Bridget C. Fox, Vincenzo Cerundolo, Fiona Powrie, Alison H. Banham. Análise da expressão da proteína FOXP3 em células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ humanas no nível de célula única. *Eur J Immuno*. 2005;35 (6): 1681-1691. (Immunogen: Flowcytometry).

Golubeva AV, Crampton S, Desbonnet L, Edge D, O'Sullivan O, Lomasney KW, Zhdanov AV, Crispie F, Moloney RD, Borre YE, Cotter PD, Hyland NP, O'Halloran KD, Dinan TG, O'Keefe GW, Cryan JF. Prenatal stress-induced alterations in major physiological systems correlate with gut microbiota composition in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*. 2015 Oct;60:58-74. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.06.002. Epub 2015 Jun 17. PMID: 26135201.

Gomez Arango LF, Barrett HL, Callaway LK, Nitert MD. Probiotics and pregnancy. *Curr Diab Rep*. 2015;15(1):567. doi:10.1007/s11892-014-0567-0
Hahn AS, Altman T, Konwar KM, Hanson NW, Kim D, Relman DA, Dill DL, Hallam SJ. A geographically-diverse collection of 418 human gut microbiome pathway genome databases. *Sci Data*. 2017 Apr 11;4:170035. doi: 10.1038/sdata.2017.35. PMID: 28398290; PMCID: PMC5387927.

Gratz, I. K., Rosenblum, M. D., & Abbas, A. K. (2013). The life of regulatory T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1283, 8–12. <https://doi.org/10.1111/nyas.12011>

HANASAND, M. et al. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *ClinicaChimicaActa* 413 (2012)901-906.

Haynes, B. F., Martin, M. E., Kay, H. H., & Kurtzberg, J. (1988). Early events in human T cell ontogeny. Phenotypic characterization and immunohistologic localization of T cell precursors in early human fetal tissues. *The Journal of experimental medicine*, 168(3), 1061–1080. <https://doi.org/10.1084/jem.168.3.1061>.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Controle do desenvolvimento de células T reguladoras pelo fator de transcrição Foxp3 . *Ciência* . (2003) 299 :1057-61. 10.1126/science.1079490

Hussain, T., Murtaza, G., Metwally, E., Kalhor, D. H., Kalhor, M. S., Rahu, B. A., Sahito, R., Yin, Y., Yang, H., Chughtai, M. I., & Tan, B. (2021). The Role of Oxidative Stress and Antioxidant Balance in Pregnancy. *Mediators of Inflammation*, 2021, 9962860. <https://doi.org/10.1155/2021/9962860>

Huang Q, Wu H, Li M, Yang Y, Fu X. Prednisone improves pregnancy outcome in repeated implantation failure by enhance regulatory T cells bias. *J Reprod Immunol*. 2021;143:103245. doi:10.1016/j.jri.2020.103245

Hracsko Z, Safar Z, Orvos H, Novak Z, Pal A, Varga IS. Evaluation of oxidative stress markers after vaginal delivery or Caesarean section. *In Vivo*. 2007 Jul-Aug;21(4):703-6. PMID: 17708370.

Jasper MJ, Tremellen KP, Robertson SA. Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Mol Hum Reprod*. 2006 May;12(5):301-8. doi: 10.1093/molehr/gal032. Epub 2006 Mar 30. PMID: 16574699.

Jiang TT, Chaturvedi V, Ertelt JM, Kinder JM, Clark DR, Valent AM, Xin L, Way SS. Regulatory T cells: new keys for further unlocking the enigma of fetal tolerance and pregnancy complications. *J Immunol*. 2014 Jun 1;192(11):4949-56. doi: 10.4049/jimmunol.1400498. PMID: 24837152; PMCID: PMC4030688.

Kay, H. E., Doe, J., & Hockley, A. (1970). Response of human foetal thymocytes to phytohaemagglutinin (PHA). *Immunology*, 18(3), 393–396.

Kaplan, J., Shi, H. & Walker, W. The Role of Microbes in Developmental Immunologic Programming. *Pediatr Res* **69**, 465–472 (2011). <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318217638a>.

Khansari N., Shakiba Y., Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* . 2009;3(1):73–80. doi: 10.2174/187221309787158371.

Klippel BF, Duemke LB, Leal MA, Friques AG, Dantas EM, Dalvi RF, Gava AL, Pereira TM, Andrade TU, Meyrelles SS, Campagnaro BP, Vasquez EC. Effects of Kefir on the

Cardiac Autonomic Tones and Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats. *Front Physiol.* 2016 Jun 7;7:211. doi: 10.3389/fphys.2016.00211. PMID: 27375490; PMCID: PMC4895057.

Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell.* 2012;150(3):470-480. doi:10.1016/j.cell.2012.07.008

Krop, J., Heidt, S., Claas, F., & Eikmans, M. (2020). Regulatory T Cells in Pregnancy: It Is Not All About FoxP3. *Frontiers in immunology*, 11, 1182. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01182>

Liu, Y., Lan, Q., Lu, L., Chen, M., Xia, Z., Ma, J., Wang, J., Fan, H., Shen, Y., Ryffel, B., Brand, D., Quismorio, F., Liu, Z., Horwitz, D. A., Xu, A., & Zheng, S. G. (2014). Phenotypic and functional characteristic of a newly identified CD8+ Foxp3- CD103+ regulatory T cells. *Journal of molecular cell biology*, 6(1), 81–92. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt026>

Longini M, Belvisi E, Proietti F, Bazzini F, Buonocore G, Perrone S. Oxidative Stress Biomarkers: Establishment of Reference Values for Isoprostanes, AOPP, and NPBI in Cord Blood. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:1758432. doi:10.1155/2017/1758432.

Lohr, J., Knoechel, B., & Abbas, A. K. (2006). Regulatory T cells in the periphery. *Immunological reviews*, 212, 149–162. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00414.x>

Lohr, J., Knoechel, B., Caretto, D., & Abbas, A. K. (2009). Balance of Th1 and Th17 effector and peripheral regulatory T cells. *Microbes and infection*, 11(5), 589–593. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.04.012>

Loewendorf AI, Nguyen TA, Yesayan MN, Kahn DA. Preeclampsia is Characterized by Fetal NK Cell Activation and a Reduction in Regulatory T Cells. *Am J Reprod Immunol.* 2015;74(3):258-267. doi:10.1111/aji.12393.

Luoto R, Laitinen K, Nermes M, Isolauri E. Impact of maternal probiotic-supplemented dietary counselling on pregnancy outcome and prenatal and postnatal growth: a double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr.* 2010 Jun;103(12):1792-9. doi: 10.1017/S0007114509993898. Epub 2010 Feb 4. PMID: 20128938.

Luo, Z. C., Fraser, W. D., Julien, P., Deal, C. L., Audibert, F., Smith, G. N., Xiong, X., & Walker, M. (2006). Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress?. *Medical hypotheses*, 66(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.08.020>

Lu, J., Wang, Z., Cao, J., Chen, Y., & Dong, Y. (2018). A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 16(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0391-5>

Mackos AR, Maltz R, Bailey MT. The role of the commensal microbiota in adaptive and maladaptive stressor-induced immunomodulation. *HormBehav.* 2017 Feb;88:70-78. doi: 10.1016/j.yhbeh.2016.10.006. Epub 2016 Oct 17. PMID: 27760302; PMCID: PMC5303636.

Malchow S, Leventhal DS, Lee V, Nishi S, Socci ND, Savage PA. Aire enforces immune tolerance by directing autoreactive t cells into the regulatory T cell lineage. *Immunity.* (2016) 44:1102–13. 10.1016/j.immuni.2016.02.009

Mancino W, Duranti S, Mancabelli L, Longhi G, Anzalone R, Milani C, Lugli GA, Carnevali L, Statello R, Sgoifo A, van Sinderen D, Ventura M, Turrone F. Bifidobacterial Transfer from Mother to Child as Examined by an Animal Model. *Microorganisms.* 2019 Aug 27;7(9):293. doi: 10.3390/microorganisms7090293. PMID: 31461893; PMCID: PMC6780879.

Martin R, Makino H, CetinyurekYavuz A, Ben-Amor K, Roelofs M, Ishikawa E, Kubota H, Swinkels S, Sakai T, Oishi K, Kushiro A, Knol J. Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. *PLoS One.* 2016 Jun 30;11(6):e0158498. doi: 10.1371/journal.pone.0158498. PMID: 27362264; PMCID: PMC4928817.

Matsuki T, Yahagi K, Mori H, Matsumoto H, Hara T, Tajima S, Ogawa E, Kodama H, Yamamoto K, Yamada T, Matsumoto S, Kurokawa K. A key genetic factor for fucosyllactose utilization affects infant gut microbiota development. *Nat Commun.* 2016 Jun 24;7:11939. doi: 10.1038/ncomms11939. PMID: 27340092; PMCID: PMC4931012.

Mentese, A., Güven, S., Demir, S., Sümer, A., Yaman, S. Ö., Alver, A., Sonmez, M., & Karahan, S. C. (2018). Circulating parameters of oxidative stress and hypoxia in normal pregnancy and HELLP syndrome. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*, 27(11), 1567–1572. <https://doi.org/10.17219/acem/74653>.

Millán, I., Piñero-Ramos, J. D., Lara, I., Parra-Llorca, A., Torres-Cuevas, I., & Vento, M. (2018). Oxidative Stress in the Newborn Period: Useful Biomarkers in the Clinical Setting. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 7(12), 193. <https://doi.org/10.3390/antiox7120193>

Motwani, K., Peters, L. D., Vliegen, W. H., El-Sayed, A. G., Seay, H. R., Lopez, M. C., Baker, H. V., Posgai, A. L., Brusko, M. A., Perry, D. J., Bacher, R., Larkin, J., Haller, M. J., & Brusko, T. M. (2020). Human Regulatory T Cells From Umbilical Cord Blood Display Increased Repertoire Diversity and Lineage Stability Relative to Adult Peripheral Blood. *Frontiers in immunology*, 11, 611. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00611>.

Mold, J. E., Michaëlsson, J., Burt, T. D., Muench, M. O., Beckerman, K. P., Busch, M. P., Lee, T. H., Nixon, D. F., & McCune, J. M. (2008). Maternal alloantigens promote

the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5907), 1562–1565. <https://doi.org/10.1126/science.1164511>.

Mutlu B, Aksoy N, Cakir H, Celik H, Erel O. The effects of the mode of delivery on oxidative-antioxidative balance. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011 Nov;24(11):1367-70. doi: 10.3109/14767058.2010.548883. Epub 2011 Jan 19. PMID: 21247235.

Mundal, S. B., Rakner, J. J., Silva, G. B., Gierman, L. M., Austdal, M., Basnet, P., Elschot, M., Bakke, S. S., Ostrop, J., Thomsen, L., Moses, E. K., Acharya, G., Bjørge, L., & Iversen, A. C. (2022). Divergent Regulation of Decidual Oxidative-Stress Response by NRF2 and KEAP1 in Preeclampsia with and without Fetal Growth Restriction. *International journal of molecular sciences*, 23(4), 1966. <https://doi.org/10.3390/ijms23041966>.

Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T, Kawashima K, Nagata S, Nomoto K, Yamashiro Y. Sensitive Quantitative Analysis of the Meconium Bacterial Microbiota in Healthy Term Infants Born Vaginally or by Cesarean Section. *Front Microbiol.* 2016 Dec 15;7:1997. doi: 10.3389/fmicb.2016.01997. PMID: 28018325; PMCID: PMC5156933.

Nancy P, Tagliani E, Tay CS, Asp P, Levy DE, Erlebacher A. Chemokine gene silencing in decidual stromal cells limits T cell access to the maternal-fetal interface. *Science.* 2012;336(6086):1317-1321. doi:10.1126/science.1220030

NIH HMP Working Group, Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, Baker CC, Di Francesco V, Howcroft TK, Karp RW, Lunsford RD, Wellington CR, Belachew T, Wright M, Giblin C, David H, Mills M, Salomon R, Mullins C, Akolkar B, Begg L, Davis C, Grandison L, Humble M, Khalsa J, Little AR, Peavy H, Pontzer C, Portnoy M, Sayre MH, Starke-Reed P, Zakhari S, Read J, Watson B, Guyer M. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 2009 Dec;19(12):2317-23. doi: 10.1101/gr.096651.109. Epub 2009 Oct 9. PMID: 19819907; PMCID: PMC2792171.

Negro, S., Boutsikou, T., Briana, D. D., Tataranno, M. L., Longini, M., Proietti, F., Bazzini, F., Dani, C., Malamitsi-Puchner, A., Buonocore, G., & Perrone, S. (2017). Maternal obesity and perinatal oxidative stress: the strength of the association. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 31(1), 221–227.

Negro, S., Benders, M., Tataranno, M. L., Coviello, C., de Vries, L. S., van Bel, F., Groenendaal, F., Longini, M., Proietti, F., Belvisi, E., Buonocore, G., & Perrone, S. (2018). Early Prediction of Hypoxic-Ischemic Brain Injury by a New Panel of Biomarkers in a Population of Term Newborns. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 7608108. <https://doi.org/10.1155/2018/7608108>.

Noh, E. J., Kim, Y. H., Cho, M. K., Kim, J. W., Kim, J. W., Byun, Y. J., & Song, T. B. (2014). Comparison of oxidative stress markers in umbilical cord blood after vaginal and cesarean delivery. *Obstetrics & gynecology science*, 57(2), 109–114. <https://doi.org/10.5468/ogs.2014.57.2.109>

Osborne LM, Brar A, Klein SL. The role of Th17 cells in the pathophysiology of pregnancy and perinatal mood and anxiety disorders. *Brain Behav Immun.* 2019;76:7-16. doi:10.1016/j.bbi.2018.11.015

OdameAnto, E., Owiredu, W., Sakyi, S. A., Turpin, C. A., Ephraim, R., Fondjo, L. A., Obirikorang, C., Adua, E., & Acheampong, E. (2018). Adverse pregnancy outcomes and imbalance in angiogenic growth mediators and oxidative stress biomarkers is associated with advanced maternal age births: A prospective cohort study in Ghana. *PloSone*, 13(7), e0200581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200581>

Oldenhove, G., Bouladoux, N., Wohlfert, E. A., Hall, J. A., Chou, D., Dos Santos, L., O'Brien, S., Blank, R., Lamb, E., Natarajan, S., Kastenmayer, R., Hunter, C., Grigg, M. E., & Belkaid, Y. (2009). Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity*, 31(5), 772–786. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.10.001>

Perez-Muñoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome.* 2017 Apr 28;5(1):48. doi: 10.1186/s40168-017-0268-4. PMID: 28454555; PMCID: PMC5410102.

Pereira, A. C., & Martel, F. (2014). Oxidative stress in pregnancy and fertility pathologies. *Cell biology and toxicology*, 30(5), 301–312. <https://doi.org/10.1007/s10565-014-9285-2>

Pereira, R. D., De Long, N. E., Wang, R. C., Yazdi, F. T., Holloway, A. C., & Raha, S. (2015). Angiogenesis in the placenta: the role of reactive oxygen species signaling. *BioMed research international*, 2015, 814543. <https://doi.org/10.1155/2015/814543>

Perrone, S., Tataranno, M. L., Santacroce, A., Negro, S., & Buonocore, G. (2014). The role of oxidative stress on necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Current pediatric reviews*, 10(3), 202–207.

Perrone S, Laschi E, Buonocore G. Biomarkers of oxidative stress in the fetus and in the newborn. *Free Radic Biol Med.* 2019;142:23-31. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.034

Perrone, S., Tataranno, M. L., Negro, S., Longini, M., Toti, M. S., Alagna, M. G., Proietti, F., Bazzini, F., Toti, P., & Buonocore, G. (2016). Placental histological examination and the relationship with oxidative stress in preterm infants. *Placenta*, 46, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.08.084>.

Perrone, S., Laschi, E., & Buonocore, G. (2020). Oxidative stress biomarkers in the perinatal period: Diagnostic and prognostic value. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 25(2), 101087. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2020.101087>

Peuchant, E., Brun, J. L., Rigalleau, V., Dubourg, L., Thomas, M. J., Daniel, J. Y., Leng, J. J., & Gin, H. (2004). Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clinicalbiochemistry*, 37(4), 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.12.005>.

Pimenta FS, Luaces-Regueira M, Ton AM, Campagnaro BP, Campos-Toimil M, Pereira TM, Vasquez EC. Mechanisms of Action of Kefir in Chronic Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Cell PhysiolBiochem*. 2018;48(5):1901-1914. doi: 10.1159/000492511. Epub 2018 Aug 9. PMID: 30092577.

Polanczyk, M. J., Carson, B. D., Subramanian, S., Afentoulis, M., Vandenbark, A. A., Ziegler, S. F., & Offner, H. (2004). Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(4), 2227–2230. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.4.2227>

Powell, R. M., Lissauer, D., Tamblyn, J., Beggs, A., Cox, P., Moss, P., & Kilby, M. D. (2017). Decidual T Cells Exhibit a Highly Differentiated Phenotype and Demonstrate Potential Fetal Specificity and a Strong Transcriptional Response to IFN. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 199(10), 3406–3417. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700114>

Poston, L., Igosheva, N., Mistry, H. D., Seed, P. T., Shennan, A. H., Rana, S., Karumanchi, S. A., & Chappell, L. C. (2011). Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy disorders. *The American journal of clinical nutrition*, 94(6 Suppl), 1980S–1985S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001156>

Prado MR, Blandón LM, Vandenberghe LP, Rodrigues C, Castro GR, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Front Microbiol*. 2015 Oct 30;6:1177. doi: 10.3389/fmicb.2015.01177. PMID: 26579086; PMCID: PMC4626640.

Rautava S, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neonatology*. 2012;102(3):178-184. doi:10.1159/000339182

Renaud, S. J., Cotechini, T., Quirt, J. S., Macdonald-Goodfellow, S. K., Othman, M., & Graham, C. H. (2011). Spontaneous pregnancy loss mediated by abnormal maternal inflammation in rats is linked to deficient uteroplacental perfusion. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(3), 1799–1808. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002679>

Russell SL, MJ Gold, BP Disposto, Thorson L, McNagny KM, Finlay BB. O tratamento antibiótico perinatal afeta a microbiota murina, respostas imunes e asma alérgica. *Micróbiosintestinais* . 2013; 4 (2): 158-164. doi: 10.4161 / gmic.23567.

Scharschmidt, T. C., Vasquez, K. S., Truong, H. A., Gearty, S. V., Pauli, M. L., Nosbaum, A., Gratz, I. K., Otto, M., Moon, J. J., Liese, J., Abbas, A. K., Fischbach, M. A., & Rosenblum, M. D. (2015). A Wave of Regulatory T Cells into Neonatal Skin Mediates Tolerance to Commensal Microbes. *Immunity*, 43(5), 1011–1021. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.10.016>.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(3), 1151–1164.

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008 May 30;133(5):775-87. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.009. PMID: 18510923.

Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., & Hafler, D. A. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature reviews. Immunology*, 10(7), 490–500. <https://doi.org/10.1038/nri2785>.

Samstein, R. M., Josefowicz, S. Z., Arvey, A., Treuting, P. M., & Rudensky, A. Y. (2012). Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell*, 150(1), 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.031>

Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, Nanan R. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol*. 2009 Dec 1;183(11):7023-30. doi: 10.4049/jimmunol.0901154. Epub 2009 Nov 13. PMID: 19915051.

Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod*. 2004;10(5):347-353. doi:10.1093/molehr/gah044

Sasaki, Y., Darmochwal-Kolarz, D., Suzuki, D., Sakai, M., Ito, M., Shima, T., Shiozaki, A., Rolinski, J., & Saito, S. (2007). Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clinical and experimental immunology*, 149(1), 139–145. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03397.x>

Schoots M. H., Gordijn S. L., Scherjon S. A., van Goor H., Hillebrands J. L. Oxidative stress in placental pathology. *Placenta* . 2018;69:153–161. doi: 10.1016/j.placenta.2018.03.003.

Schumacher, A., Wafula, P. O., Bertoja, A. Z., Sollwedel, A., Thuere, C., Wollenberg, I., Yagita, H., Volk, H. D., & Zenclussen, A. C. (2007). Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy. *Obstetrics and gynecology*, 110(5), 1137–1145. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000284625.10175.31>

Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989 Nov 18;299(6710):1259-60. doi: 10.1136/bmj.299.6710.1259. PMID: 2513902; PMCID: PMC1838109.

Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, Kubo C, Koga Y. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol*. 2004 Jul 1;558(Pt 1):263-75. doi: 10.1113/jphysiol.2004.063388. Epub 2004 May 7. PMID: 15133062; PMCID: PMC1664925.

Somerset, D. A., Zheng, Y., Kilby, M. D., Sansom, D. M., & Drayson, M. T. (2004). Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology*, 112(1), 38–43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01869.x>

Teles, A., Schumacher, A., Kühnle, M. C., Linzke, N., Thuere, C., Reichardt, P., Tadokoro, C. E., Hämmerling, G. J., & Zenclussen, A. C. (2013). Control of uterine microenvironment by foxp3(+) cells facilitates embryo implantation. *Frontiers in immunology*, 4, 158. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00158>

Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev*. 2008;223:87-113. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00628.x

Thiele K, Ahrendt LS, Hecher K, Arck PC. The mnemonic code of pregnancy: Comparative analyses of pregnancy success and complication risk in first and second human pregnancies. *J Reprod Immunol*. 2019;134-135:11-20. doi:10.1016/j.jri.2019.06.003.

Tillisch K, Labus J, Kilpatrick L, Jiang Z, Stains J, Ebrat B, Guyonnet D, Legrain-Raspaud S, Trotin B, Naliboff B, Mayer EA. Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology*. 2013 Jun;144(7):1394-401, 1401.e1-4. doi: 10.1053/j.gastro.2013.02.043. Epub 2013 Mar 6. PMID: 23474283; PMCID: PMC3839572.

Tilburgs, T., Scherjon, S. A., van der Mast, B. J., Haasnoot, G. W., Versteeg-V D Voort-Maarschalk, M., Roelen, D. L., van Rood, J. J., & Claas, F. H. (2009). Fetal-maternal HLA-C mismatch is associated with decidual T cell activation and induction of functional T regulatory cells. *Journal of reproductive immunology*, 82(2), 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.05.003>

Ton AMM, Campagnaro BP, Alves GA, Aires R, Côco LZ, Arpini CM, Guerra E Oliveira T, Campos-Toimil M, Meyrelles SS, Pereira TMC, Vasquez EC. Oxidative Stress and Dementia in Alzheimer's Patients: Effects of Synbiotic Supplementation. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Jan 13;2020:2638703. doi: 10.1155/2020/2638703. PMID: 32411323; PMCID: PMC7201593.

Torres-Cuevas, I., Parra-Llorca, A., Sánchez-Illana, A., Nuñez-Ramiro, A., Kuligowski, J., Cháfer-Pericás, C., Cernada, M., Escobar, J., & Vento, M. (2017). Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox biology*, 12, 674–681. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.011>.

Turroni F, Milani C, Duranti S, Lugli GA, Bernasconi S, Margolles A, Di Pierro F, van Sinderen D, Ventura M. The infant gut microbiome as a microbial organ influencing host well-being. *Ital J Pediatr*. 2020 Feb 5;46(1):16. doi: 10.1186/s13052-020-0781-0. PMID: 32024556; PMCID: PMC7003403.

Turpin, C. A., Sakyi, S. A., Owiredu, W. K., Ephraim, R. K., & Anto, E. O. (2015). Association between adverse pregnancy outcome and imbalance in angiogenic regulators and oxidative stress biomarkers in gestational hypertension and preeclampsia. *BMC pregnancy and childbirth*, 15, 189. <https://doi.org/10.1186/s12884-015-0624-y>.

Trowsdale, J., Betz, A. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nat Immunol* 7, 241–246 (2006). <https://doi.org/10.1038/ni1317>

Vakilian, K., Ranjbar, A., Zarganjfard, A., Mortazavi, M., Vosough-Ghanbari, S., Mashaiee, S., & Abdollahi, M. (2009). On the relation of oxidative stress in delivery mode in pregnant women; a toxicological concern. *Toxicology mechanisms and methods*, 19(2), 94–99. <https://doi.org/10.1080/15376510802232134>

Van Langendonck, A., Casanas-Roux, F., & Donnez, J. (2002). Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertility and sterility*, 77(5), 861–870. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)02959-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)02959-x).

Vento, M., & Teramo, K. (2013). Evaluating the fetus at risk for cardiopulmonary compromise. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 18(6), 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2013.08.003>.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. *Int. J. Nephrol. Dialysis Transplant*. 1996; 9(5):1304-13.

Williams PJ, Searle RF, Robson SC, Innes BA, Bulmer JN. Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2009 Oct;82(1):24-31. doi: 10.1016/j.jri.2009.08.001. Epub 2009 Sep 3. PMID: 19732959.

World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation. Geneva: World Health Organization, 2000. p. 256. WHO Obesity Technical Report Series, n. 284

Yılmaz İ, Dolar ME, Özpınar H. Effect of administering kefir on the changes in fecal microbiota and symptoms of inflammatory bowel disease: A randomized controlled trial. *Turk J Gastroenterol.* 2019;30(3):242-253. doi:10.5152/tjg.2018.18227

Zhao, J. X., Zeng, Y. Y., & Liu, Y. (2007). Fetal alloantigen is responsible for the expansion of the CD4(+)CD25(+) regulatory T cell pool during pregnancy. *Journal of reproductive immunology*, 75(2), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2007.06.052>